

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA ESPECIE *Ilex guayusa* (Loes.)

AUTOR:

RICARDO ISRAEL FONSECA MONTALVO

TUTOR:

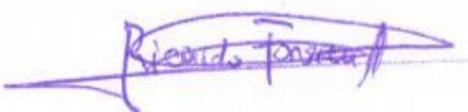
PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

Quito, abril de 2017

Cesión de derechos de autor

Yo, Ricardo Israel Fonseca Montalvo, con documento de identificación N° 171816124-1, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Flavonoides y actividad antioxidante de la especie *Ilex guayusa* (Loes)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Ricardo Israel Fonseca Montalvo

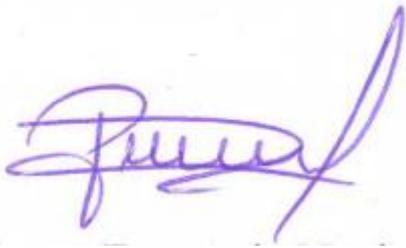
C.I. 171816124-1

Quito, marzo del 2017

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Flavonoides y actividad antioxidante de la especie *Ilex guayusa* (Loes) realizado por Ricardo Israel Fonseca Montalvo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2017

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Paco Noriega Rivera', is written over a faint dotted line.

Paco Fernando Noriega Rivera

C.I. 060242132-3

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis padres Richard y Mónica quienes siempre me han brindado todo su amor y comprensión, y me han enseñado que con esfuerzo, dedicación y perseverancia se puede lograr todo lo que uno se proponga.

A mi hermano Sebastián, por las enseñanzas que me ha dejado en todo el transcurso de mi vida, por su apoyo incondicional y por todos los momentos que hemos vivido juntos.

A mis amigas y amigos que me han brindado su amistad, por los momentos únicos e inmemorables, y por su apoyo en el transcurso de este trabajo.

Agradecimiento

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por financiar este proyecto investigativo.

Al profesor Paco Noriega, por darme la oportunidad de trabajar con él en este proyecto, por toda la paciencia, el tiempo, y los conocimientos que me ha dejado en todo el transcurso de la investigación.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) por brindarme la oportunidad de trabajar en los laboratorios y ayudarme con los equipos y materiales necesarios para realizar este trabajo.

Al analista de laboratorio Edison Osorio y a la ayudante de investigación Michelle Parra por toda su colaboración y ayuda para la culminación de este proyecto.

A mis amigos Ruth y Cristofer, por toda su ayuda y amistad en todo el transcurso de la carrera.

Y en general, a todos los profesores que me han forjado en todo el transcurso de la carrera de Biotecnología con sus experiencias, conocimientos y saberes.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	3
Marco conceptual	3
1.1. <i>Ilex guayusa</i> (Loes)	3
1.1.1. Información botánica	3
1.1.2. Hábitat	3
1.1.3. Taxonomía.....	3
1.1.4. Características morfológicas	4
1.1.5. Usos etnobotánicos	5
1.1.6. Fitoquímica	5
1.1.7. Propiedades farmacológicas.....	6
1.1.8. Importancia económica	7
1.2. Generalidades de los antioxidantes	8
1.2.1. Especies reactivas de oxígeno	8
1.2.2. Estrés oxidativo	8
1.2.3. Clasificación de los antioxidantes	9
1.2.4. Fuentes de antioxidantes	11
1.2.5. Estrés antioxidativo.....	12
1.2.6. Técnicas de medición de la actividad antioxidante.....	12
1.2.6.1. Ensayos químicos	12

1.2.6.1.1. Método CARO (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno)	12
1.2.6.1.3. Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)	13
1.2.6.1.4. Método FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro)	14
1.2.6.2. Ensayos biológicos	14
1.2.6.2.1. Método SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico)	14
1.2.6.2.2. Método FOX (Oxidación Ferrosa Naranja de Xilenol)	14
1.2.6.2.3. Eliminación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	15
1.2.6.3. Técnica instrumental	15
1.3. Flavonoides	15
1.3.1. Estructura química	16
1.3.2. Clasificación de los flavonoides	16
1.3.3. Origen biosintético	17
1.3.4. Actividad antioxidante	18
1.3.4.1. Actividad antioxidante en especies vegetales	18
1.3.4.2. Actividad terapéutica en el ser humano	19
1.3.5. Técnicas de cuantificación e identificación de flavonoides	20
1.3.5.1. Espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-Vis)	20
1.3.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21
1.3.5.3. Cromatografía de capa fina (TLC)	21
1.3.5.4. Cromatografía de gases	22

1.3.5.4.1. Espectrometría de masas	22
1.3.5.4.2. Derivatización de flavonoides.....	23
Capítulo 2.....	25
Materiales y métodos	25
2.1. Obtención del material vegetal.....	25
2.2. Elaboración de extractos	25
2.3. Cuantificación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	25
2.4. Determinación de flavonoides totales	26
2.5. Valoración de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	27
2.6. Identificación de flavonoides mediante TLC	28
2.7. Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)	30
2.8. Identificación de flavonoides por cromatografía de gases acoplado a masas	30
2.8.1. Preparación de las muestras y derivatización	30
2.8.2. GC-MS.....	31
Capítulo 3.....	33
Resultados y discusión	33
3.1. Cuantificación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu).....	33
3.2. Determinación de flavonoides totales	35
3.3. Valoración de la actividad antioxidante por el método DPPH.....	36

3.4. Identificación de flavonoides mediante TLC	39
3.5. Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)	45
3.6. Identificación de flavonoides por cromatografía de gases acoplado a masas	
46	
Conclusiones	49
Recomendaciones.....	51
Referencias.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la <i>Ilex guayusa</i> (Loes.)	4
Tabla 2. Clasificación estructural de los flavonoides.....	17
Tabla 3. Fenoles totales en extractos de <i>Ilex guayusa</i> y té verde.....	34
Tabla 4. Flavonoides totales de extractos de <i>Ilex guayusa</i> y té verde	35
Tabla 5. Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de té verde	36
Tabla 6. Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de <i>Ilex guayusa</i> al 80%	37
Tabla 7. Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de <i>Ilex guayusa</i> al 50%	37
Tabla 8. Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de <i>Ilex guayusa</i> al 20%	38
Tabla 9. Valoración de la actividad antioxidante DPPH del ácido ascórbico.....	38
Tabla 10. Valores de Rf de las fracciones del extracto de <i>Ilex guayusa</i> al 50%.....	40
Tabla 11. Primera placa TLC	43
Tabla 12. Segunda placa TLC.....	43
Tabla 13. Tercera placa TLC	44
Tabla 14. Cuarta placa TLC	44
Tabla 15. Quinta placa TLC.....	44
Tabla 16. Flavonoides identificados por comparación de los pesos moleculares de los flavonoides siliados y los iones moleculares obtenidos.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los antioxidantes naturales y sintéticos. *: BHA (hidroxibutilanisol), BHT (butilhidroxitolueno), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), PG (galato de propilo), TBHQ (terbutil hidroquinona)..	10
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides donde se muestra los dos anillos de benceno A y B enlazados al anillo de pirano heterocíclico C.....	16
Figura 3. Origen biosintético de la Naringenina.	18
Figura 4. Mecanismo general de reacción para la formación de derivados de trimetilsililo con TMCS.	24
Figura 5. Molécula de quercetina. Donde a) molécula antes de la siliación, y b) molécula después de la siliación.	24
Figura 6. Cromatografía en capa fina. Se muestra el sitio de aplicación de la muestra y las distancias recorridas por un compuesto separado (a) y el eluyente (b).	29
Figura 7. Curva de calibración con ácido gálico como estándar de referencia de fenoles.	33
Figura 8. Curva de calibración con hiperósido como estándar de referencia de flavonoides.	35
Figura 9. Placa TLC para <i>Ilex guayusa</i> observada a 245 nm (A) y 366 nm (B).....	39
Figura 10. Estándares de flavonoides: quercetina, canferol y rutina, junto con el extracto de <i>Ilex guayusa</i> bajo luz UV a 245 nm (A) y 366 nm (B).	40
Figura 11. Estándares de flavonoides: naringenina, hesperidina, diosmina y mircetina, junto con el extracto de <i>Ilex guayusa</i> bajo luz UV a 245 nm (A) y 366 nm (B).	40
Figura 12. Estándares de flavonoides: morina, hidroxiflavona, baicaleina y luteolina, junto con el extracto de <i>Ilex guayusa</i> bajo luz UV a 245 nm (A) y 366 nm (B).	40

Figura 13. Estándares de flavonoides: naringina, hiperósido, crisina y epigallocatequina, junto con el extracto de <i>Ilex guayusa</i> bajo luz UV a 245 nm (A) y 366 nm (B).	41
Figura 14. Estándares de flavonoides: daidzeina, apigenina, genisteína y silibina, junto con el extracto de <i>Ilex guayusa</i> bajo luz UV a 245 nm (A) y 366 nm (B).....	41
Figura 15. Cromatograma del extracto de <i>Ilex guayusa</i> al 50% (HPLC-DAD) donde se muestran los diferentes picos de moléculas de flavonoides	44
Figura 16. Cromatograma de <i>Ilex guayusa</i> obtenido por cromatografía de gases acoplado a masas donde se muestran los picos de los posibles flavonoides	45

Índice de anexos

Anexo 1. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración del referente natural: té verde, los extractos de <i>Ilex guayusa</i> al 20%, 50% y 80% y el referente sintético: ácido ascórbico.	62
Anexo 2. Cromatogramas y espectros de las moléculas de flavonoides identificados en la muestra de <i>Ilex guayusa</i> analiza mediante GC/MS.....	65

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo principal la determinación de los flavonoides presentes y la actividad antioxidante de la especie *Ilex guayusa* (Loes.), para lo cual, se cuantificó los fenoles y flavonoides totales por métodos espectrofotométricos obteniendo valores de 22,44 y 7,50 mg/mL respectivamente, en el extracto hidroalcohólico de *Ilex guayusa* al 50% que fue el que mostró una mayor cantidad de estos compuestos. El té verde (*Camellia sinensis*), que actuó como referente natural de comparación en este estudio, expuso una mayor concentración de fenoles frente a la *Ilex guayusa*, sin embargo, al analizar la concentración de flavonoides, la *Ilex guayusa* presentó un porcentaje mayor que el té verde. Del mismo modo, la valoración de la actividad antioxidante por el método DPPH tuvo un índice de inhibición medio (\bar{IC}_{50}) de 23,850 $\mu\text{L/mL}$, mostrando que la *Ilex guayusa* tiene una mayor capacidad para eliminar radicales libres que el té verde y el ácido ascórbico. Los métodos de Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Arreglo de Fotodiodos (HPLC-DAD) permitieron la detección de 8 posibles flavonoides, de los cuales, 4 fueron detectados por TLC: la quercetina, la hidroxiflavona, la 3-O-galactósido de quercetina y la apigenina, mientras que por Cromatografía de Gases Acoplado a Masas (GC/MS) se detectó la presencia de 4 moléculas de flavonoides: el 3',4'-dimetoxiflavonol, la 3-hidroxiflavona, la tectocrisina y el canferol mediante la derivatización por siliación.

Palabras clave: antioxidante, compuestos fenólicos, flavonoides, *Ilex guayusa*, cromatografía.

Abstract

The present research had as a main aim the determination of the present flavonoids and the antioxidant activity of the *Ilex guayusa* (Loes.) species, for which, phenols and total flavonoids were quantified by spectrophotometric methods obtaining values of 22,44 and 7,50 mg/mL respectively in the hydroalcoholic extract of *Ilex guayusa* to 50% that showed a mayor amount of these compounds. Green tea (*Camellia sinensis*), which acts as a natural referent of comparison in this study, exposed a higher concentration of phenols in front of *Ilex guayusa*, however, to analyze the flavonoids concentration, *Ilex guayusa* presented a higher percentage than green tea. Likewise, the antioxidant activity valuation by the DPPH method had an average inhibition rate (\bar{IC}_{50}) of 23,850 μ g/mL, showing that *Ilex guayusa* has a greater capacity to scavenging free radicals than green tea and ascorbic acid. The methods of Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) allowed the identification of 8 possible flavonoids of which 4 was detected by TLC: quercetin, hydroxyflavone, 3-O-galactoside of quercetin and apigenin while the Gas Chromatography coupled to masses (GC/MS) detected the presence of 4 flavonoid molecules: 3',4'-dimethoxyflavonol, 3-hydroxyflavone, tectocrisin and canferol through the derivatization by silylation.

Keywords: antioxidant, phenolic compounds, flavonoids, *Ilex guayusa*, chromatography.

Introducción

En los últimos años el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades se ha incrementado a nivel mundial, convirtiéndose en la base de la fabricación de nuevos medicamentos. Sin embargo, gran parte de estas especies vegetales carecen de una investigación de sus compuestos fitoquímicos y de sus propiedades farmacológicas potenciales (Wintola & Afolayan, 2015).

La especie *Ilex guayusa*, comúnmente conocida como “guayusa”, es una planta aromática y medicinal nativa de la Amazonía ecuatoriana y con cierta similitud a la *Ilex paraguariensis*, conocida como yerba mate (Arias, 2013). Sus propiedades estimulantes son aprovechadas por empresas como Chankuap y Runa en la comercialización de hierbas para infusiones y bebidas energizantes, ya que contiene la misma cantidad de cafeína que una taza de café y el doble de antioxidantes que el té verde (Runa, 2016).

Por su parte, las comunidades indígenas de la Amazonía ecuatoriana la han empleado por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, diuréticas, antipiréticas y digestivas (de la Torre, Navarrete, & Muriel M., 2008), lo que demuestra su alta actividad terapéutica. Pese a esto, existen pocas evidencias científicas de cuáles son los compuestos específicos que generan tales beneficios para la salud.

Por tal motivo, el presente trabajo se planteó como objetivo general: “Valorar a la especie *Ilex guayusa* en función de sus componentes fenólicos (flavonoides) y su potencial antioxidante”, y como objetivos específicos: “Cuantificar en extractos de la planta, los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, empleando métodos espectrofotométricos” y “Determinar las estructuras químicas de los flavonoides presentes en la especie, por los métodos de: Cromatografía en Capa Fina (TLC),

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Arreglo de Fotodiodos (HPLC-DAD) y Cromatografía de Gases Acoplado a Masas (GC derivatización-MS)”.

Los estudios sobre el poder antioxidante y los flavonoides presentes en la *Ilex guayusa*, son necesarios para explicar algunas de sus propiedades curativas; de esta manera se abrirá campo a investigaciones posteriores en los que se tenga un conocimiento ampliado de los principios activos potenciales de esta planta y así poder utilizarla en la creación de nuevos fármacos, cosméticos, nutracéuticos, entre otros.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. *Ilex guayusa* (Loes.)

1.1.1. Información botánica

La *Ilex guayusa* es un árbol nativo de la Región Amazónica que se distribuye desde el norte de Perú hasta el sur de Colombia y crece entre los 200 a 2500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Ríos, Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007). En Ecuador, se localiza en la región Andina y Amazónica de las provincias de: Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Pichincha y Tungurahua (Tropicos, 2009).

1.1.2. Hábitat

Su hábitat comprende a bosques de tipo húmedo tropical y seco premontano, con temperaturas de 18 a 26°C y precipitaciones anuales de 1000 a 3000 mm. Crece en suelos jóvenes de textura franco arenoso, húmedos o secos, con una tolerancia de pH ácido (5,0 – 5,5); no obstante, su desarrollo es dominante en suelos drenados y fértiles (Collahuazo, 2012).

1.1.3. Taxonomía

Sus nombres comunes son: “waís (shuar chicham), wayusa, wayusa panka (kichwa) guayusa, guayusa del monte (castellano)” (de la Torre, Navarrete, & Muriel M., 2008).

Los datos taxonómicos de la *Ilex guayusa* se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Taxonomía de la *Ilex guayusa* (Loes.)

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliopsida</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Orden	<i>Aquifoliales</i>
Familia	<i>Aquifoliaceae</i>
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>I. guayusa</i>

Nota: Elaborado por: el autor (2017).

Fuente: García (1975).

1.1.4. Características morfológicas

Estudios de (Barriga, 1992 & Dueñas-Serrano, y otros, 2013) coinciden en que los árboles de *Ilex guayusa* presentan una altura promedio de 10 metros con un diámetro a la altura del pecho de 50 a 80 centímetros; sin embargo, se han reportado árboles de hasta 25 y 30 metros de altura. Dentro de las investigaciones de (Barriga, 1992) también se han determinado las siguientes características morfológicas de la especie en estudio:

- Hojas simples y alternadas, coriáceas, dentadas, glabras del haz y el envés, elípticas, enteras, ápice acuminado con base aguda de 15,5 a 16 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho, pecíolo corto de 1 cm de largo.
- Planta dioica con flores de pétalos obtusos y de igual número de estambres, corola blanco-verdosa, anteras alargadas y ovario sub-sésil global con 4 a 6 cavidades.
- El fruto es una drupa globosa de color verde o rojo que crece hasta 1 cm de diámetro.

A pesar de la presencia de semillas, sólo se conoce la reproducción asexual de la *Ilex guayusa* por acción del hombre, a través de estacas leñosas o semi-leñosas (Dueñas , Jarrett, Cummins, & Logan-Hines, 2016).

1.1.5. Usos etnobotánicos

En Ecuador, los pueblos indígenas de la Amazonía como los Kichwa, han usado esta planta como un tónico estomacal, diurético, repelente y remedio para la gripe; de igual forma, se cree que ayuda a calmar los dolores musculares, aumentar la fertilidad y la libido (Dueñas , Jarrett, Cummins, & Logan-Hines, 2016). Por otro lado, los Shuar y los Achuar la han utilizado como emético para una limpieza estomacal, y para aliviar la artritis y el reumatismo (de la Torre, Navarrete, & Muriel M., 2008). Los Cofanes y Secoyas la emplean para tratar dolencias, mientras que los Tsáchilas beben la infusión de las hojas como antipirético, las mujeres se realizan baños de vapor para mitigar dolores antes y después del parto, y como analgésico en dolencias menstruales (Dueñas , Jarrett, Cummins, & Logan-Hines, 2016). En la actualidad, su uso más difundido es como bebida estimulante y energizante (Runa, 2016).

1.1.6. Fitoquímica

En investigaciones de Radice & Vidari (2007), se ha evidenciado una variedad de alcaloides como la teobromina y la cafeína, además de: saponinas, cumarinas, esteroides, terpenos, taninos, fenoles, azúcares reductores, flavonoides y quinonas; asimismo, en el trabajo de Carrión Armijos (2011) se indica la posible presencia del triterpeno uvaol presente en el aceite de oliva virgen, que denota propiedades anticancerígenas. Mientras que Runa (2016), menciona la presencia de ácidos clorogénicos, importantes para la salud cardiovascular y reducción de la presión

arterial, además del contenido de 15 aminoácidos esenciales. Estos compuestos podrían explicar las propiedades curativas ancestrales de la *Ilex guayusa*.

1.1.7. Propiedades farmacológicas

En escritos de García Barriga (1975), se describe el *Boletín del Instituto Botánico de la Universidad Central*, Quito, Ecuador, del mes de septiembre de 1943, donde se menciona estudios de las propiedades terapéuticas de la *Ilex guayusa*, en la que se constata mediante análisis cualitativos con reactivo de Benedict que las infusiones de *Ilex guayusa* disminuyen el índice glucosúrico de los diabéticos. Asimismo, pruebas cuantitativas en la sangre de un paciente tratado con infusiones de *Ilex guayusa* durante 20 días, indican una baja del índice glucémico del 22% antes del tratamiento, al 1,01% al finalizar el tratamiento.

Esta información es contrastada con investigaciones de (Swanston-Flatt, Day, Flatt, Gould, & Bailey, 1989) en la que se usó estreptozocina para inducir diabetes en ratones de laboratorio. En un tratamiento con decocciones de *Ilex guayusa*, los ratones retardaron el desarrollo de hiperglucemia, disminuyeron los síntomas de la hiperfagia y polidipsia, redujeron su peso corporal y niveles de hemoglobina glucosilada. El principio activo responsable de esta actividad aún no está establecido, sin embargo, el contenido de guanidina (CH_5N_3) de la *Ilex guayusa* está emparentado a las biguanidinas, una clase de medicamentos antidiabéticos orales formados por la unión de dos radicales de guanidina. También se presume que los compuestos fenólicos de la *Ilex guayusa* pueden actuar como inhibidores de α y β -glucosidasa, involucradas en el mecanismo de desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (Fernández Romero, 2014).

Por otra parte, (Bussmann, y otros, 2011) comprobaron la actividad antimicrobiana del extracto seco de las hojas de *Ilex guayusa* contra *Staphylococcus aureus* con un halo

de inhibición de 14 mm, mientras que Ruiz & Roque (2009) encontraron actividad antifúngica del extracto seco contra *Candida albicans*, con un halo de inhibición de 25 mm y contra *Microsporium canis* con un halo de inhibición 32 mm; en ambos estudios se trabajó con antibióticos y antifúngicos como controles positivos y agua destilada como control negativo, los extractos secos se obtuvieron con etanol al 95% y fueron concentrados en rotavapor a una temperatura de 35-40°C. De igual forma, en estudios de evaluación antiparasitaria (Calderón, y otros, 2010) determinaron que el extracto seco de las hojas de *Ilex guayusa* presentó un índice de inhibición medio (IC₅₀) µg/mL de: 47 para *Trypanozoma cruzi*, > 50 para *Plasmodium falciparum* y > 50 para *Leishmania mexicana*.

Extractos hidroalcohólicos de la *Ilex guayusa* también han sido utilizado para comprobar el efecto estrogénico en ratas albinas (*Rattus novergicus*) debido a la identificación de fitoestrógenos en la *Ilex guayusa* tales como: ononin, quercetina y β-sitosterol. Tres tratamientos de: 9 mg/Kg, 18 mg/Kg y 36 mg/Kg por día, produjeron un efecto estrogénico sobre los ovarios, útero y estradiol sérico de ratas inmaduras, concluyendo que el empleo de *Ilex guayusa* resultaría beneficioso en el tratamiento de algunos casos de infertilidad en mujeres (Tuquinga Usca, 2013).

1.1.8. Importancia económica

A nivel mundial, el consumo de *Ilex guayusa* se ha propagado siendo el 98% de las hojas de la especie provenientes de Ecuador, trayendo consigo un ingreso para las comunidades productoras de la Amazonía ecuatoriana de un aproximado de \$400.000, favoreciendo a más de 3000 familias agricultoras. En el año 2014, se exportó un millón de libras de hoja fresca de *Ilex guayusa*, lo que ha generado un desarrollo sustentable

de estas agrupaciones y ha ofrecido un producto natural y funcional para el mundo entero (Weissmann, 2014).

1.2. Generalidades de los antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que previenen el daño celular causado por la oxidación de otras moléculas; la oxidación es una reacción química en la cual se transfieren electrones de una molécula a un agente oxidante, generando en su proceso “especies reactivas de oxígeno” (ERO) (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014), sin embargo, las ERO también se producen en el organismo por toxinas ambientales, el humo del cigarrillo y medicamentos (Dietger , 2016).

1.2.1. Especies reactivas de oxígeno

Éstas “especies reactivas de oxígeno” son pequeñas moléculas que comprenden a los radicales libres como el superóxido (O_2^-) y a los no radicales como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 importantes en procesos corporales como el metabolismo y la respiración, y como su nombre lo indica, son más reactivas que el oxígeno molecular (Aldred, 2013).

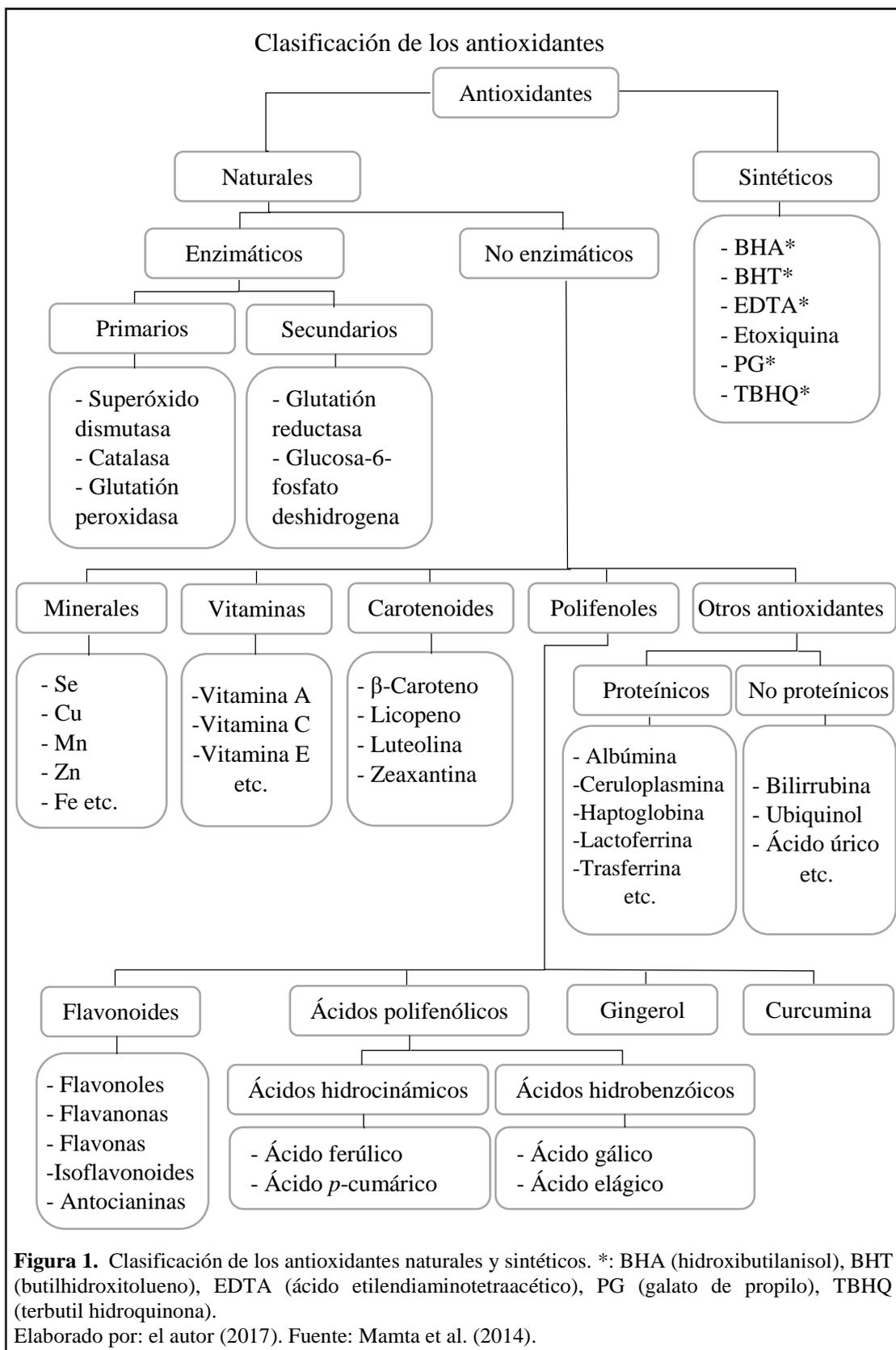
1.2.2. Estrés oxidativo

Cuando existe un desbalance entre las ERO, y su eliminación por sistemas antioxidantes, se provoca un fenómeno conocido como “estrés oxidativo”, el cual, es el causante de patologías severas como: aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, cáncer, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias o envejecimiento prematuro (Ďuračková, 2014). Los antioxidantes equilibran y neutralizan a las ERO previniendo el daño celular (Schwab, 2012).

1.2.3. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo heterogéneo con varias estructuras que pueden clasificarse según su peso molecular en: antioxidantes de alto peso molecular y antioxidantes de bajo peso molecular. Los de alto peso molecular incluyen a las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa; y a los antioxidantes proteicos no enzimáticos como: albúmina, transferrina y varias metalotioneínas. Por su parte, los de bajo peso molecular engloban a compuestos lipofílicos e hidrofílicos producidos por el organismo tales como: ácido úrico, ácido lipóico, glutatión, o ubiquinol; y antioxidantes exógenos obtenidos de las comidas como: vitamina C, vitamina E y compuestos polifenólicos incluyendo a los flavonoides (Ďuračková, 2014).

Sin embargo, según Mamta et al. (2014) cataloga a los antioxidantes en dos grandes grupos en relación a su origen: naturales o sintéticos. En la Figura 1 se detalla esta clasificación.



1.2.4. Fuentes de antioxidantes

Los antioxidantes pueden provenir tanto de fuentes naturales como: cereales, frutas, vegetales, legumbres, especias y animales; y de la agroindustria, como por ejemplo: los desechos de procesos industriales (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014).

Las fuentes de antioxidantes más consumidos son: vitamina E: aguacate, aceite de oliva, arroz, frutos secos; vitamina C: tomate, acelga, frutilla, guayaba, kiwi, naranja, limón; caroteno: espinaca, zanahoria, melón, mango. Entre los flavonoides tenemos: antocianidinas: en pigmentos rojo-azulados de las frutillas; catequinas: en té verde y negro; citroflavonoides: con naranjina que otorga el sabor amargo a la naranja, limón, toronja; isoflavonoides: como la genisteína y daidzaína presentes en la soya y sus derivados (Coronado H., Vega y León Rey Gutiérrez T., Vázquez F., & Radilla V., 2015).

Por su parte, la agroindustria ha provisto una de las mayores fuentes de producción de antioxidantes. Los subproductos generados contienen grandes cantidades de proteínas, azúcares y lípidos, que mediante pretratamientos físicos y biológicos permiten recuperar antioxidantes naturales. Un ejemplo de esto es la bioproducción de ácido cítrico en un biorreactor, mediante el cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 567 en pulpa de manzana como sustrato sólido (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014).

Otros antioxidantes son producidos de manera artificial como: el hidroxibutilanisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), terbutil hidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG), usados principalmente en la industria cosmética y alimentaria para evitar la oxidación de lípidos (Li, Fabiano-Tixier, & Chemat, 2014), pese a esto, el uso de

BHA y el BHT ha sido restringido a normas legislativas por dudas sobre sus efectos tóxicos y carcinogénicos (Gülçin, 2012).

1.2.5. Estrés antioxidativo

De igual forma, se cree que un sobreconsumo de suplementos antioxidantes sintéticos pueden generar un estado denominado “estrés antioxidativo” que inhibe la oxidación, resultado perjudicial para el organismo por lo que se recomienda ingerir antioxidantes a través de fuentes alimenticias como frutas y vegetales, ya que contienen una mezcla compleja de antioxidantes, y otros macro y micro nutrientes beneficiosos (García Trianal, Saldaña Bernabeu, & Saldaña García, 2012).

1.2.6. Técnicas de medición de la actividad antioxidante

Considerando el creciente interés en el estudio de los antioxidantes, hoy en día existen varios métodos para determinar su actividad en diferentes extractos. Estos métodos pueden clasificarse en ensayos químicos, bioquímicos o instrumentales (Mamta et al., 2014).

1.2.6.1. Ensayos químicos

1.2.6.1.1. Método CARO (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno)

Es un ensayo que mide la capacidad de un compuesto de atrapar radicales peróxilo generados por el AAPH [2,20-Azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro], iniciador de radicales libres. Los radicales peróxilo reaccionan con una sonda fluorescente que disminuye su fluorescencia a medida que avanza la reacción. Al adicionarse el antioxidante, se produce una señal de fluorescencia más estable en donde el descenso

de la fluorescencia permite medir la capacidad antioxidante (Zapata, Piedrahita, & Rojano, 2014).

1.2.6.1.2. Método DPPH (Difenil Picril Hidrazilo)

Utiliza el radical libre orgánico más estable, el DPPH, que exhibe una coloración violeta fuerte. La actividad antioxidante del DPPH se lleva a cabo en un medio orgánico como etanol o metanol que, al reaccionar con el antioxidante de la muestra, cambia de color violeta a amarillo, midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis a 517 nm (Gülçin, 2012). Los resultados se expresan como IC₅₀, la cual revela la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH (Londoño Londoño, 2012). Una IC₅₀ inferior señala una mayor eficacia de eliminación de radicales libres (Gülçin, 2012).

1.2.6.1.3. Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

Este método se basa en la oxidación de ABTS con persulfato de potasio para convertirse en el radical libre ABTS⁺, el cual, da una coloración azul a la solución. Los fenoles, tioles o vitamina C presentes en la muestra eliminan el radical libre ABTS⁺ y lo convierten en su forma neutra incolora que se mide espectrofotométricamente. El ABTS absorbe una longitud de onda de 734 nm (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014). Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox o TEAC (por sus siglas en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Londoño Londoño, 2012). Además, ABTS⁺ es soluble en solventes acuosos como orgánicos, por lo que se puede medir su capacidad antioxidante tanto en extractos hidrofílicos como en lipofílicos (Gülçin, 2012).

1.2.6.1.4. Método FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro)

Se fundamenta en la capacidad de los antioxidantes de reducir el ion férrico al estado ferroso formando un complejo coloreado con el compuesto 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ). Este método, al contrario de los métodos DPPH y ABTS que neutralizan radicales libres, FRAP mide la capacidad reductora por transferencia de electrones (Mercado-Mercado, de la Rosa Carrillo, Wall-Medrano, López Díaz, & Álvarez-Parrilla, 2013). Los valores de FRAP se obtienen comparando el cambio de absorbancia a 593 nm en la mezcla de reacción con aquellos iones ferrosos de concentración conocida (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014).

1.2.6.2. Ensayos biológicos

1.2.6.2.1. Método SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico)

Determina la peroxidación lipídica en la muestra. El ensayo mide la reacción entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA) generado por la oxidación de lípidos en la que se forma un producto de color rosa que se mide a 532-535 nm en el espectrofotómetro Uv-vis (Londoño Londoño, 2012).

1.2.6.2.2. Método FOX (Oxidación Ferrosa Naranja de Xilenol)

El hidroperóxido, un oxidante lipídico, puede determinarse por su capacidad de oxidar el ion ferroso (Fe^{2+}) a ion férrico (Fe^{3+}). El ion férrico forma un complejo con el reactivo naranja de xilenol que resulta en una coloración púrpura-azulada, la cual se mide a 560 nm (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014).

1.2.6.2.3. Eliminación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Este ensayo emplea la peroxidasa de rábano picante y el peróxido de hidrógeno para oxidar la escopoletina (cumarina) en un medio no fluorescente. En presencia de compuestos descomponedores de H₂O₂, se inhibe la oxidación de la escopoletina. La reacción de descomposición se monitorea en un fluorómetro (Gülçin, 2012).

1.2.6.3. Técnica instrumental

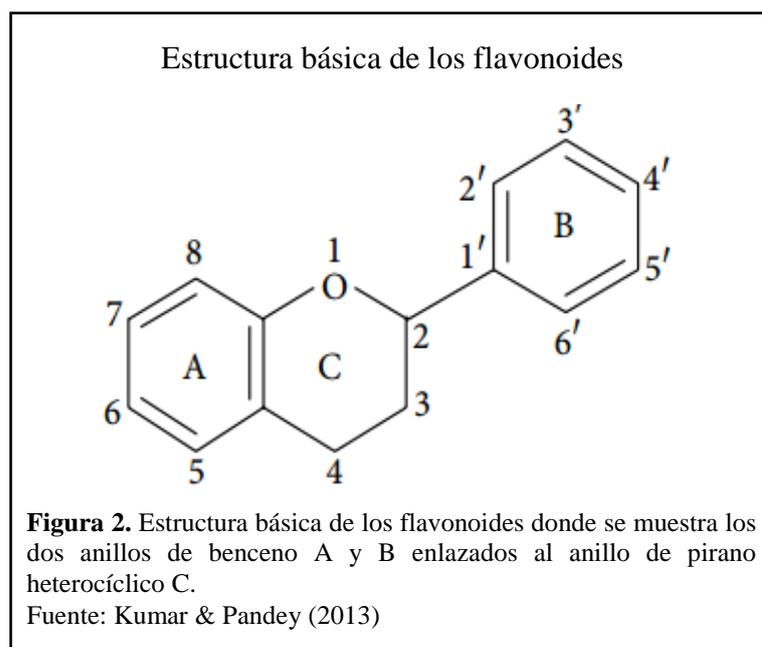
Recientemente, Analytik Jena UK desarrolló un equipo llamado PHOTOCHEM que está siendo usado para medir la actividad antioxidante de sistemas solubles tanto en agua como en lípidos. Se fundamenta en la fotoquimioluminescencia con detección luminométrica (Mamta, Misra, Singh Dhillon, Kaur Brar, & Verma, 2014). Entre sus principales ventajas se encuentran: tiempos de medición en tres minutos, alta sensibilidad, kits de uso estandarizados y manejo sencillo (AnalytikJena, 2016).

1.3. Flavonoides

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de polifenoles distribuidos en el reino vegetal, caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano y localizados en las plantas vasculares como metabolitos secundarios en forma de glucósidos (Cartaya & Reynaldo, 2001). Comprenden más de 8000 compuestos diferentes descritos en literatura (Cui, y otros, 2016), siendo responsables de la pigmentación de flores y frutos, defensa contra el ataque de plagas, y su consumo está vinculado con numerosos beneficios para la salud (Keller, 2009).

1.3.1. Estructura química

Su estructura química está basada en un esqueleto de 15 carbonos que consta de dos anillos de benceno (A y B) que se enlazan mediante un anillo de pirano heterocíclico (C), tal y como se muestra en la Figura 2. (Kumar & Pandey, 2013).

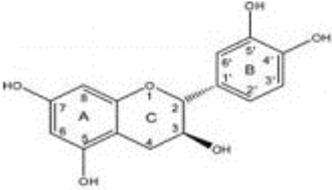
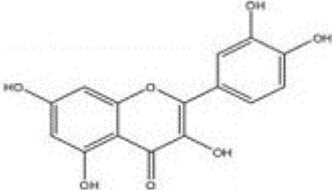
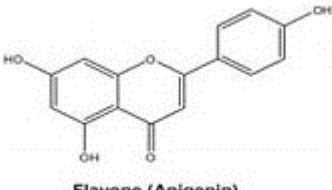
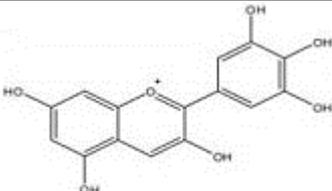


1.3.2. Clasificación de los flavonoides

Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón (2002) mencionan que esta estructura básica ($C_6-C_3-C_6$) permite múltiples patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En la Tabla 2., se detalla la clasificación de los flavonoides según sus características estructurales.

Tabla 2.

Clasificación estructural de los flavonoides.

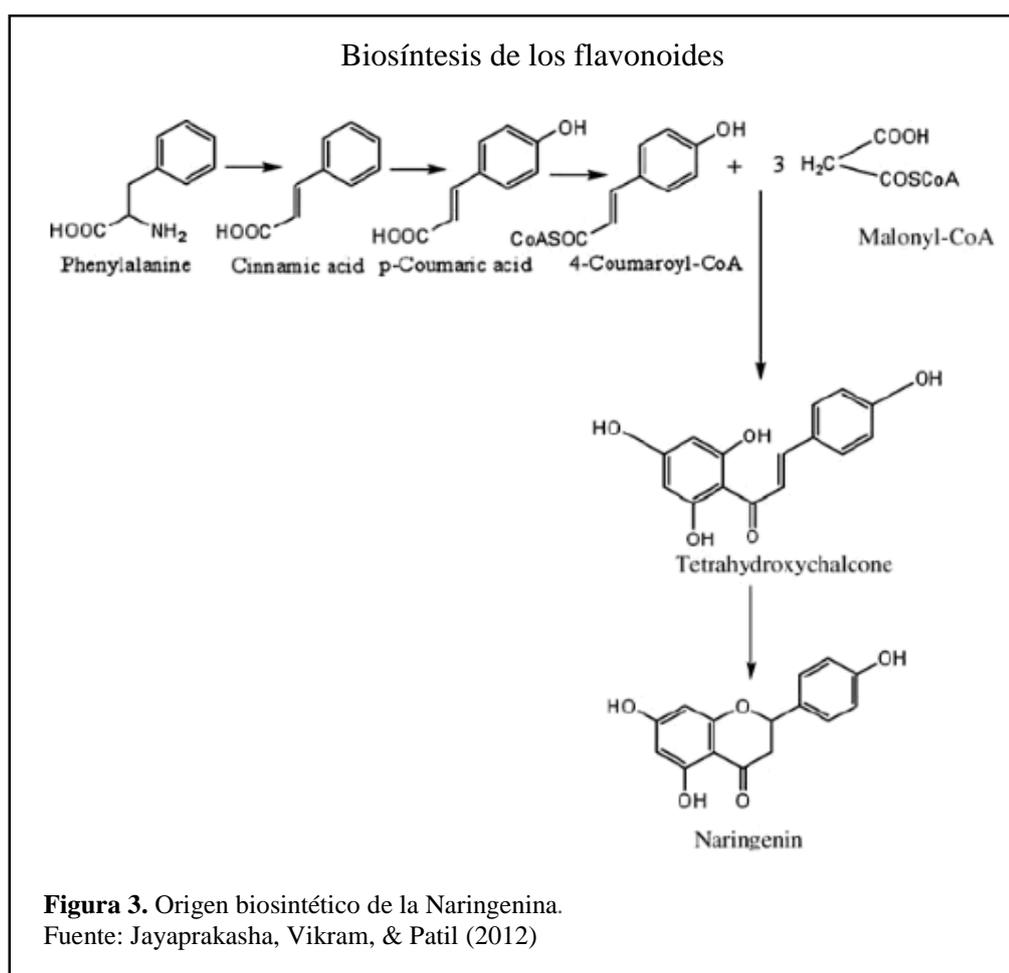
Clase	Descripción	Estructura
Flavanos	Presenta un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	 <p data-bbox="1118 636 1294 663">Flavanol (Catechin)</p>
Flavonoles	Con un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	 <p data-bbox="1118 922 1294 949">Flavonol (Quercetin)</p>
Flavonas	Contiene un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C. No posee el grupo hidroxilo en la posición C3.	 <p data-bbox="1118 1184 1294 1211">Flavone (Apigenin)</p>
Antocianidinas	Presentan un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Además tienen un grupo –OH en la posición C3.	 <p data-bbox="1107 1460 1353 1487">Anthocyanidin (Delphinidin)</p>

Nota: Elaborado por: el autor (2017). Fuente: Martínez Flores et al. (2002).

1.3.3. Origen biosintético

Las plantas sintetizan flavonoides mediante la producción de fenilalanina y tirosina, a través de la vía de los fenilpropanoides, en donde la fenilalanina es desaminada a ácido cinámico, el cual es oxidado para formar ácido 4-cumárico. A continuación, una reacción catalizada por chalcona sintetasa con ácido 4-cumárico, empleando

Coenzima A (CoA) y malonil-CoA como sustrato forman “chalconas”. Las chalconas son consideradas precursoras de los diferentes tipos de flavonoides (Peñarrieta, Tejada, Mollinedo, Vila, & Bravo , 2014). En la Figura 3. se observa la biosíntesis de la naringenina, un tipo de flavonoide.



1.3.4. Actividad antioxidante

1.3.4.1. Actividad antioxidante en especies vegetales

En el trabajo de Gould & Lister (2006) se explica el papel que cumplen estos metabolitos en el desarrollo de las plantas, tales como: defensa contra el ataque de patógenos, camuflaje ante herbívoros, protección contra la radiación UV y el calor, eliminación de radicales libres, tolerancia a altos niveles de metales en el suelo, señal

de atracción de agentes polinizadores por colores brillantes, desarrollo de semillas, regulación de auxinas, y simbiosis entre raíces y microorganismos. Además, los avances en biología molecular junto con el conocimiento de la biosíntesis de flavonoides han permitido el desarrollo de plantas mutantes con características de interés para el ser humano.

1.3.4.2. Actividad terapéutica en el ser humano

Estudios sobre la actividad terapéutica de los flavonoides han demostrado su actividad antitumoral, antiinflamatoria, antialérgica, antiviral (Cui, y otros, 2016), así como también adyuvante en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, envejecimiento y diabetes (Unnikrishnan, Veerapur, Nayak, Mudgal, & Mathew, 2013). Investigaciones de Linus Pauling Institute (2016) también hacen referencia a la prevención de enfermedades neurodegenerativas, disfunción endotelial y la inhibición de ciertos tipos de cáncer en modelos animales.

La quercetina por ejemplo actúa como antihistamínico, ya que inhibe la liberación de histamina de las células, y junto con su poder antiinflamatorio explicarían su efecto terapéutico contra el asma y alergias. También se ha demostrado que la quercetina evita la oxidación de las grasas manteniendo las arterias limpias y despejadas (Carper, 2008).

El canferol por su parte, puede ser usado para tratar la osteoporosis debido a que estimula la actividad osteoblástica; además, inhibe agentes carcinogénicos del humo del cigarrillo gracias a su poder antioxidante (Chaudhary, Rani, Raj, Srivastava, & Dantu, 2012). Otros estudios sugieren que, el canferol regula la expresión del gen p53 conduciendo a una apoptosis de células cancerígenas del ovario, convirtiéndose así, en

un agente promisorio para la prevención y tratamiento del cáncer ginecológico (Kunnumakkara, 2015).

Asimismo, estudios sobre la 3-O-galactósido de quercetina, comúnmente conocida como hiperósido, muestran beneficios terapéuticos contra complicaciones de la diabetes y aterosclerosis, ya que suprime los procesos inflamatorios vasculares inducidos por altos niveles de glucosa (Ku, Kwak, Kwon, & Bae, 2014). Además, Zhang, y otros (2014) señalan el uso potencial del hiperósido en tratamientos de osteosarcoma, debido a que inhibe la proliferación de células cancerígenas.

La rutina, también conocida como vitamina P ha exhibido efectos gastroprotectores, hepatoprotectores y antidiabéticos (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl, 2014), además de reducir la presión arterial y niveles de lípidos en la sangre (Repo-Carrasco-Valencia, 2017).

1.3.5. Técnicas de cuantificación e identificación de flavonoides

1.3.5.1. Espectrofotometría Ultravioleta-visible (UV-Vis)

La determinación de flavonoides totales por espectrofotometría es un método usado para definir la concentración de flavonoides en muestras, basándose en la absorción UV. Los espectros UV, presentan bandas particulares debido a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos, por lo que, la posición de las bandas definirá el tipo de flavonoide en una longitud de onda asociada (Martínez M, 2005). Uno de los ensayos para medir el contenido de flavonoides totales es el colorimétrico, usando cloruro de aluminio en las muestras a una absorbancia de 510 nm (Charles, 2013).

1.3.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

HPLC ha sido una herramienta importante de separación de flavonoides en las últimas cuatro décadas. El proceso inicia conociendo la solubilidad de un flavonoide e interacción con la fase móvil. Luego se realiza el pretratamiento de las muestras para la extracción de los flavonoides, lo que puede implicar la liofilización, homogeneización, centrifugación y/o filtración de las muestras. Después, se procede a la lectura de las muestras en el equipo, donde se da la separación de analitos en la fase estacionaria gracias al arrastre de la fase móvil. Finalmente, se identifican las moléculas mediante detectores (Annie Bligh, Ogegbo, & Wang, 2013).

Todos los flavonoides tienen al menos un anillo aromático que absorbe la luz UV, por lo que generalmente el detector UV-Vis o arreglo de fotodiodos son los preferidos para estos análisis, sin embargo, el detector de espectrometría de masas combina alta resolución con sensibilidad, por lo que proporciona datos estructurales exactos, siendo una herramienta invaluable para identificar diferentes compuestos (Jayaprakasha, Vikram, & Patil, 2012).

1.3.5.3. Cromatografía de capa fina (TLC)

La TLC, es una técnica rápida y sencilla para separar moléculas de flavonoides. La técnica consiste en una fase estacionaria que puede ser de silicagel y un disolvente (fase móvil) acorde a la naturaleza de los flavonoides, las muestras se siembran en la placa, la placa es colocada en una cámara cromatográfica con el disolvente y se espera a que las moléculas se separen por arrastre de la fase móvil. Luego se miden los diferentes R_f , es decir, la posición de un compuesto sobre una placa en fracción decimal, que en conjunto con luz UV puede dar una aproximación del flavonoide que está presente en una muestra (Jayaprakasha, Vikram, & Patil, 2012).

1.3.5.4. Cromatografía de gases

Es una de las técnicas más versátiles, con gran uso en la determinación de compuestos orgánicos. La muestra es inyectada en un puerto caliente donde es volatilizada. Luego, es llevada por una fase móvil a través de una columna capilar que se encuentra dentro de un horno con temperatura elevada. Los componentes según su peso molecular, se separarán en un tiempo de retención determinado dentro de la columna. Finalmente, la identificación de las moléculas se lleva a cabo por un detector como el de espectrometría de masas, el cual es más sensible y selectivo permitiendo identificar y cuantificar mezclas sumamente complejas de trazas de sustancias (Gary, 2009).

1.3.5.4.1. Espectrometría de masas

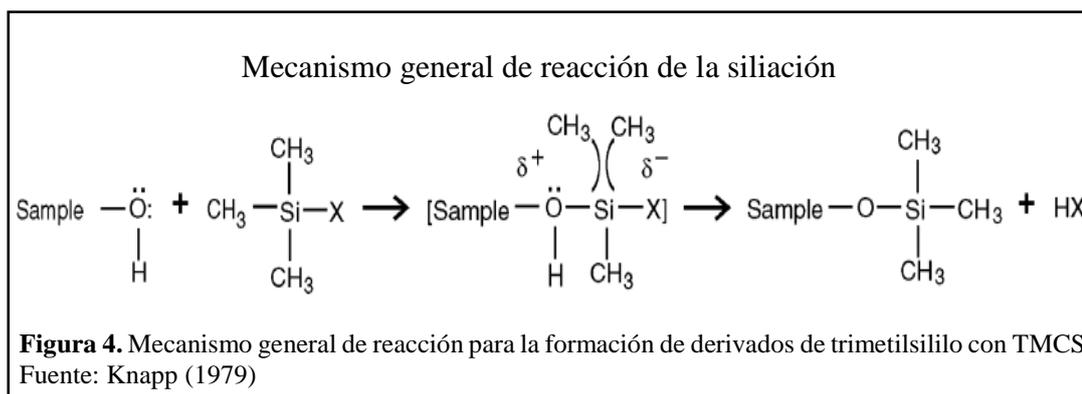
Es una técnica para determinar las masas moleculares y estructuras químicas de sustancias de interés, la cual se basa en la formación de iones a partir de moléculas neutras para su posterior análisis. El espectro de masas se representa por X-Y, donde el eje X indica la relación masa/número de carga (m/z) de los fragmentos iónicos producidos, mientras que el eje Y representa su abundancia relativa, por lo que se facilita la identificación de un compuesto, en especial, si se dispone de estándares o de bases de datos de espectros de masas (Fuentes Arderiu, Castiñeras Lacambra , & Queraltó Compañó, 1997).

Los componentes primordiales de un espectrómetro de masas son los siguientes: un sistema: de introducción de la muestra de estudio, de producción de iones, de separación de los iones formados, de detección y amplificación de los iones producidos y de un tratamiento de los datos recogidos (Fuentes Arderiu, Castiñeras Lacambra , & Queraltó Compañó, 1997).

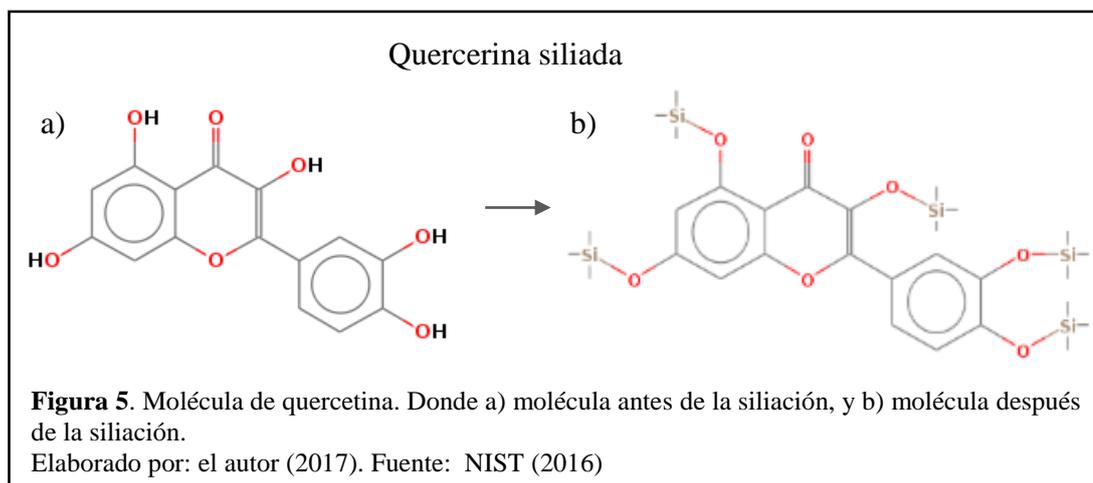
Actualmente, es el detector más potente de cromatografía ya que detecta concentraciones bajas de analito, proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa y distingue entre sustancias que tienen el mismo tiempo de retención (Harris, 2007).

1.3.5.4.2. Derivatización de flavonoides

Sin embargo, su uso en la identificación de flavonoides ha sido limitado en comparación a la técnica HPLC debido a que la mayoría de flavonoides no son volátiles, por tal razón, para que éstas moléculas puedan ser analizadas deben ser derivatizadas a analitos volatilizables. En este sentido, la siliación es un procedimiento idóneo para el análisis de compuestos no volátiles como termolábiles, ya que la adición de silicios a las moléculas de estudio, permite que sean más volubles, menos polares y más termotolerantes (Bravo & Mateos, 2008). El mecanismo de la siliación, es una reacción de sustitución nucleofílica, en la que un hidrógeno activo en los grupos $-OH$, $-COOH$, $=NH$, $-NH_2$ o $-SH$ es reemplazado por un grupo trimetilsililo $[-Si(CH_3)_3]$. Para que se produzca esta reacción es necesario el uso de reactivos de derivatización (Orata, 2012) siendo el N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y el trimetilclorosilano (TMCS), los reactivos de preferencia para la trimetilsiliación de fenoles, ya que son más volátiles que otros agentes derivatizadores y causan menos interferencias cromatográficas (Sigma-Aldrich, 1997). La Figura 4. muestra el mecanismo general de reacción de la siliación.



En la Figura 5. se puede observar a la molécula de quercetina, un tipo de flavonoide, antes y después de la siliación.



Una vez siliadas las moléculas, los flavonoides son inyectados en una columna capilar no polar en modo split, es decir, en un modo en el que la muestra inyectada es dividida en varias fracciones; finalmente las moléculas son separadas con un programa lineal de temperatura hasta los 320°C por 30 a 90 minutos. El detector de espectrometría de masas con un electrospray de ionización positivo y una temperatura de 250°C es un sistema ideal para la detección de flavonoides, ya que permite identificar los iones moleculares de las moléculas de interés (Bravo & Mateos, 2008).

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Obtención del material vegetal

Las hojas de *Ilex guayusa* fueron proporcionadas por la Fundación Chankuap: Recursos Para el Futuro, procedentes de agricultura ecológica y comercio justo por las comunidades Shuar y Achuar de la provincia de Morona Santiago.

2.2. Elaboración de extractos

El método usado para realizar los extractos fluidos fue el de percolación descrito por Miranda & Cuéllar (2001); 4 de *Ilex guayusa* usando como solventes diversas concentraciones hidroalcohólicas al 20%, 50% y 80%, y 1 de té verde al 50% que actuó como referente natural de comparación en el estudio. Los extractos se dejaron reposar 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se filtraron y concentraron hasta alcanzar una concentración de 1 g/mL.

2.3. Cuantificación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)

Se empleó la metodología descrita por Singleton & Rossi (1965), en la que se prepara el reactivo Folin-Ciocalteu disolviendo 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolibdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua destilada; la solución se llevó a reflujo por 2 horas y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Para la curva de calibración, se elaboraron 10 mL de soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones (0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg y 2 mg por mL de etanol al 96%).

Posterior a esto, se prepararon las muestras de *Ilex guayusa* y la de té verde para su lectura en el espectrofotómetro, para esto se tomaron 6 frascos ámbar de 5 mL. En el primer frasco se preparó el blanco tomando 4 mL de agua destilada y 0,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. En los 5 frascos restantes, se colocaron 0,05 mL de ácido gálico en las diferentes concentraciones, a cada uno se le añadió 3,95 mL de agua destilada y 0,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se esperó 2 minutos y se agregó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20%. Se dejó reposar en un lugar oscuro y a temperatura ambiente por 2 horas. Finalizado el tiempo de reacción, se encendió el espectrofotómetro (Jasco V-730) con alcohol al 96% y se leyeron las muestras de la curva de calibración a una absorbancia de 765 nm.

Por su parte, los extractos de *Ilex guayusa* del 20%, 50% y 80%, así como el extracto de té verde al 50%, se disolvieron en etanol al 96% en una relación 1:10, y se efectuó el procedimiento anterior, sustituyendo el ácido gálico por las muestras de *Ilex guayusa* y té verde.

2.4. Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides fueron cuantificados siguiendo la metodología de Lamaison & Carnat (1991). Para la curva de calibración, se partió de una solución madre de 3-O-galactósido de quercetina (hiperósido) (1 mg/mL) como estándar de referencia de flavonoides, a partir de la cual, se realizaron diluciones de 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L y 350 μ L, completadas con etanol al 96% hasta alcanzar un volumen de 500 μ L por cada dilución.

Después, se prepararon 5 muestras a diferentes concentraciones de hiperósido, para lo cual, se tomaron 5 frascos ámbar de 5 mL. El blanco fue preparado en el primer frasco, añadiendo 2,8 mL de agua destilada, 2 mL de etanol al 95%, 0,1 mL de acetato de

potasio 1 M y 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10%. En los 4 frascos faltantes, se adicionó a cada uno 0,5 mL de las distintas diluciones de hiperósido, más 1,5 mL de etanol al 95% y la misma cantidad de agua destilada (2 mL), acetato de potasio 1 M (0,1 mL) y cloruro de aluminio 10% (0,1 mL), que se incorporó en el blanco, completando un volumen final de 5 mL por muestra. Estas muestras se dejaron en reposo por 30 minutos y se midieron en el espectrofotómetro (Jasco V-730) a 415 nm. El equipo fue previamente encerado con alcohol al 96%.

El mismo procedimiento fue realizado reemplazando las muestras de hiperósido que se colocaron en una cantidad de 0,5 mL, por los extractos de *Ilex guayusa* y el de té verde, que anteriormente se disolvieron en etanol al 96% en una relación 1:10.

Mediante las absorbancias obtenidas del hiperósido y las concentraciones de las diluciones, se generó la curva de calibración. Los flavonoides totales se calcularon a través de la ecuación generada por regresión lineal de la curva de calibración.

2.5. Valoración de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se preparó una solución 0,5 mM de DPPH con etanol al 96% así como también una solución de ácido ascórbico a 1000 ppm, que funcionó como un control positivo sintético captador de radicales libres. Los extractos de *Ilex guayusa* fueron diluidos en una concentración 1:10, mientras que el control positivo natural de té verde fue diluido en una concentración 0,1:10.

Para las lecturas del antirradical DPPH en el espectrofotómetro, se prepararon 7 muestras, tomando 7 frascos ámbar por cada uno de los extractos de *Ilex guayusa*, té verde, y para la solución de ácido ascórbico. El primer frasco correspondió al blanco

(sin muestra), en los siguientes frascos se colocó diluciones de los extractos y ácido ascórbico en volúmenes de: 5 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL y 200 µL a los cuales se les adicionó 2,8 mL de DPPH y se completaron con etanol al 96% obteniendo un volumen final de 3 mL.

Las muestras se llevaron a un agitador a 200 rpm durante 30 minutos y a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, las muestras fueron colocadas en celdas de vidrio y medidas en el espectrofotómetro (Jasco V-730) a una longitud de onda de 517 nm. Previo a esto, el equipo fue encerrado con etanol al 96%.

Para valorar la actividad captadora de radicales libres se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Nota: Elaborado por: el autor (2017). Fuente: (Tuquinga Usca, 2013)

Dónde: Ab, representa la absorbancia de DPPH sin el extracto, es decir, el blanco; mientras que Aa, representa la absorbancia de DPPH con el extracto. La actividad antioxidante de los extractos se expresa como la concentración a la cual el porcentaje de inhibición del DPPH es 50% (IC₅₀).

Para determinar la IC₅₀, se construyó una gráfica de porcentaje de inhibición versus la concentración de los extractos, mediante regresiones lineales.

2.6. Identificación de flavonoides mediante TLC

Se inició preparando la fase móvil con acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico y agua destilada, en proporciones 100:25:10:10:11 respectivamente.

Para cada uno de los estándares que se especifican a continuación: quercetina, canferol, rutina, naringina, hesperidina, diosmina, mircetina, morina, hidroxiflavona, baicaleina,

luteolina, naringenina, hiperósido, crisina, equigalocatequina, daidzaina, apigenina, genisteina y silibina, se elaboraron soluciones añadiendo 1 mg del estándar en 1 mL de metanol para su posterior siembre en las placas de TLC. Por su lado, la muestra de *Ilex guayusa* se preparó añadiendo 200 µL de extracto de *Ilex guayusa* al 50% en 800 µL de metanol.

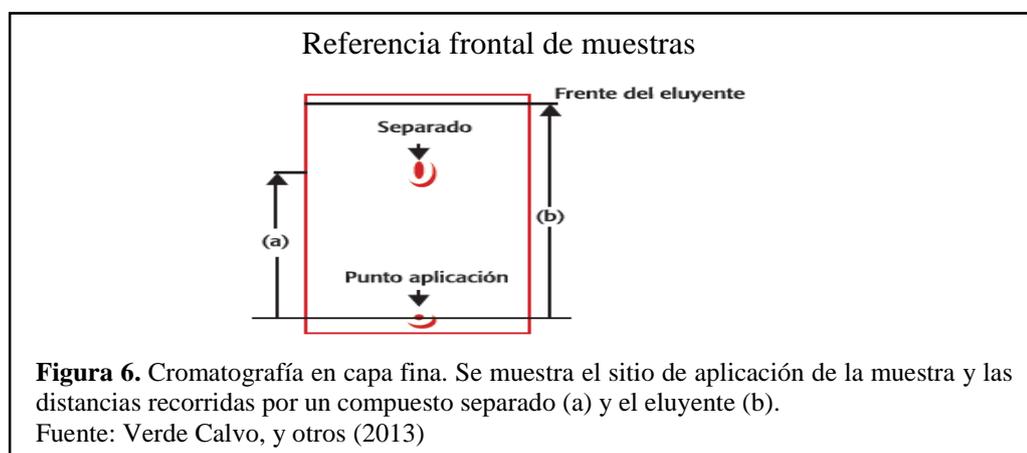
Seguidamente, se procedió a sembrar 15 µL de la muestra de *Ilex guayusa* y 15 µL de 3-4 estándares de flavonoides por cada placa de silicagel (marca Sigma-Aldrich de 10 x 10 cm con un indicador de fluorescencia de 245 nm). Una vez sembradas las muestras, se colocaron en una cámara cromatográfica con 25 mL de fase móvil. Se dejaron en reposo hasta que la fase móvil se desplace hasta 1 cm antes del final de la placa de silicagel, se retiró cada placa de la cámara y se esperó a que se sequen completamente.

Una vez secas las placas, se llevaron a la lámpara de luz UV marca CAMAG modelo Cabinet 4 para identificar los componentes separados por su valor Rf (referencia frontal) que se calcula con la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia (cm) que recorre cada compuesto separado desde el punto de aplicación (a)}}{\text{Distancia (cm) que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente (b)}}$$

Nota: Elaborado por: el autor (2017). Fuente: (Verde Calvo, y otros, 2013).

En la Figura 6. se indica el esquema general de la TLC.



2.7. Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)

En este análisis se trabajó con los estándares de flavonoides: canferol, quercetina, rutina, naringenina, mircetina, diosmina, y hesperidina. Estos fueron preparados disolviendo 1 mg del estándar en 1 mL de metanol. Además, se elaboró un extracto de *Ilex guayusa* al 50% con metanol grado HPLC. Las muestras fueron tomadas con una jeringa, filtradas por membranas PDVF de 0,45 μm y colocadas en tubos de 2 mL para HPLC.

El análisis se realizó en el equipo HPLC-DAD marca Waters con una bomba binaria modelo 1525, un detector de matriz de fotodiodos modelo 2998 de la misma marca y una columna SB-C18 Zorbax de 5 μm con dimensiones de 4,6 x 150 mm. Como fase móvil A se utilizó: agua y ácido fórmico en proporciones 95:5; mientras que la fase B correspondió a metanol grado HPLC. Ambas fases fueron filtradas por membranas de 0,45 μm y desgasificadas por 15 minutos en el ultrasonido antes de su uso en el equipo.

Finalmente, el equipo fue configurado con el software Empower a un flujo de solvente de 1 mL y un gradiente de: 0-25 minutos: 35% B y 65% A, 25-35 minutos: 50% B y 50% A, 35-40 minutos: 80% B y 20% A, 40-45 minutos: 90% B y 10% A, 50 minutos: 35% B y 65% A. La longitud de onda del análisis fue de 340 nm.

2.8. Identificación de flavonoides por cromatografía de gases acoplado a masas

2.8.1. Preparación de las muestras y derivatización

Para la preparación de las muestras y derivatización, se siguió la siguiente metodología descrita por (Proestos, Boziaris, Nychas, & Komaitis, 2006). Se tomaron 40 mL de metanol al 30% conteniendo BHA (1 g/L), a esto se colocó 0,5 g de muestra seca de

Ilex guayusa y 10 mL de HCl 6 M. La mezcla fue agitada y burbujeada con corriente de nitrógeno durante 60 segundos, sonificada por 15 minutos en el ultrasonido y refluja a 90°C por 2 horas.

Posterior a esto, la mezcla fue extraída 3 veces con acetato de etilo, cada extracción con 10 mL. La capa orgánica fue colectada y reducida a 10 mL por rotavapor a 37°C y centrifugada por 10 minutos. La mezcla fue filtrada en Na₂SO₄ para eliminar trazas de agua.

Para la derivatización, se tomaron 100 µL de la fase orgánica y se evaporó el solvente con corriente de nitrógeno. Después, se agregó 100 µL de BSTFA+ TMCS y se llevó a un baño de agua a 80°C por 45 minutos para el proceso de siliación. Una vez finalizado, se diluyó la muestra con acetato de etilo en una proporción 1:10.

2.8.2. GC-MS

Las muestras siliadas se inyectaron en el equipo GC-MS, mismo que cuenta con un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3900, acoplado a un espectrofotómetro de masas marca Varian, modelo Saturn 2100D ajustado a un voltaje de ionización de 70 eV y un rango de masa (m/z) de 40-650. La columna usada fue FactorFour VF- 5ms de diámetro interior de 30 m x 0,25 mm y de 0,25 micras de espesor de película. El inyector se configuró a una temperatura de 250°C. El split del GC fue activado y regulado a un ratio de 25. El programa de temperatura fue el siguiente: de 70 a 135°C a una velocidad de 10°C/min durante 10 minutos, de 220 a 270°C a una velocidad de 3°C/min durante 10 minutos y de 220 a 270°C a una velocidad de 3°C/min durante 20 minutos. La velocidad de flujo del gas transportador (helio) en la columna fue de 1,9 mL/min. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los

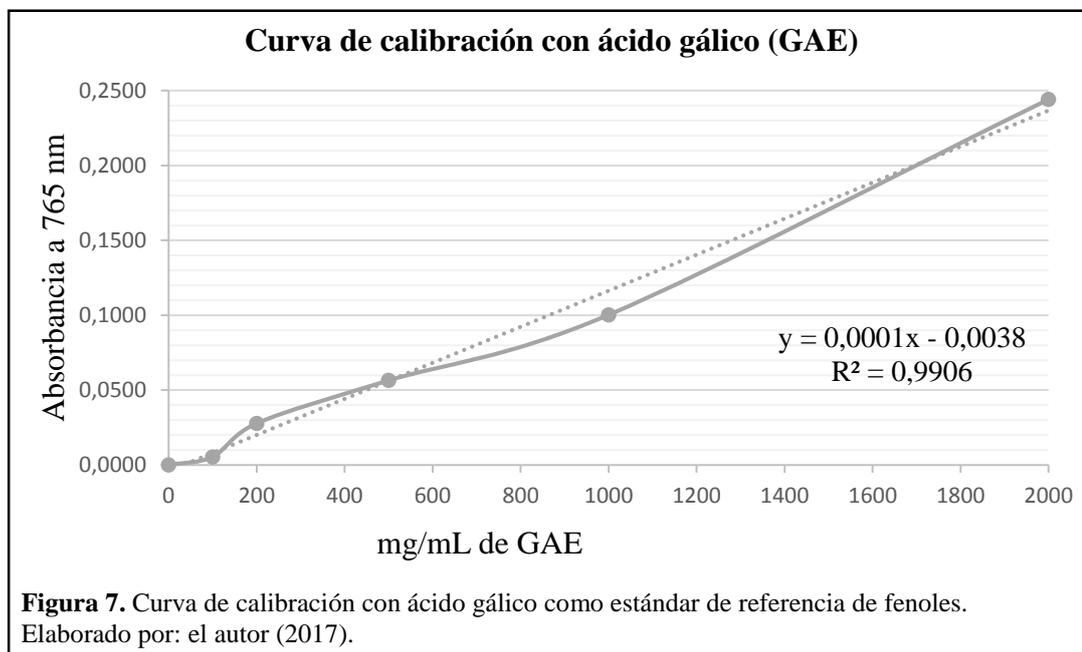
pesos moleculares de los flavonoides siliados, y los iones moleculares obtenidos de los picos del cromatograma resultante.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Cuantificación de fenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)

Para el cálculo de fenoles totales se partió de la curva de calibración del estándar de ácido gálico, que actúa como un estándar de referencia de fenoles. En la Figura 7. se muestra la curva.



Con la curva, se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0,0001x - 0,0038$ a partir de la cual se calculó los mg/mL de fenoles presentes en los extractos, cuyos datos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Fenoles totales en extractos de *Ilex guayusa* y té verde

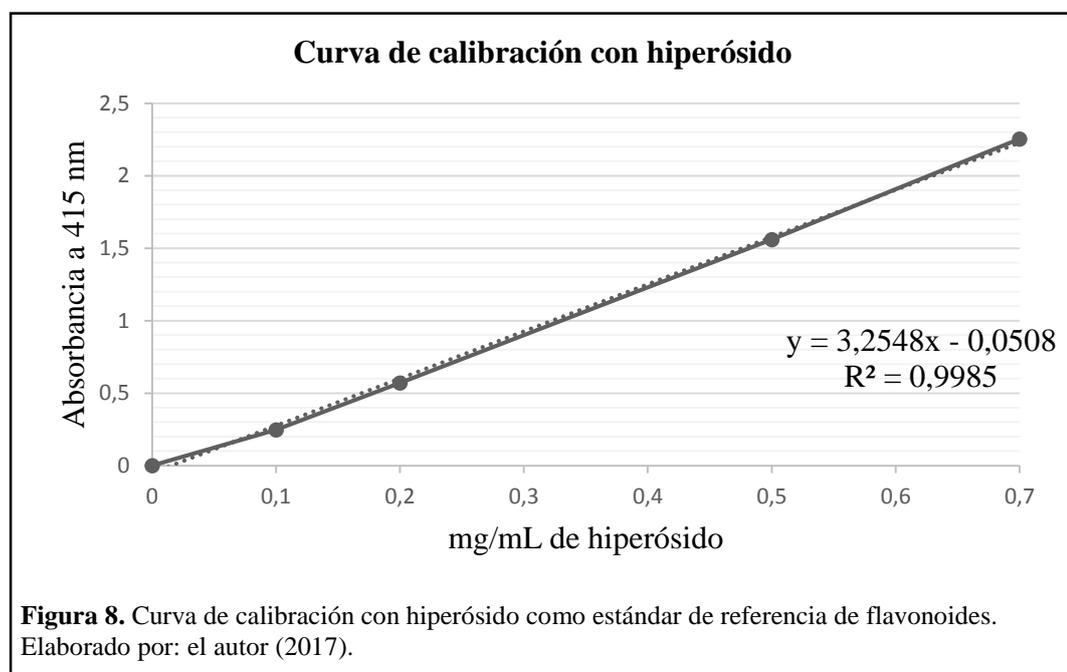
Fenoles totales					
Extracto	Absorbancia a 765 nm			Absorbancia promedio	Concentración mg/mL
Té verde	1,009	1,009	1,010	1,009	50,28
<i>I. guayusa</i> 80%	0,407	0,407	0,408	0,407	20,18
<i>I. guayusa</i> 50%	0,452	0,453	0,453	0,453	22,44
<i>I. guayusa</i> 20%	0,432	0,433	0,434	0,433	21,46

Nota: Elaborado por: el autor (2017).

Estos valores indican que el extracto de *Ilex guayusa* al 50% sustrajo una mayor cantidad de fenoles, 22,44 mg/mL, en comparación a los otros extractos de *Ilex guayusa*. Por su parte, el contenido de fenoles en el té verde es aproximadamente el doble que el de *Ilex guayusa*, con 50,28 mg/mL. Se debe tomar en cuenta también que, el tiempo de almacenamiento, así como la temperatura, disminuyen los niveles de fenoles en muestras (Klimczak, Malecka, Szlachta, & Gliszczynska-Swiglo, 2007). Del mismo modo, en el trabajo de Godoy Alvarez (2016) se señala que la extracción de fenoles es más elevada con la polaridad del solvente, por lo que la extracción con metanol aumenta considerablemente el contenido de fenoles con respecto al etanol.

3.2. Determinación de flavonoides totales

La curva de calibración de los flavonoides, se realizó con el estándar de hiperósido como patrón de referencia, el cual se indica en la Figura 8.



A partir de la ecuación de la recta $y = 3,2548x - 0,0508$ de la curva de calibración, se calculó los mg/mL de flavonoides presentes en los extractos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4.

Flavonoides totales de extractos de *Ilex guayusa* y té verde.

Extracto	Flavonoides totales				Concentración mg/mL
	Absorbancia a 765 nm			Absorbancia promedio	
Té verde	1,6230	1,6514	1,6826	1,6523	4,92
<i>I. guayusa</i> 80%	1,1875	1,3073	1,3672	1,2873	3,80
<i>I. guayusa</i> 50%	2,3130	2,3955	2,4571	2,3885	7,50
<i>I. guayusa</i> 20%	1,8095	1,8140	1,8153	1,8129	5,42

Nota: Elaborado por: el autor (2017).

La tabla revela que el extracto de *Ilex guayusa* al 50% es el que contiene la mayor cantidad de flavonoides, 7,50 mg/mL, sobrepasando al té verde que tan solo posee 4,92 mg/mL. Este resultado es semejante al obtenido por Tuquinga Usca (2013), el cual es de 7,142 mg/g de planta, lo que indica que el consumo de *Ilex guayusa* es más saludable que el té verde gracias a su alto contenido de flavonoides.

3.3. Valoración de la actividad antioxidante por el método DPPH

La valoración de la actividad antioxidante, se obtuvo mediante la relación de la concentración de cada uno de los extractos y ácido ascórbico, junto con el porcentaje de inhibición a través de regresiones lineales. Las curvas obtenidas generaron una ecuación de la recta con la que se calculó los mg/mL de IC₅₀ (ver tablas: 5,6,7,8,9).

Tabla 5.

Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de té verde.

Concentración μL/mL del blanco	Porcentaje de inhibición % I 1	Porcentaje de inhibición % I 2	Porcentaje de inhibición % I 3
0	0	0	0
1,66	5,2547	5,1252	5,9844
3,33	5,5265	4,9888	5,9972
6,66	13,4687	12,7809	13,5991
16,66	32,9948	32,7850	33,3487
33,33	58,3244	58,2027	58,5358
50	76,4784	76,3894	76,5938
66,66	92,0218	92,0097	92,0608
IC₅₀ μL/mL	32,549	32,671	32,401

Nota: El IC₅₀ se calculó mediante la relación de la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición a través de una regresión lineal. Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 6.

Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de *Ilex guayusa* al 80%.

Concentración $\mu\text{L/mL}$ del blanco	Porcentaje de inhibición % I 1	Porcentaje de inhibición % I 2	Porcentaje de inhibición % I 3
0	0	0	0
1,66	5,2495	4,9538	5,0966
3,33	9,1502	9,0004	9,0249
6,66	17,6179	17,4758	17,2389
16,66	41,8448	41,7281	41,7489
33,33	81,0033	81,0040	81,0155
50	89,7780	89,7597	89,7683
IC₅₀ $\mu\text{L/mL}$	23,823	23,863	23,865

Nota: El IC₅₀ se calculó mediante la relación de la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición a través de una regresión lineal. Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 7.

Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de *Ilex guayusa* al 50%.

Concentración mg/mL del blanco	Porcentaje de inhibición % I 1	Porcentaje de inhibición % I 2	Porcentaje de inhibición % I 3
0	0	0	0
1,66	4,1310	4,2418	4,6348
3,33	7,8509	7,5792	7,6504
6,66	16,7489	16,6538	16,7496
16,66	41,6886	41,5109	41,5152
33,33	73,7363	73,6447	73,6949
50	88,2922	88,3000	88,2921
IC₅₀ mg/mL	25,033	25,070	25,040

Nota: El IC₅₀ se calculó mediante la relación de la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición a través de una regresión lineal. Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 8.

Valoración de la actividad antioxidante DPPH del extracto de *Ilex guayusa* al 20%.

Concentración μL/mL del blanco	Porcentaje de inhibición % I 1	Porcentaje de inhibición % I 2	Porcentaje de inhibición % I 3
0	0	0	0
1,66	1,9311	1,9976	2,5910
3,33	3,1902	3,2126	4,3337
6,66	6,8523	6,2244	7,1164
16,66	14,3663	14,2225	15,1655
33,33	30,7611	30,4888	30,9569
50	40,9755	40,7522	41,2112
66,66	59,5297	59,3920	59,6602
IC₅₀ μL/mL	57,238	57,490	57,013

Nota: El IC₅₀ se calculó mediante la relación de la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición a través de una regresión lineal. Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 9.

Valoración de la actividad antioxidante DPPH del ácido ascórbico.

Concentración μL/mL del blanco	Porcentaje de inhibición % I 1	Porcentaje de inhibición % I 2	Porcentaje de inhibición % I 3
0	0	0	0
1,66	0,3298	4,6404	4,6918
6,66	4,9494	7,7355	7,9291
16,66	20,7848	24,5273	24,8792
50	96,0785	96,2639	96,2726
66,66	96,0881	96,2822	96,2979
IC₅₀ μL/mL	31,916	30,951	30,895

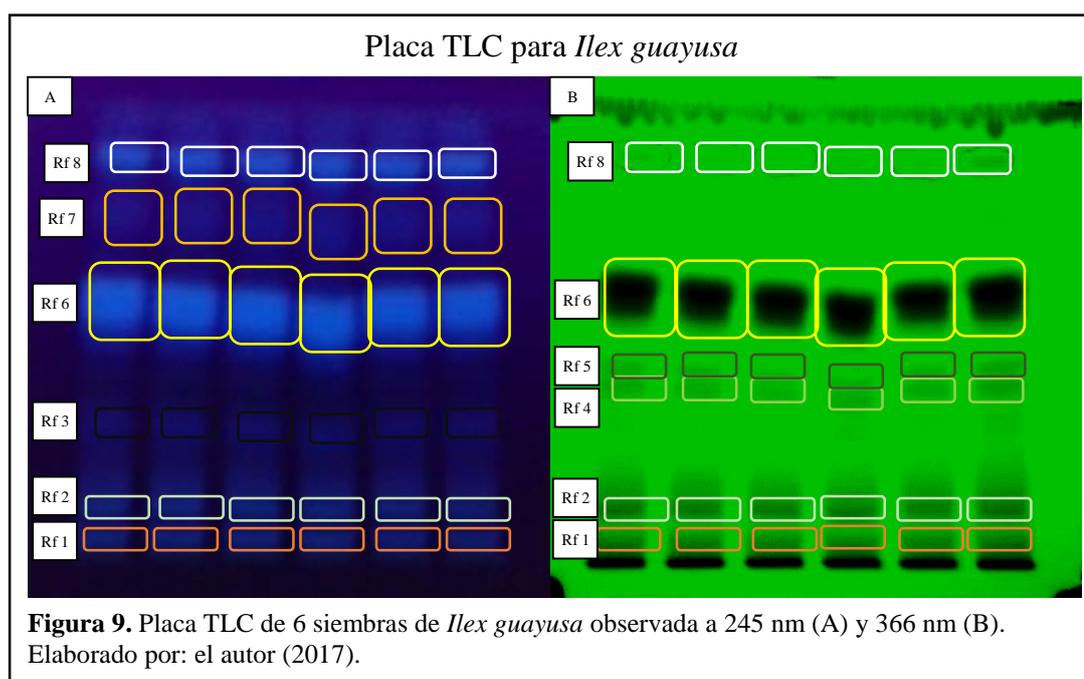
Nota: El IC₅₀ se calculó mediante la relación de la concentración del ácido ascórbico y el porcentaje de inhibición a través de una regresión lineal. Elaborado por: el autor (2017).

Los resultados de DPPH obtenidos, muestran que el extracto de *Ilex guayusa* al 80% es el que presenta mayor actividad captadora de radicales libres, superando al té verde e incluso al ácido ascórbico, con un valor de $\bar{I}C_{50}$ de 23,850 μL/mL; mientras que, el extracto de *Ilex guayusa* al 20% es el que menos actividad antioxidante posee, el cual es menor al té verde y al ácido ascórbico, con un valor de $\bar{I}C_{50}$ de 57,247 μL/mL. Los

datos obtenidos, son similares a los de Matteo, Cossio, & Scalvenzi (2016), en el que, los extractos etanólicos de *Ilex guayusa* resultan en un \bar{IC}_{50} de 17,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que en extractos con acetato de etilo en un \bar{IC}_{50} de 52,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Por otro lado, Burneo Palacios (2009), consiguió un \bar{IC}_{50} de 14,9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con extracto metanólico, debido a que al ser un solvente más polar, captura una mayor cantidad de antioxidantes.

3.4. Identificación de flavonoides mediante TLC

La corrida en la TLC de 6 siembras del extracto de *Ilex guayusa* al 50%, visualizado en la cámara de luz UV a 245 nm y 366 nm, mostró la posible presencia de 8 moléculas de flavonoides, que se observan en la Figura 9.



Los Rf de las moléculas separadas se detallan en la Tabla 10.

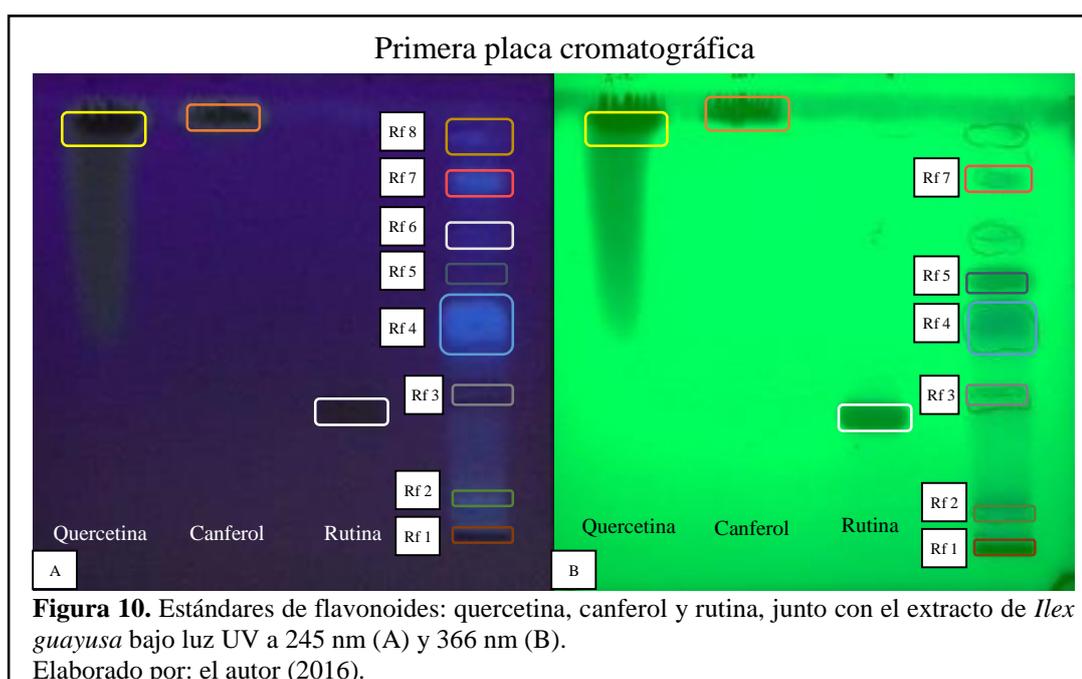
Tabla 10.

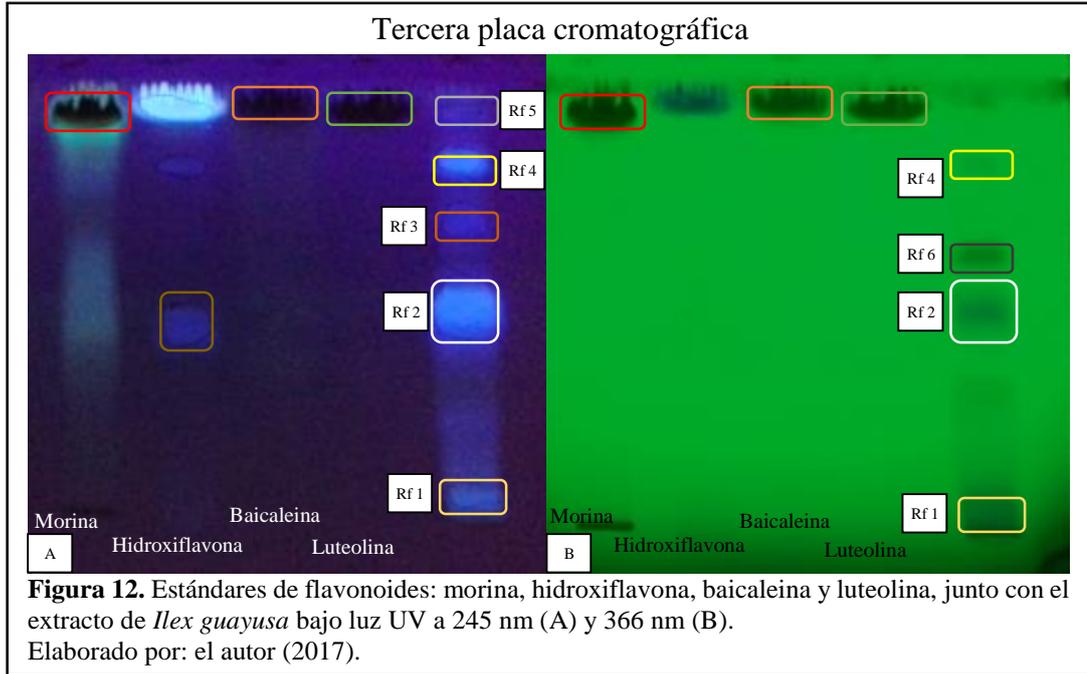
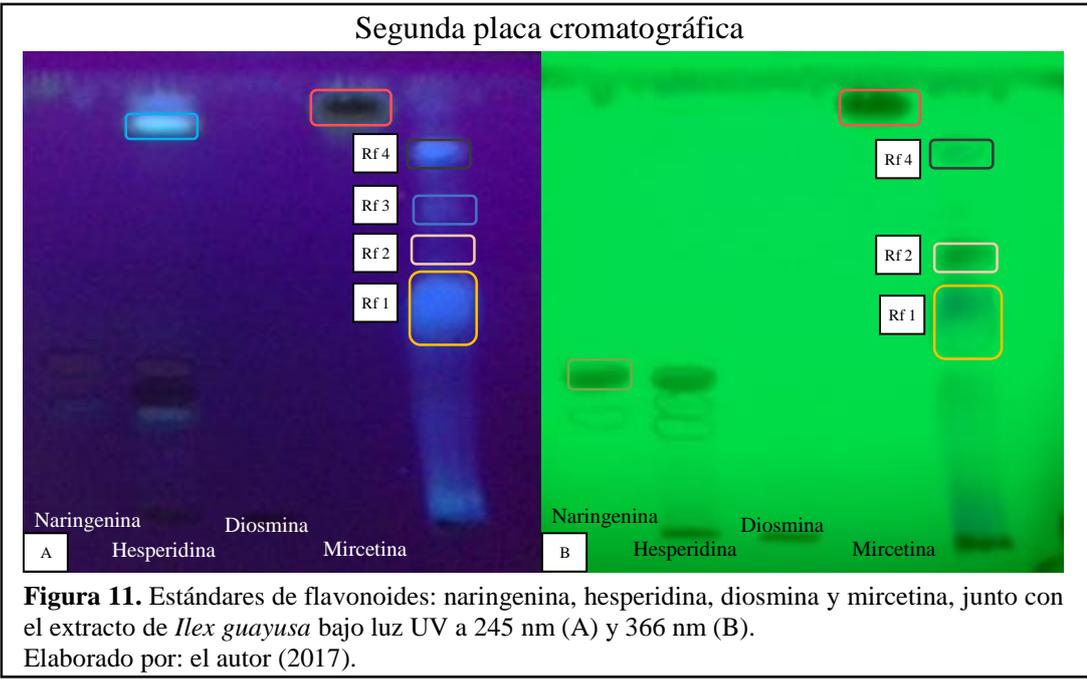
Valores de Rf de las fracciones del extracto de *Ilex guayusa* al 50%.

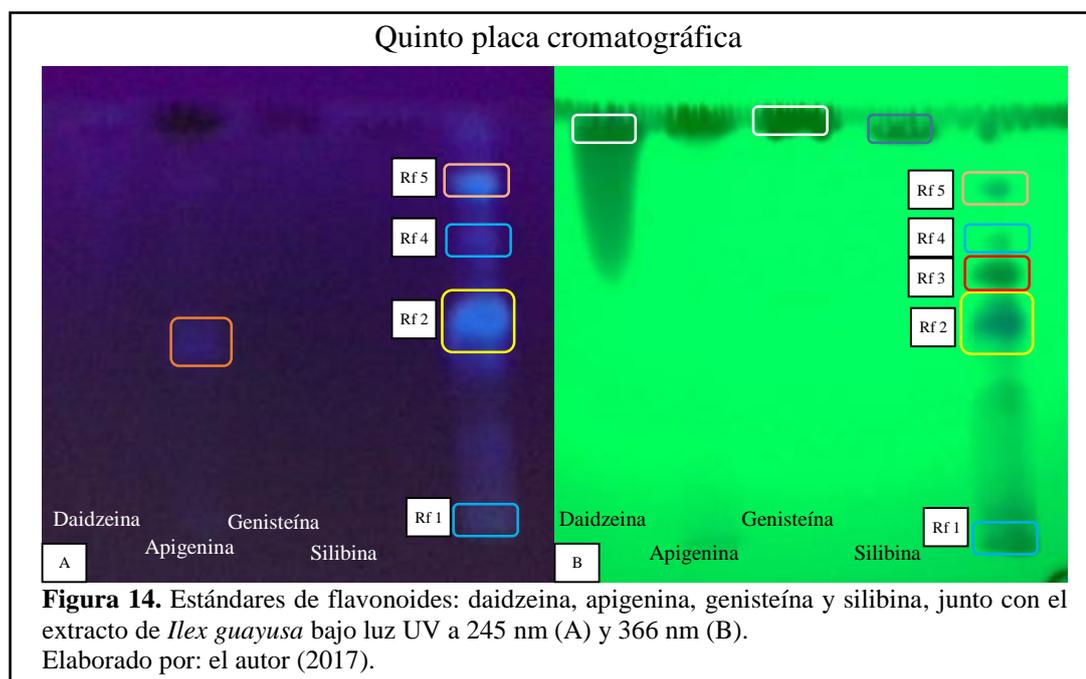
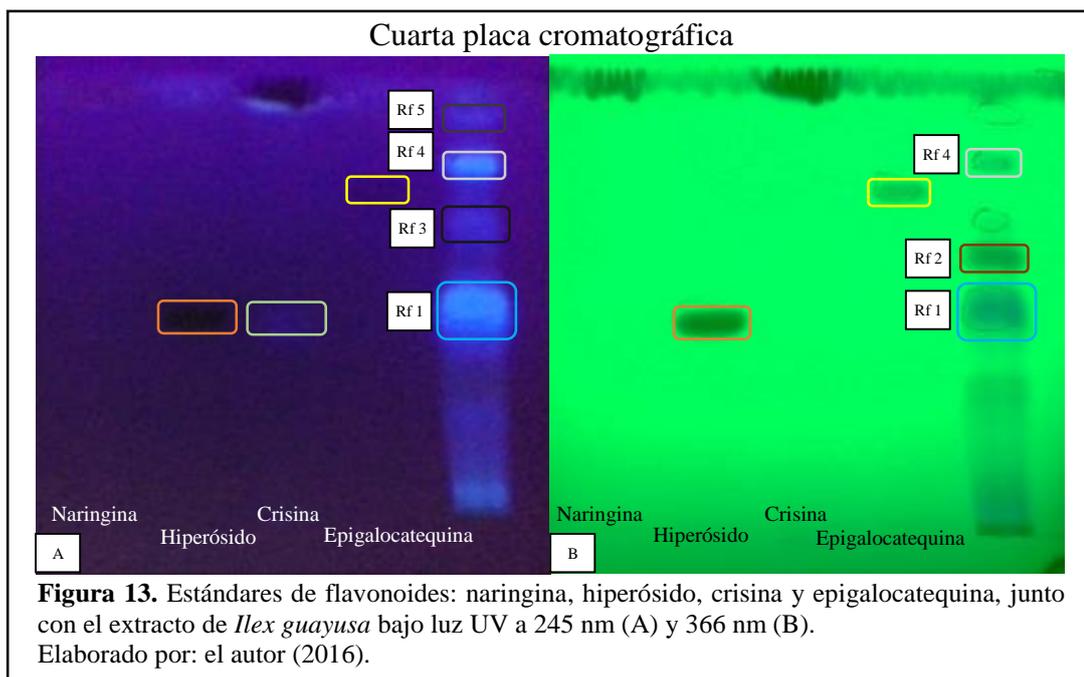
Fracción	Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,08	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 2	0,14	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 3	0,33	Fluorescencia azul	-
Rf 4	0,41	-	Plomo
Rf 5	0,46	-	Plomo
Rf 6	0,61	Fluorescencia azul	Negro
Rf 7	0,80	Fluorescencia azul	-
Rf 8	0,90	Fluorescencia azul	Plomo

Nota: Elaborado por: el autor (2017).

Por su parte, la Figura 10. muestra la placa cromatográfica del extracto de *Ilex guayusa* al 50% junto con los estándares de flavonoides: quercetina, canferol y rutina; la segunda placa (Figura 11.) con los estándares: naringenina, hesperidina, diosmina y mircetina; la tercera placa (Figura 12.) con los estándares: morina, hidroxiflavona, baicaleina y luteolina; la cuarta placa (Figura 13.) con los estándares: naringina, hiperósido, crisina y epigallocatequina; y la quinta placa (Figura 14.) con los estándares: daidzeina, apigenina, genisteína y silibina.







En cada placa se identificaron las moléculas de los estándares con relación a la muestra de *Ilex guayusa*. En la tabla 11, 12, 13, 14 y 15 se muestran los valores de Rf tanto para las fracciones de *Ilex guayusa* como para los estándares de flavonoides. La presencia o no de fluorescencia, así como su color también se registraron en las longitudes de onda de: 245 nm y 366 nm.

Tabla 11.

Primera placa TLC

Fracción	Valor de Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,04	Negro	Negro
Rf 2	0,08	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 3	0,37	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 4	0,57	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 5	0,61	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 6	0,71	Fluorescencia azul	-
Rf 7	0,82	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 8	0,93	Fluorescencia azul	-
Quercetina	0,93	Negro	Negro
Kanferol	0,96	Negro	Negro
Rutina	0,33	Negro	Negro

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ilex guayusa* y estándares de flavonoides.
Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 12.

Segunda placa TLC

Fracción	Valor de Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,55	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 2	0,64	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 3	0,73	Fluorescencia azul	-
Rf 4	0,85	Fluorescencia azul	Plomo
Naringenina	0,36	Fluorescencia azul	Plomo
Hesperidina	0,87	Fluorescencia azul	-
Diosmina	-	-	-
Mircetina	0,93	Negro	Negro

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ilex guayusa* y estándares de flavonoides.
Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 13.

Tercera placa TLC

Fracción	Valor de Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,09	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 2	0,56	Fluorescencia azul	Azul
Rf 3	0,63	Fluorescencia azul	-
Rf 4	0,72	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 5	0,84	Fluorescencia azul	-
Rf 6	0,93	-	Plomo
Morina	0,97	Negro	Negro
Hidroxiflavona	0,56	Fluorescencia azul	-
Baicaleína	0,97	Negro	Negro
Luteolina	0,95	Negro	Negro

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ilex guayusa* y estándares de flavonoides.
Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 14.

Cuarta placa TLC

Fracción	Valor de Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,51	Fluorescencia azul	Azul
Rf 2	0,60	-	Plomo
Rf 3	0,69	Fluorescencia azul	-
Rf 4	0,81	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 5	0,93	Fluorescencia azul	-
Naringenina	-	-	-
Hiperósido	0,51	Negro	Negro
Crisina	0,49	Fluorescencia azul	-
Epigallocatequina	0,77	Fluorescencia azul	Plomo

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ilex guayusa* y estándares de flavonoides.
Elaborado por: el autor (2017).

Tabla 15.

Quinta placa TLC

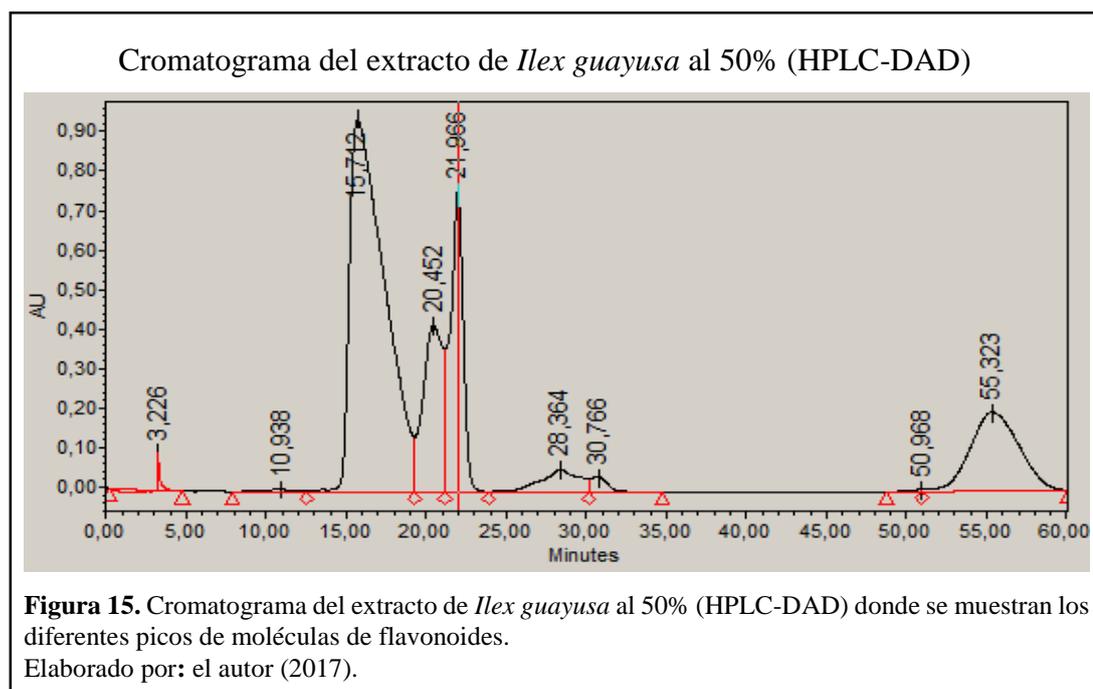
Fracción	Valor de Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,11	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 2	0,54	Fluorescencia azul	Azul
Rf 3	0,72	-	Negro
Rf 4	0,83	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 5	0,94	Fluorescencia azul	Plomo
Daidzeina	0,98	-	Negro
Apigenina	0,54	Fluorescencia azul	-
Genisteína	0,98	Negro	Negro
Silibina	0,96	Negro	Negro

Nota: Valores de Rf para fracciones de *Ilex guayusa* y estándares de flavonoides.
Elaborado por: el autor (2017).

Los valores de Rf de las placas de TLC en comparación con los estándares, sugieren la existencia de 4 flavonoides. En la primera TLC, existe una coincidencia entre la fracción Rf 8 y la quercetina, cuyo valor de Rf= 0,93. En la tercera placa se observa el mismo Rf para la fracción Rf 2 y la hidroxiflavona, con un valor de Rf= 0,56 y fluorescencia azul para ambas fracciones. En la cuarta placa, hay una coincidencia entre Rf 1 y el hiperósido, con un Rf= 0,51. Finalmente, en la quinta placa coincide Rf 2 con la apigenina, con un valor Rf= 0,54 y fluorescencia azul en ambas fracciones. Estos resultados son contrastados con los obtenidos por Tuquinga Usca (2013) donde se detectan los flavonoides quercetina e hidroxiflavona, además de ácido caféico, naringenina, flavonona, galangina y flavona, como posibles moléculas identificadas.

3.5. Identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (HPLC-DAD)

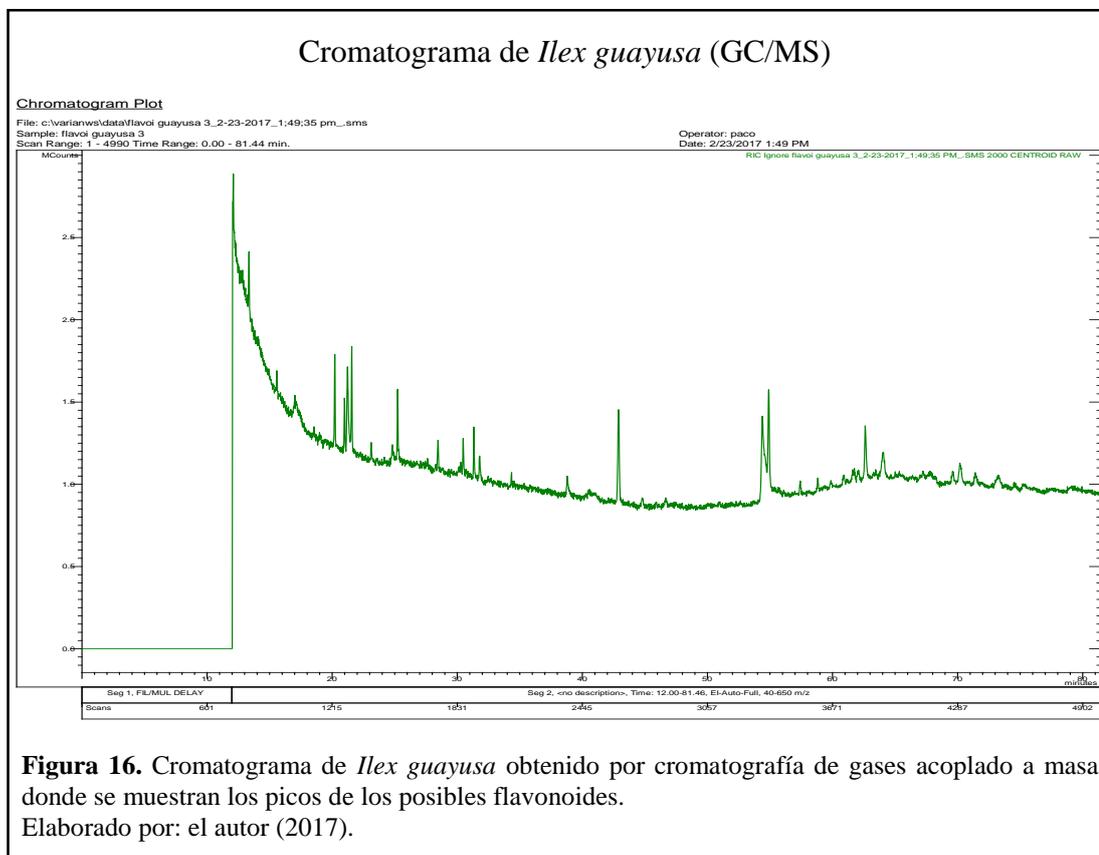
Una vez leída la muestra del extracto de *Ilex guayusa* al 50% en el HPLC-DAD, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 15.



Este cromatograma indica la presencia de 8 posibles flavonoides, resultado que se corrobora con la corrida del extracto de *Ilex guayusa* al 50% por TLC en el que también se identifica 8 moléculas. Al evaluar los cromatogramas de los 7 estándares con los que se trabajó en esta metodología y el cromatograma del extracto de *Ilex guayusa*, no se detectó ninguna coincidencia. Sin embargo, en la investigación de García-Ruiz, y otros (2017), en el que se utilizó un HPLC acoplado a masas (HPLC-DAD-ESI/MS), se pudo determinar la existencia de 3 flavonoides: rutina, kamferol-3-*O*-hexosa y quercetina-3-*O*-hexosa, lo cuales ya han sido identificados en la yerba de mate (*Ilex paraguariensis*), y en otras 7 especies más de *Ilex*.

3.6. Identificación de flavonoides por cromatografía de gases acoplado a masas

La lectura de la muestra de *Ilex guayusa* en el equipo de GC/MS, dio como resultado el siguiente cromatograma (Figura 16.).



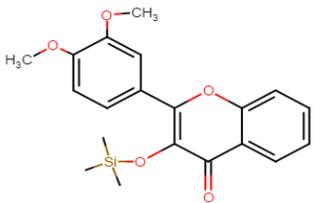
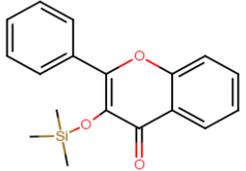
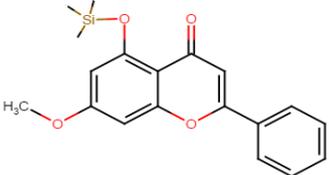
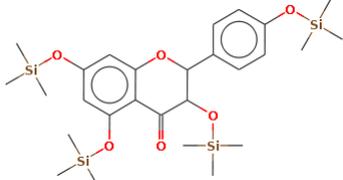
A partir de este cromatograma se pudieron identificar 4 flavonoides: 3',4'-dimetoxiflavonol, 3-hidroxiflavona, tectocrisina y canferol. En la Tabla 16. se puede apreciar las características que resultaron para la identificación de estos compuestos.

En comparación con los resultados analíticos obtenidos por Kapp Jr, Mendes, Roy, McQuate, & Kraska (2016) en el que detectaron los flavonoides: catequina, epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina galato, epigallocatequina, canferol y naringenina; en este estudio solo se pudo identificar al canferol, ya que los pesos moleculares de las otras moléculas de flavonoides siliados, superan el índice de detección de GC/MS con el que se trabajó, el cual tiene un m/z máximo de 650.

Sin embargo, las moléculas encontradas en este análisis son de gran interés al ser descritas por primera vez en la especie *Ilex guayusa*, con excepción del canferol, el cual ya ha sido identificado en la *Ilex guayusa* en estudios anteriores.

Tabla 16.

Flavonoides identificados por comparación de los pesos moleculares de los flavonoides siliados, y los iones moleculares obtenidos.

Nombre del compuesto	Estructura siliada	Tr	Ión más abundante	Ión molecular	Iones significativos
3',4'-Dimetoxiflavonol		28,4	43	370	89 (91%), 87 (69%), 67 (65%)
3-hidroxi flavona		30,5	88	310	89 (64,5%), 43 (41,5%), 81 (25,3%)
Tectocrisina		54,9	81	340	69 (69%), 41 (57,5%), 89 (52,5%)
Canferol		62,6	396	578	147 (66,5%), 145 (43%), 105 (41%)

Nota: Tr: tiempo de retención. Elaborado por: el autor (2017)

Conclusiones

- El extracto de té verde al 50% presentó cerca del doble de fenoles totales, 50,28 mg/mL, que el extracto de *Ilex guayusa* al 50%, cuyo valor fue de 22,44 mg/mL, siendo de interés para posteriores estudios donde se indague en los diferentes tipos de fenoles presentes en la guayusa.
- El extracto de *Ilex guayusa* al 50%, contiene 7,50 mg/mL de flavonoides totales, valor que es aproximadamente el doble al del té verde, el cual contiene 4,92 mg/mL demostrando un alto potencial medicinal más que el té verde.
- El extracto de *Ilex guayusa* al 80% exhibió una mayor actividad contra radicales libres, con un valor de DPPH expresado con un \bar{IC}_{50} de 23,850 μ L/mL, mientras que el referente natural del té verde tuvo un \bar{IC}_{50} de 32,540 μ L/mL, y el referente sintético del ácido ascórbico un \bar{IC}_{50} de 31,254 μ L/mL.
- En la TLC, se detectó 8 posibles flavonoides en el extracto de *Ilex guayusa* al 50%. Además, se detectaron 4 coincidencias entre los Rf de la *Ilex guayusa*, y los estándares de flavonoides, lo cuales fueron: la quercetina, la hidroxiflavona, el hiperósido y la apigenina.
- El análisis por HPLC detectó la presencia de 8 posibles flavonoides, corroborando los resultados de la placa TLC del extracto de *Ilex guayusa* al 50%, siendo la TLC una técnica de bajo costo y eficacia para detectar presencia de moléculas, en contraste a la técnica HPLC que es más costosa.
- La GC/MS permitió la identificación de 4 flavonoides luego de la siliación: el 3',4'-dimetoxiflavonol, la 3-hidroxiflavona, la tectocrisina y el canferol, sin embargo, no identificó las moléculas detectadas por TLC a excepción de la hidroxiflavona, debido a que los pesos moleculares de los flavonoides siliados

encontrados en TLC superan la relación masa/número de carga (m/z) del GC/MS con el que se trabajó, el cual es de 650 m/z .

- Este trabajo indica la presencia de los siguientes flavonoides: la quercetina, la 3-hidroxiavona, el hiperósido, la apigenina, el 3',4'-dimetoxiflavonol, la tectocrisina y el canferol, quedando pendiente la caracterización espectral de aquellos que fueron detectados en TLC.

Recomendaciones

- Cuantificar fenoles, flavonoides y DPPH, ya que se ha demostrado que extrae una mayor cantidad de compuestos antioxidantes que el etanol.
- Trabajar con material vegetal fresco, evitando largos tiempos de almacenamiento y temperaturas desfavorables, ya que pueden degradar el contenido de fenoles que incluye a los flavonoides.
- Consumir *Ilex guayusa* debido a la gran cantidad de flavonoides presentes en la planta, por su capacidad para combatir radicales libres.
- Trabajar con más estándares de flavonoides para poder identificar las fracciones R_f de la *Ilex guayusa* en la TLC que no pudieron ser comparadas.
- Realizar el análisis del GC/MS en un equipo con un *m/z* superior para detectar flavonoides siliados con altos pesos moleculares que no pudieron ser detectados en este estudio.

Referencias

- Aldred, S. (2013). Antioxidants. En *Encyclopedia of Behavioral Medicine* (págs. 105-106). Nueva York: Springer New York.
- AnalytikJena. (2016). *AnalytikJena*. Obtenido de Antioxidant Capacity: PHOTOCHEM®: <https://www.analytik-jena.de/en/analytical-instrumentation/products/antioxidants.html>
- Annie Bligh, S. W., Ogegbo, O., & Wang, Z.-T. (2013). Flavonoids by HPLC. En K. G. Ramawat, & J.-M. Mérillon (Edits.), *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (págs. 2108-2137). Berlín: Springer.
- Arias, M. (2013). *Evaluación del nivel de LH mediante la adición de guayusa (Ilex guayusa loes) en vacas criollas con la aplicación de un protocolo de IATF en la Provincia de Pastaza, Parroquia 10 de Agosto*. Latacunga.
- Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá: Tercer Mundo.
- Bravo, L., & Mateos, R. (2008). Analysis of Flavonoids in Funcional Foods and Nutraceuticals. En J. Hurts (Ed.), *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (págs. 147-206). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Burneo Palacios, Z. L. (Octubre de 2009). Determinación de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de doce especies del sur del Ecuador [Tesis]. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Bussmann, R. W., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Townesmith, A. (2011). Proving that Traditional Knowledge Works: The

- antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *Ethnobotany Research and Applications*, 67-96.
- Calderón, A., Romero, L., Ortega-Barría, E., Solís, P., Zacchino, S., Gimenez, A., Gupta, M. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 545-553.
- Carper, J. (2008). *Los alimentos: medicina milagrosa*. Barcelona: Editorial Amat.
- Carrión Armijos, G. N. (Julio de 2011). *Aislamiento biodirigido (in vitro) de compuestos antioxidantes y antihiper glucemiantes a partir de Ilex guayusa*. Loja, Ecuador.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 5-14.
- Charles, D. J. (2013). *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Nueva York: Springer.
- Chaudhary, G., Rani, D., Raj, R., Srivastava, M. M., & Dantu, P. K. (2012). Cellular Differentiation in the In Vitro Raised Zygotic Embryo Callus of *Boerhaavia diffusa* L. to Produce the Flavonoid, Kaempferol. En L. H. Khemani, M. M. Srivastava, & S. Srivastava (Edits.), *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives* (págs. 113-118). Berlín: Springer.
- Collahuazo, P. (2012). Plan de Manejo de la Especie Guayusa (*Ilex guayusa* L.) en la Comunidad de Wapu. 1-44. Recuperado el 2 de 4 de 2016, de <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/4.-Plan-de-Manejo-Guayusa-Wapu.pdf>

- Coronado H., M., Vega y León Rey Gutiérrez T., S., Vázquez F., M., & Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 206-212.
- Cui, L., Liu, X., Tian, Y., Xie, C., Li, Q., Cui, H., & Sun, C. (2016). Flavonoids, Flavonoid Subclasses, and Esophageal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *Nutrients*, 1-15.
- de la Torre, L., Navarrete, H., & Muriel M., P. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. (M. J. Macía, & H. Balslev, Edits.) Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Dietger , M. (2016). Antioxidants . En M. Dietger, *Staying Healthy From 1 to 100* (pág. 31). Springer Berlin Heidelberg: Berlín .
- Dueñas , J. F., Jarrett, C., Cummins, I., & Logan-Hines, E. (2016). Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Economic Botany*, 1-7.
- Ďuračková, Z. (2014). Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. En *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* (págs. 3-38). Berlín: Springer Berlin Heidelberg.
- Fernández Romero, V. E. (2014). Evaluación de extractos orgánicos de *Ilex guayusa* como nutraceuticos en el tratamiento de la diabetes tipo 2 [Tesis]. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay.

- Fuentes Arderiu, X., Castiñeras Lacambra, M. J., & Queraltó Compañó, J. M. (1997). *Bioquímica clínica y Patología molecular*. Barcelona : Editorial Reverté.
- García Barriga, H. (1975). *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá: Tercer mundo editores .
- García-Ruiz, A., Baenas, N., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Moreno, D. A., & Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- García Trianal, B. E., Saldaña Bernabeu, A., & Saldaña García, L. (2012). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 187-196.
- García, H. (1975). *Flora medicinal de Botánica Médica*. Bogotá: Editorial Imprenta Nacional Bogotá.
- Gary, C. (2009). *Química analítica*. México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES.
- Godoy Alvarez, S. N. (Septiembre de 2016). Atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) [Tesis]. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Gould, K. S., & Lister, C. (2006). Flavonoid Functions in Plants. En Ø. M. Andersen, & K. R. Markham (Edits.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (págs. 397-424). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 345–391.

- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverté SA.
- Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J Endocrinol Invest*, 783-788.
- Jayaprakasha, G. K., Vikram, A., & Patil, B. S. (2012). Analysis Methods of Flavanones. En Z. Xu, & L. R. Howard (Edits.), *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals* (págs. 275-312). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Kapp Jr, R. W., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R. S., & Kraska, R. (2016). General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology*, 1-21.
- Keller, R. B. (2009). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., & Gliszczynska-Swiglo, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Comoposition and Analysis* , 313-322.
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Ku, S.-K., Kwak, S., Kwon, O.-J., & Bae, J.-S. (2014). Hyperoside Inhibits High-Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo. *Inflammation*, 1389–1400.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.

- Kunnumakkara, A. B. (2015). *Anticancer Properties of Fruits and Vegetables: A Scientific Review*. Toh Tuck: World Scientific Publishing.
- Lamaison, J. L., & Carnat, A. (1991). Terneurs en principaux flavonoides des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret), DC (Rosaceae). *Pharm Acta Helv*, 64, 315-320.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2014). Essential Oils as Antioxidants. En Y. Li, A.-S. Fabiano-Tixier, & F. Chemat, *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* (págs. 21-27). Aniñón: Springer International Publishing.
- Linus Pauling Institute . (2016). *Oregon State University*. Obtenido de Linus Pauling Institute: Micronutrient Information Center: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids#disease-prevention>
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En *Desarrollo y Transversalidad* (págs. 129-162). Itagüí: Corporación Universitaria Lasallista.
- Mamta, Misra, K., Singh Dhillon, G., Kaur Brar, S., & Verma, M. (2014). Antioxidants. En *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (págs. 117-138). Nueva York: Springer New York.
- Martínez Flores, S., Gonzáles Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y efectos antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 271-278.
- Martínez M, A. (2005). *Flavonoides*. Medellín: Universidad de Antioquia.

- Matteo, R., Cossio, N., & Scalvenzi, L. (2016). Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *International Workshop on Modelization and Multidisciplinary Science for Development of Natural Products and Agro-Industrial Processes in Ecuador Amazon Region*, 1-7.
- Mercado-Mercado, G., de la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 36-46.
- Miranda , M., & Cuéllar, A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales* . La Habana: Félix Varela .
- NIST. (2016). *National Institute of Standards and Technology*. Obtenido de Quercetin: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=quercetin+tms&Units=SI>
- Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. En M. Ali Mohd (Ed.), *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* (págs. 83-108). Rijeka: InTech.
- Peñarrieta, M. J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo , J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Bolivian Journal of Chemistry* , 68-81.
- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 664-671.

- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 3-11.
- Repo-Carrasco-Valencia, R. (2017). Dietary Fibre and Bioactive Compounds of Kernels. En C. M. Haros, & R. Schoenlencher (Edits.), *Pseudocereals: Chemistry and Technology* (págs. 71-87). Lima: Wiley & Sons.
- Ríos, M., Koziol, M. J., Borgtoft, H. P., & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: Aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito: Abya-Yala.
- Ruiz, J. R., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-orientes Peruano. *Ciencia e investigación*, 41-47.
- Runa. (2016). *Runa*. Recuperado el 2 de Abril de 2016, de Runa: <http://runa.com.ec/guayusa/>
- Schwab, M. (2012). Antioxidants. En *Encyclopedia of Cancer* (pág. 216). Berlín: Springer Berlin Heidelberg.
- Sigma-Aldrich. (1997). *BSTFA + TMCS: Product Specification*. Obtenido de Sigma-Aldrich Co.: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4747.pdf>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.
- Swanston-Flatt, S. K., Day, C., Flatt, P. R., Gould, B. J., & Bailey, C. J. (1989). Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research*, 69-73.

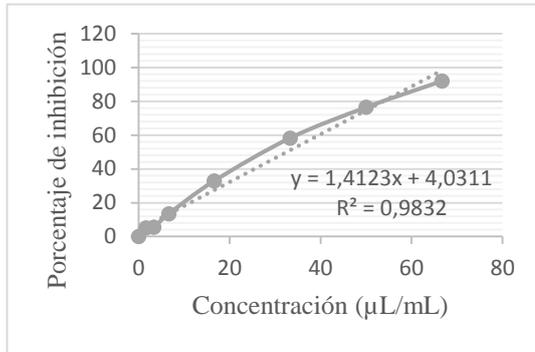
- Tropicos. (27 de Julio de 2009). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador* .
Obtenido de *Ilex guayusa* Loes.:
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2000086&projectid=2>
- Tuquinga Usca, M. R. (2013). Efecto estrogénico del extracto de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) en ratas (*Rattus norvegicus*). Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Unnikrishnan, M. K., Veerapur, V., Nayak, Y., Mudgal, P. P., & Mathew, G. (2013). Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids. En R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Edits.), *Polyphenols in Human Health and Disease* (págs. 143-161). Chennai: Academic Press.
- Verde Calvo, J. R., Vega Ávila, E., López Cruz, J. I., Estrada Zúñiga, M. E., Malpica Sánchez, F. P., Matínez Orta, F., Tovar Castro, L. Z. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio: Química Analítica* . México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Weissmann, E. (4 de Julio de 2014). *National Geographic*. Obtenido de Ecuador's "Superleaf" Tea: Could It Replace Your Afternoon Coffee?:
<http://news.nationalgeographic.com/news/2014/07/140703-guayusa-ecuador-amazon-health-foods-tea/>
- Wintola, O., & Afolayan, A. (2015). The antibacterial, phytochemicals and antioxidants evaluation of the root extracts of *Hydnora africana* Thunb. used as antidiarrheal in Eastern Cape Province, South Africa. *BMC complementary and alternative medicine*, 12.

Zapata, S., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 25-36.

Zhang, N., Ying, M.-D., Wu, Y.-P., Zhou, Z.-H., Ye, Z.-M., Li, H., & Lin, D.-S. (2014). Hyperoside, a Flavonoid Compound, Inhibits Proliferation and Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Osteosarcoma Cells. *PLoS One*, 1-8.

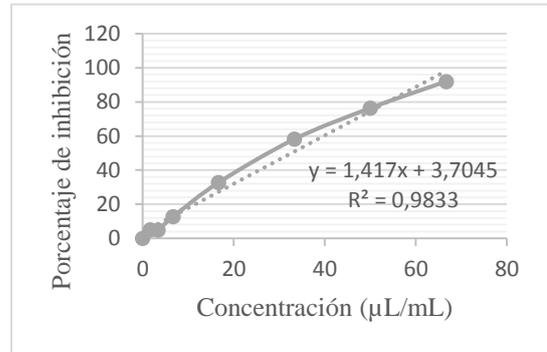
Anexos

Anexo 1. Curvas del porcentaje de inhibición DPPH vs. Concentración del referente natural: té verde, los extractos de *Ilex guayusa* al 20%, 50% y 80% y el referente sintético: ácido ascórbico.



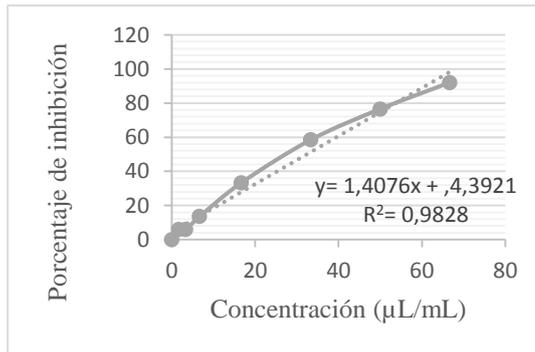
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto té verde al 50% vs. porcentaje de inhibición 1, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



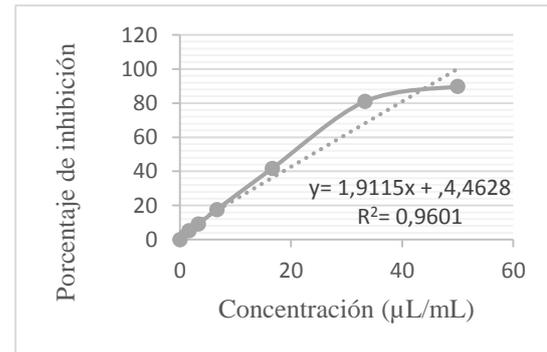
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto té verde al 50% vs. porcentaje de inhibición 2, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



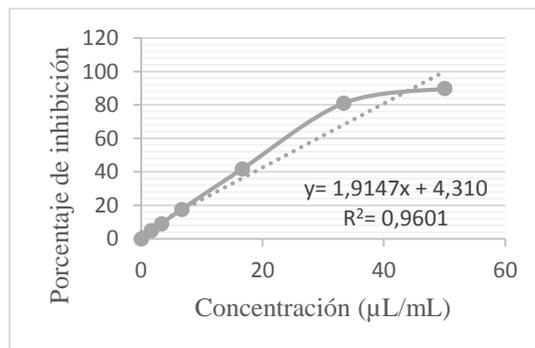
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto té verde al 50% vs. porcentaje de inhibición 3, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



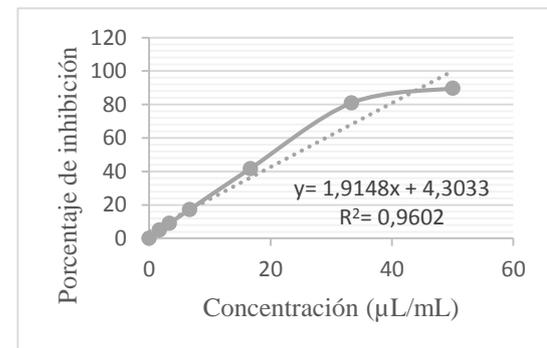
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 80% vs. porcentaje de inhibición 1, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



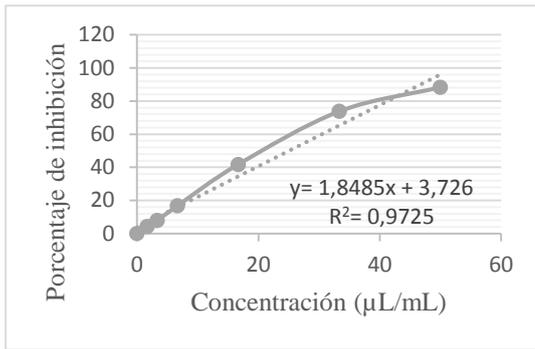
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 80% vs. porcentaje de inhibición 2, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



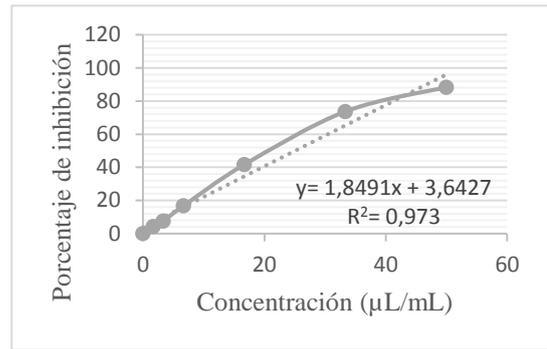
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 80% vs. porcentaje de inhibición 3, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



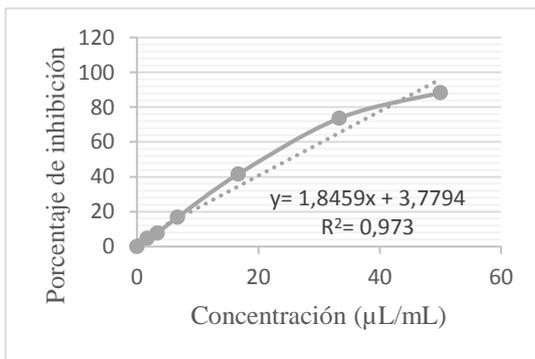
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 50% vs. porcentaje de inhibición 1, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



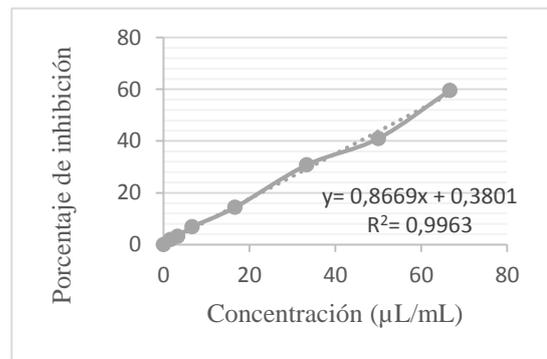
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 50% vs. porcentaje de inhibición 2, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



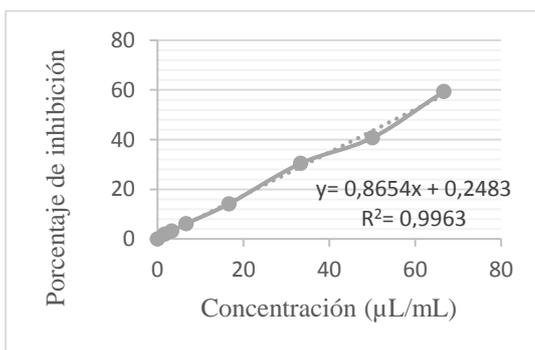
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 50% vs. porcentaje de inhibición 3, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



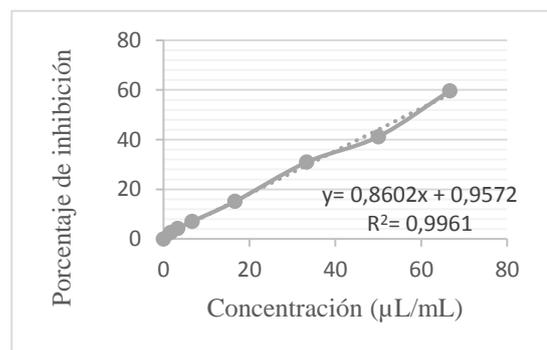
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 20% vs. porcentaje de inhibición 1, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).



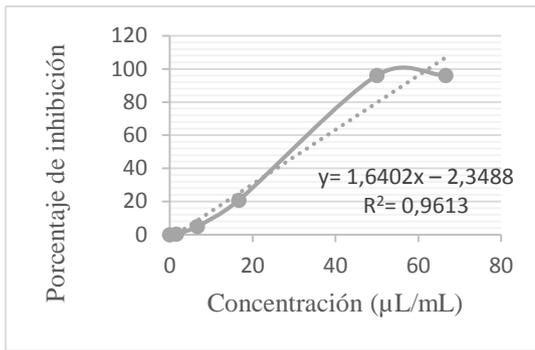
Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 20% vs. porcentaje de inhibición 2, construido en curva.

Elaborado por: el autor (2017).

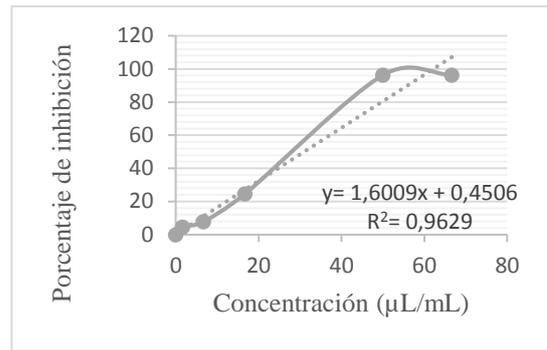


Concentración ($\mu\text{L/mL}$) del extracto *Ilex guayusa* al 20% vs. porcentaje de inhibición 3, construido en curva.

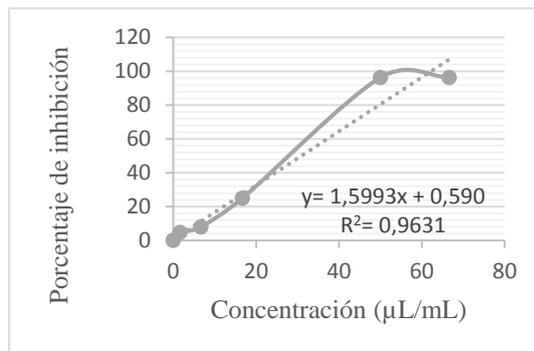
Elaborado por: el autor (2017).



Concentración (µL/mL) del ácido ascórbico vs. porcentaje de inhibición 1, construido en curva. Elaborado por: el autor (2017).

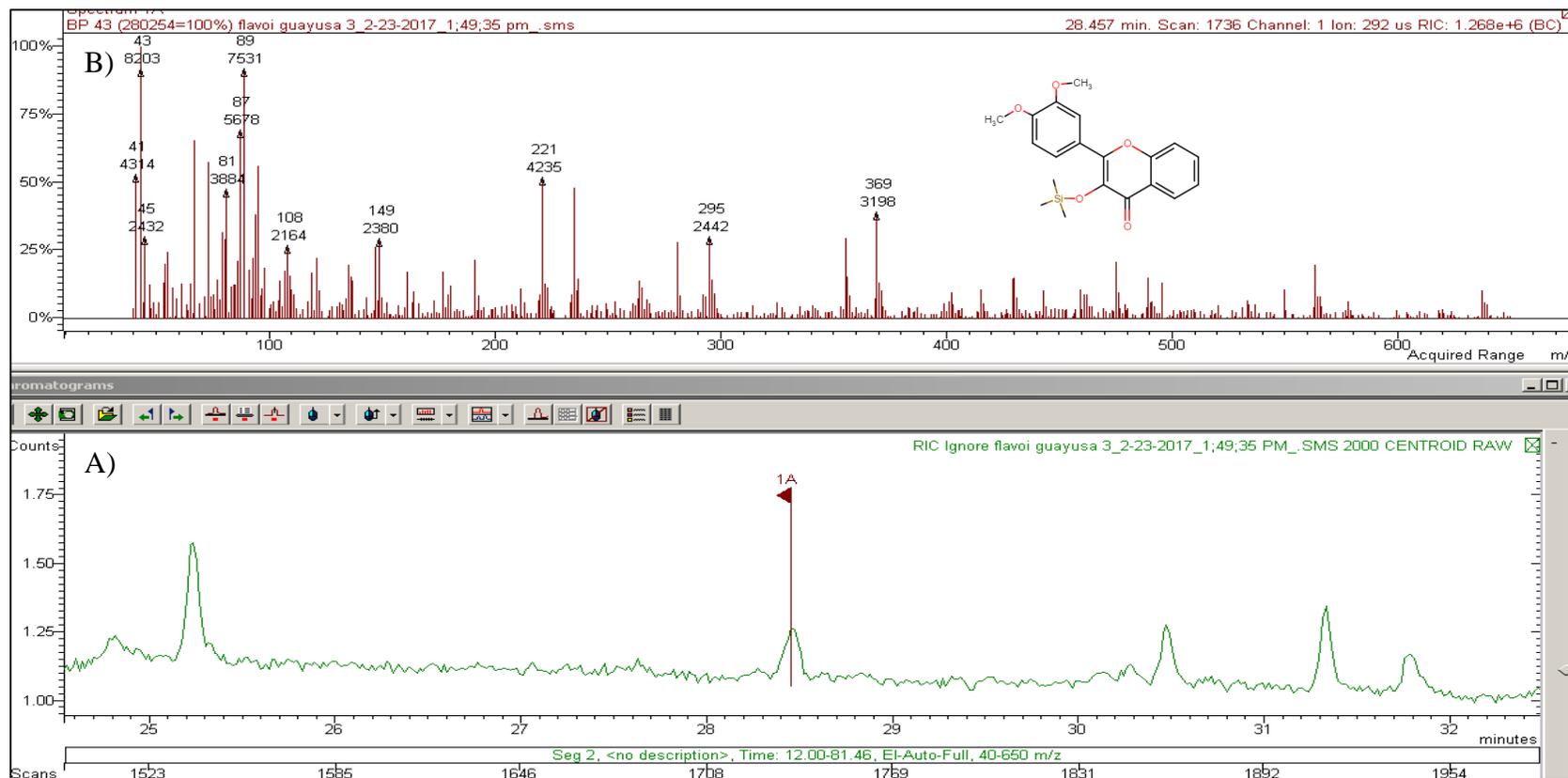


Concentración (µL/mL) del ácido ascórbico vs. porcentaje de inhibición 2, construido en curva. Elaborado por: el autor (2017).

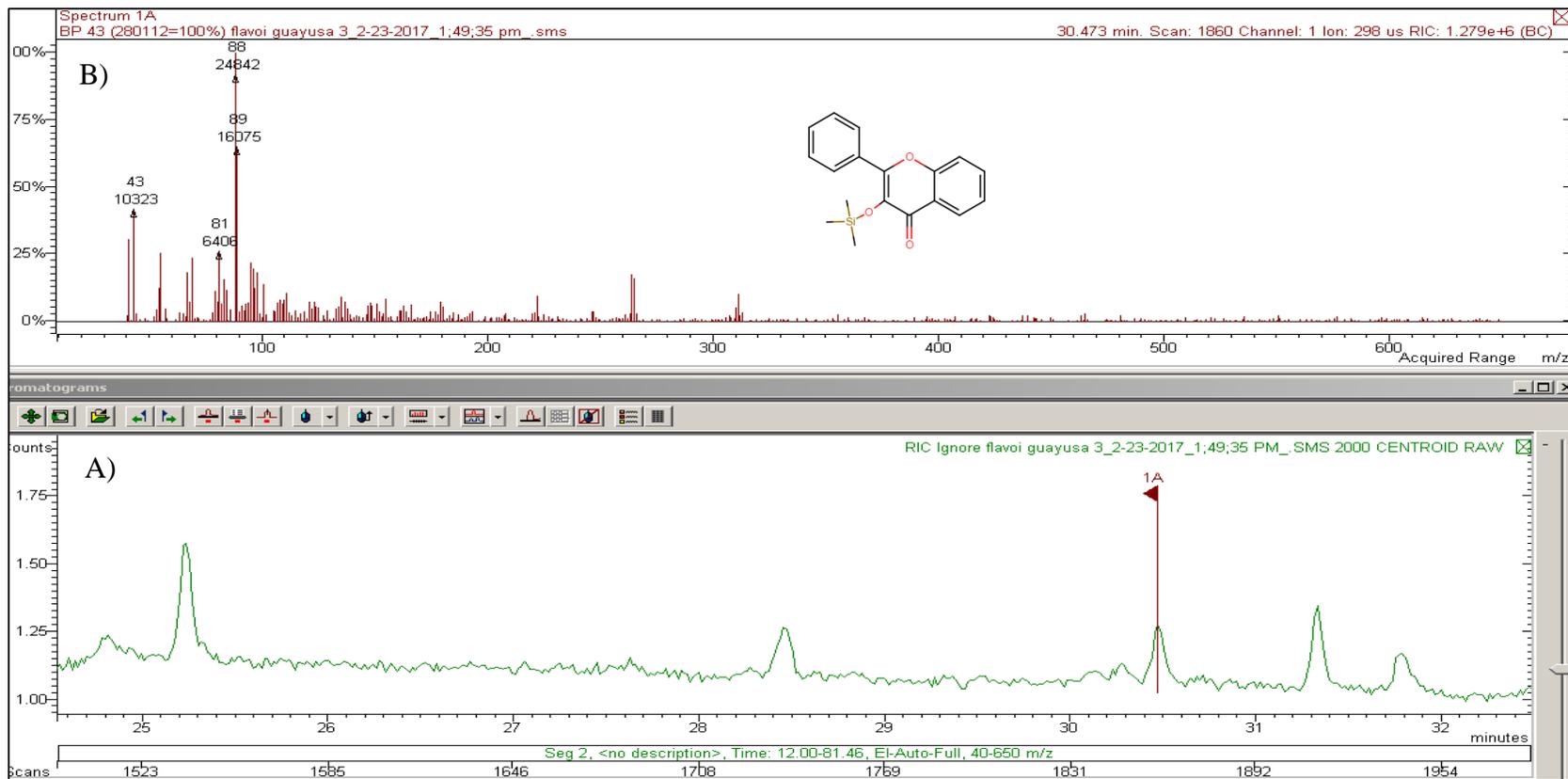


Concentración (µL/mL) del ácido ascórbico vs. porcentaje de inhibición 3, construido en curva. Elaborado por: el autor (2017).

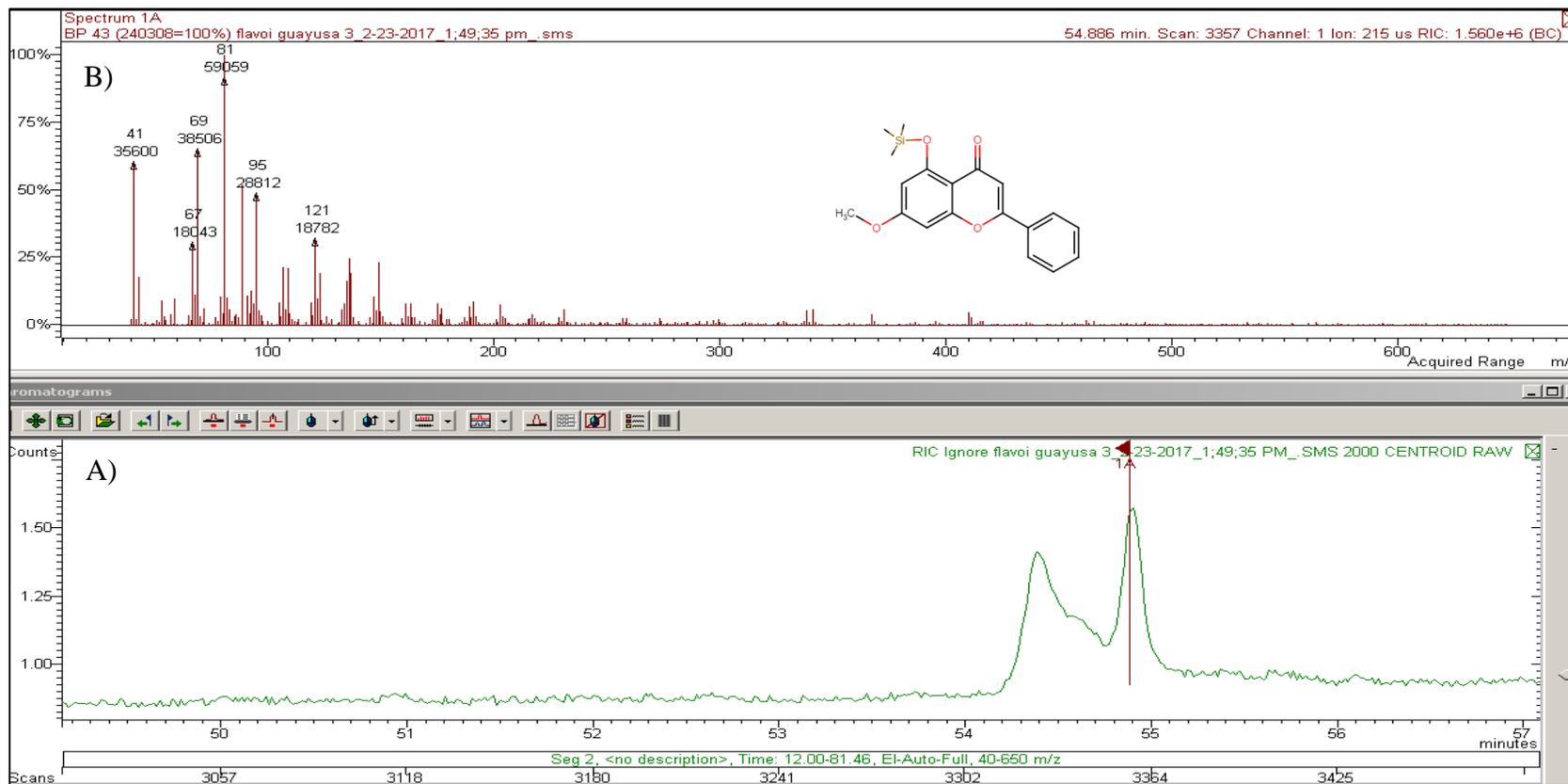
Anexo 2. Cromatogramas y espectros de las moléculas de flavonoides identificados en la muestra de *Ilex guayusa* analiza mediante GC/MS.



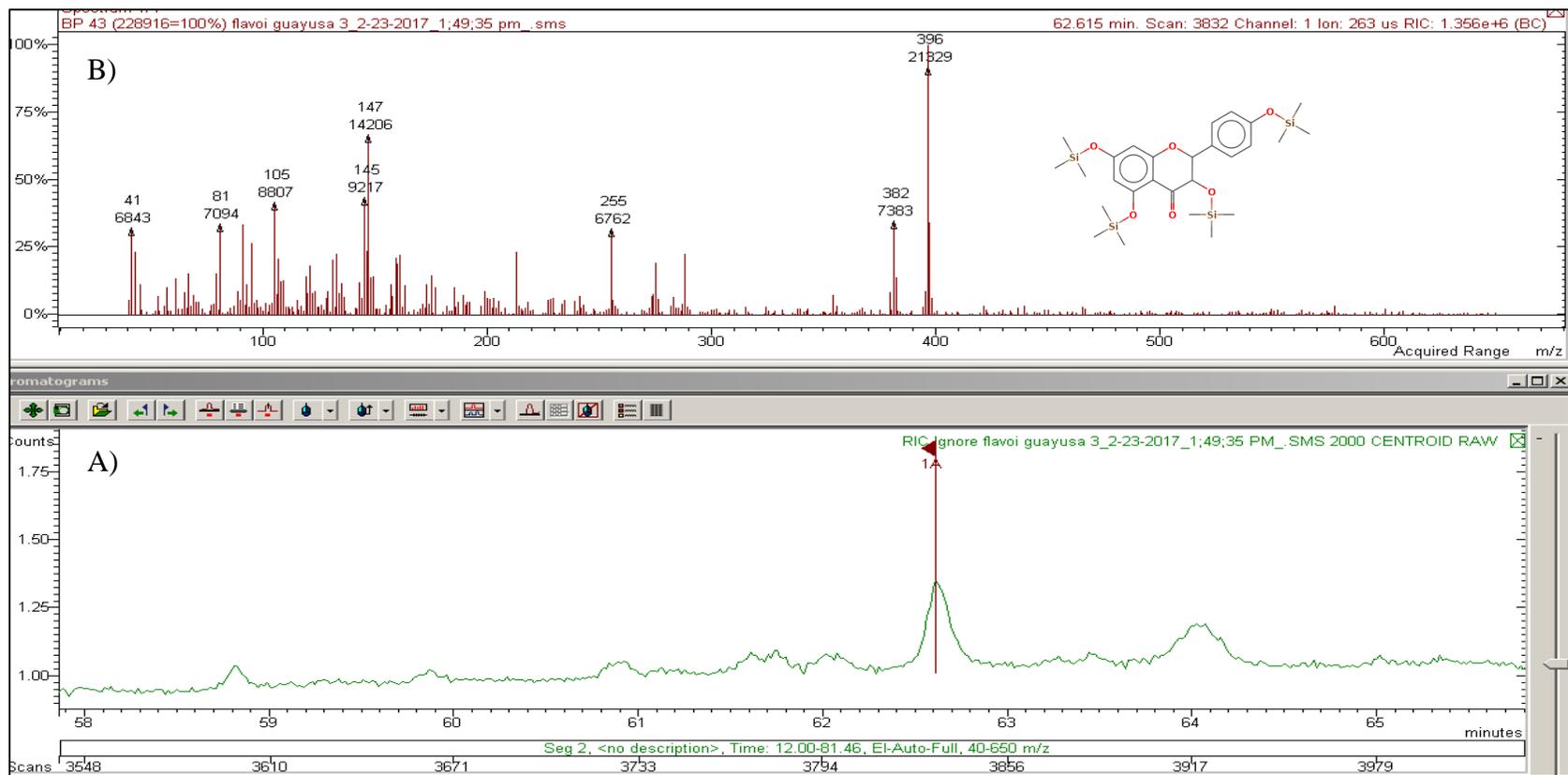
Nota: A) Pico del cromatograma de GC/MS a un tiempo de retención (Tr) de 28,4 minutos. B) Espectro del pico donde se muestran los iones moleculares, correspondiendo el ión de 370 al 3',4'-dimetoxiflavonol. Elaborado por: el autor (2017).



Nota: A) Pico del cromatograma de GC/MS a un tiempo de retención (Tr) de 30,5 minutos. B) Espectro del pico donde se muestran los iones moleculares, correspondiendo el ión de 310 a la 3-hidroxi flavona. Elaborado por: el autor (2017).



Nota: A) Pico del cromatograma de GC/MS a un tiempo de retención (Tr) de 54,9 minutos. B) Espectro del pico donde se muestran los iones moleculares, correspondiendo el ión de 340 a la tectocrisina. Elaborado por: el autor (2017).



Nota: A) Pico del cromatograma de GC/MS a un tiempo de retención (Tr) de 62,6 minutos. B) Espectro del pico donde se muestran los iones moleculares, correspondiendo el ión de 396 al canferol. Elaborado por: el autor (2017).