



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES

“ANÁLISIS DE FLAVONOIDES *EN Ilex guayusa* Loes. (GUAYUSA) Y CÁSCARAS DE *Hylocereus undatus* (PITAHAYA ROJA) CON TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título
de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

AUTORA: CARMEN GABRIELA IDROVO YULAN

TUTORA: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2022

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Carmen Gabriela Idrovo Yulan con documento de identificación N° 0104276597, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 17 de octubre del 2022

Atentamente,



Carmen Gabriela Idrovo Yulan

0104276597

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Carmen Gabriela Idrovo Yulan con documento de identificación N° 0104276597, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Análisis de flavonoides en *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) con técnicas instrumentales para su posible aplicación en productos farmacéuticos”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 17 de octubre del 2022

Atentamente,



Carmen Gabriela Idrovo Yulan

0104276597

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Myriam Ximena Mancheno Cárdenas con documento de identificación N° 0602018160, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN *Ilex guayusa* Loes. (GUAYUSA) Y CÁSCARAS DE *Hylocereus undatus* (PITAHAYA ROJA) CON TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS”, realizado por Carmen Gabriela Idrovo Yulan con documento de identificación N° 0104276597, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 17 de octubre del 2022

Atentamente,



Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas, Mgtr

0602018160

Dedicatoria

A mis padres Marco y Gloria por ser mi pilar fundamental que me han sabido guiar en mis decisiones desde temprana edad, brindándome su apoyo y cariño en todo momento, protegiéndome contra las adversidades y sembrando en mí el valor de la responsabilidad y el compromiso.

A mi abuelita Luz que me ha criado y que me ha entregado todo el amor, cuidados, mimos y fortaleza que solo una abuelita puede dar, enseñándome que puedo lograr todo aquello que me proponga.

A mis hermanos Susan, Estefanía que a lo largo de estos años me han brindado un amor incondicional y ayudándome en los momentos difíciles ofreciéndome consejos para superarme cada día y a Junitor por ser mi compañero de juegos.

Agradecimientos

A mis profesores por brindarme sus conocimientos en estos años académicos haciendo de mí una excelente profesional y con grandes valores.

A mi tutora de tesis Dra. Myriam Mancheno que con sus conocimientos ha sabido guiarme en todo el proceso de este trabajo académico, de igual manera, a la Dra. Inés Malo que me brindó su ayuda en las diferentes dificultades a lo largo de la carrera.

A David por haberme acompañado a lo largo de este proceso brindándome sus consejos y apoyo incondicional.

A mis amigas Mishu, Patu, Gabyta, Katy que a lo largo de estos años fuimos parte de la más emocionante aventura que nos trajo paseos, trabajos, amanecidas y viajes que siempre guardaré en mi corazón, gracias por apoyarme y decirme que me esforzara en cada paso que daba y a Maritza por demostrarme que es una gran amiga y confidente, gracias por estar siempre conmigo amiguitas.

Índice de contenidos

<i>Dedicatoria</i>	<i>IV</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>V</i>
<i>Índice de contenidos</i>	<i>VI</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>X</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>XI</i>
<i>Resumen</i>	<i>XII</i>
<i>Abstract</i>	<i>XIII</i>
<i>Capítulo I</i>	<i>1</i>
<i>Antecedentes</i>	<i>1</i>
1. Introducción	1
2. Problema de investigación	2
3. Pregunta de investigación	3
4. Justificación	4
5. Objetivos	5
5.1. General	5
5.2. Específicos	5
6. Hipótesis	6
<i>Capítulo II</i>	<i>7</i>

Marco Teórico	7
2.1 Estado del arte.....	7
2.2 Definición de términos básicos.....	11
2.2.1 Metabolitos secundarios	12
2.2.2 Extracción de principios activos	12
2.2.3 Tamizaje fitoquímico	12
2.2.4 Técnicas instrumentales	13
2.3 Bases teóricas.....	13
2.3.1 <i>Ilex guayusa</i> Loes. (guayusa).....	13
2.3.1.1 Taxonomía.....	14
2.3.1.2 Descripción morfológica.....	15
2.3.1.3 Composición química.....	15
2.3.1.4 Usos de la guayusa	16
2.3.2 <i>Hylocereus undatus</i> (pitahaya roja)	16
2.3.2.1 Taxonomía.....	17
2.3.2.2 Descripción morfológica.....	18
2.3.2.3 Composición química.....	19
2.3.2.4 Usos de la pitahaya.....	20
2.3.3 Flavonoides	20
2.3.3.1 Composición.....	21
2.3.3.2 Usos y su aplicación en la Industria Farmacéutica	21
2.3.3.3 Métodos de extracción	22

2.3.4 Tamizaje fitoquímico	23
2.3.4.1 Reacción de cloruro férrico para taninos.....	23
2.3.4.2 Prueba de espuma para saponinas	24
2.3.4.3 Reacción de Bornträger para quinonas.....	24
2.3.4.4 Prueba de Baljet para cumarinas	24
2.3.4.5 Reacción de Dragendorff para alcaloides.....	24
2.3.4.6 Prueba de Shinoda para flavonoides	24
2.3.5 Técnicas instrumentales para determinar flavonoides.....	25
2.3.5.1 Espectrofotometría de absorción.....	25
2.3.5.2 Espectroscopia infrarroja de Fourier (FTIR).....	25
Capítulo III.....	27
Marco metodológico	27
3.1. Nivel de investigación.....	27
3.2 Población y muestra.....	27
3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	27
3.4 Métodos de manejo estadístico de datos	29
3.5 Procedimientos experimentales	29
3.5.1 FASE 1: Obtención del extracto etanólico total de las hojas de <i>Ilex</i>	
<i>guayusa</i> Loes. (guayusa) y de las cáscaras de <i>Hylocereus undatus</i> (pitahaya roja)..	29
3.5.1.1 Recolección de las muestras vegetales de guayusa y pitahaya	30
3.5.1.2 Tratamiento de las muestras	30
3.5.1.3 Maceración de las muestras y obtención del extracto etanólico total (EET)	32

3.5.2 FASE 2: Tamizaje fitoquímico.....	35
3.5.5 FASE 3: análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales ...	39
3.6.5.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya.	39
3.5.5.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS	40
Capítulo IV	42
Resultados y discusión	42
4.1 FASE 1: Obtención del extracto etanólico total de las hojas de <i>Ilex guayusa</i> Loes. (guayusa) y de las cáscaras de <i>Hylocereus undatus</i> (pitahaya roja) mediante maceración	42
4.2 FASE 2: Tamizaje fitoquímico.....	43
4.3 FASE 3: Análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales.....	44
4.3.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya....	44
4.3.1.1 Espectro IR de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	44
4.3.1.2 Espectro IR de las cáscaras de <i>Hylocereus undatus</i>	46
4.3.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS	48
4.4. Análisis Estadístico	50
4.5 FASE 4: Propuesta de un fármaco a base de flavonoides extraídos de <i>Ilex guayusa</i> y cáscaras de <i>Hylocereus undatus</i>	51
Capítulo V.....	54
Conclusiones y recomendaciones	54
Bibliografía.....	56

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción taxonómica de la planta guayusa	14
Tabla 2 Descripción taxonómica de la pitahaya.....	18
Tabla 3 Datos de la obtención de los EET de guayusa y pitahaya.....	42
Tabla 4 Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico.....	43
Tabla 5 Resumen de las principales frecuencias observadas en <i>Ilex guayusa</i> e <i>Hylocereus undatus</i> y sus grupos funcionales.....	47
Tabla 6 Concentración de flavonoides presentes en <i>Ilex guayusa</i> e <i>Hylocereus undatus</i>	49
Tabla 7 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk	50
Tabla 8 Datos de la correlación de Spearman	51

Índice de figuras

Figura 1 Hojas de guayusa	31
Figura 2 Descascarado de la pitahaya	32
Figura 3 Maceración de <i>Ilex guayusa</i> e <i>Hylocereus undatus</i>	33
Figura 4 Filtrado al vacío de los EET de guayusa y pitahaya.....	34
Figura 5 Rotaevaporación del exceso de solvente de los EET.....	34
Figura 6 Prueba positiva para flavonoides	35
Figura 7 Prueba de espuma para detección de saponinas	36
Figura 8 Tamizaje fitoquímico para el EET de pitahaya	38
Figura 9 Tamizaje fitoquímico del EET de guayusa.....	39
Figura 10 Espectro IR de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	44
Figura 11 Espectro IR de las cáscaras de <i>Hylocereus undatus</i>	46
Figura 12 Curva de calibración con quercetina.....	48

Resumen

En el presente estudio se analizó los flavonoides provenientes de la maceración etanólica de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y de las cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja), para lo cual se usaron técnicas instrumentales como la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) donde se verificó la presencia de grupos funcionales O-H y C-H que se asocian a fenoles, alcoholes, moléculas de agua y flavonoides. Por otro lado, se realizó la cuantificación de los flavonoides mediante espectrofotometría UV-VIS obteniendo una concentración de 7.43 mg/g para la guayusa y de 5.49 mg/g para las cáscaras de pitahaya. Finalizando, se propuso una posible formulación de producto farmacéutico antioxidante en presentación de gotas orales a partir de los flavonoides extraídos de las hojas de *Ilex guayusa* y de las cáscaras de *Hylocereus undatus*.

Palabras clave: guayusa, pitahaya roja, flavonoides, FTIR, espectrofotometría UV-VIS.

Abstract

In the present study, the flavonoids from the ethanolic maceration of *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) leaves and from the husks of *Hylocereus undatus* (pitahaya Roja) were analyzed through instrumental techniques such as Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) were used, where the presence of O-H and C-H functional groups associated with phenols, alcohols, water and flavonoids. On the other hand, flavonoids were quantified by UV-VIS spectrophotometry, obtaining a concentration of 7.43 mg/g for guayusa and 5.49 mg/g for pitahaya husks. Finally, a possible formulation of an antioxidant pharmaceutical product in presentation of oral drops from flavonoids extracted from *Ilex guayusa* leaves and *Hylocereus undatus* husks was proposed.

Keywords: guayusa, pitahaya roja, flavonoids, FTIR, UV-VIS spectrophotometry.

Capítulo I

Antecedentes

1. Introducción

En el Ecuador, la utilización de las plantas medicinales está inmerso en la vida cotidiana de sus habitantes, se calcula que un 80% de la población depende de la medicina tradicional (Balslev et al., 2008) por lo tanto, el comercio y uso de estas plantas es una práctica activa en distintos mercados ecuatorianos (Ansaloni & Orellana, 2010). Nuestra civilización es de creencias ancestrales que son transmitidas de generación en generación por lo que, se caracteriza por su manera particular de diagnosticar y tratar enfermedades (Becerra, 2014).

La medicina alternativa y sus aportes a la salud es muy importante en nuestros tiempos, por lo que, es necesario tener un conocimiento concreto que se base en resultados científicos y estos se ven constantemente reflejados en publicaciones académicas de alto impacto. Dentro de este marco, se considera a la herbolaria como una práctica ancestral que hace uso de las propiedades de las plantas para tratar diversas patologías tanto en seres humanos como animales, lo que nos lleva al uso de los metabolitos secundarios producidos por estos como es el caso de los flavonoides (Guiance et al., 2021).

Existen alrededor de 400000 especies plantas, pero solo el 12% de estas tienen propiedades medicinales que poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios, como son aceites esenciales, taninos, saponinas, flavonoides, cumarinas, entre otros (Adema et al., 2018).

Dentro de la investigación se considera a la especie *Ilex guayusa* Loes. comúnmente conocida como “guayusa” la cual es una planta domesticada nativa de la Amazonia ecuatoriana y

sus hojas son ampliamente reconocidas por poseer propiedades digestivas, hipoglucemiantes y antioxidantes (Crespo et al., 2014) que a su vez puede provocar un gran impacto a largo plazo en el sector farmacológico por su alto contenido de cafeína y flavonoides.

Por otro lado, se considera a la especie *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) como una fruta exótica perteneciente a la familia de los cactus y es reconocida alrededor del mundo por poseer excelentes nutrientes que aportan beneficios a la salud de sus consumidores (Arauz, 2019). La composición química de la especie es variada, presenta pigmentos betalaínicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes (Chino, 2020) y en cuanto a la cáscara se ha demostrado que tiene propiedades nutraceuticas, donde se especifica que tiene el potencial para reducir el colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad, además, contiene pectinas las cuales son utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad de gelificación (Verona-Ruiz et al., 2020).

Es importante considerar la investigación de nuevos medicamentos que tomen en cuenta a los metabolitos secundarios como son los flavonoides como punto de partida, donde a través de ensayos clínicos controlados se produzcan fármacos con altos estándares de calidad para satisfacer distintas necesidades de sus consumidores. Los estudios sobre el contenido de flavonoides que posee *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja), son de suma importancia para poder explicar sus ventajas dentro del sector farmacéutico. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación se planteó comprobar la presencia de flavonoides en cantidades significativas de los dos patrones de estudio para su posterior aplicación en la industria farmacéutica.

2. Problema de investigación

En la actualidad la industria farmacéutica ecuatoriana relacionada con el campo de la biotecnología se abastece a través de medicamentos importados que suman alrededor de USD 991

millones desde el 2017, mientras que las exportaciones de medicamentos solo alcanzan USD 39 millones desde el 2017 (Acebo et al., 2018) estas cifras dan a conocer que los recursos biológicos de nuestro país no se están aprovechando correctamente por la falta de conocimiento e investigación acerca de estos, razón por la cual realizar este estudio puede ser de gran utilidad para la industria farmacéutica ecuatoriana.

Varias investigaciones demuestran que en el Ecuador existe una gran diversidad de plantas medicinales como por ejemplo *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) de la cual no se está aprovechando todas sus características, actualmente estas plantas se ocupan en la industria alimenticia para la elaboración de bebidas, barras nutricionales, edulcorantes, entre otros, sin aprovechar las propiedades medicinales que posee, las cuales podrían ser utilizadas por la industria farmacéutica del país generando un producto farmacéutico de origen natural evitando la compra a entidades farmacéuticas internacionales.

Sumado a esto, se ha visto de gran interés realizar un estudio investigativo acerca de los flavonoides que poseen *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) y la posibilidad de utilizarlos como fármacos.

3. Pregunta de investigación

Se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿La presencia de flavonoides en *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya Roja) en cantidades significativas nos permite la formulación de un producto farmacéutico?

4. Justificación

Las plantas medicinales, gracias a complejo metabolismo, forman un verdadero arsenal químico que, desde la antigüedad, el ser humano ha utilizado para atenuar sus malestares y prolongar la vida (Averno & Cisternas, 2010). Las propiedades curativas de las plantas medicinales eran difíciles de explicar hasta que diversos estudios científicos las justificaron por la presencia de moléculas biológicamente activas llamados metabolitos secundarios, que se les atribuye propiedades farmacológicas (Azahuanche & Aponte, 2016).

Existen muchos estudios que dan a conocer que la especie *Hylocereus undatus* (pitahaya Roja) es más utilizada en la industria alimentaria por sus propiedades organolépticas excelentes, lo que hace que su funcionalidad dentro de esta industria sea adecuada y perfecta, creando así varios productos alimenticios, pero también genera desperdicio (cáscaras). Sin embargo, estas cáscaras mediante tratamientos también pueden ser de utilidad en el mismo sector. Por lo tanto, se propone un nuevo enfoque a *Hylocereus undatus* donde sus residuos sean objeto de estudio, específicamente obteniendo flavonoides y cuantificándolos mediante técnicas instrumentales para su posible aplicación en un producto farmacéutico y de esta manera aprovechar totalmente todo el componente frutal.

La misma situación se presenta con la planta *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) ya que el desarrollo del mercado internacional es constante por lo que existe una necesidad de evaluar la seguridad de nuevos alimentos, durante varios años esta especie ha sido foco de investigaciones, las cuales demuestran que la composición química de esta no presenta mayor riesgo para la salud humana debido a que no está asociada a un historial de efectos adversos. Estudios bioquímicos y fitoquímicos han descrito que las hojas de esta planta están compuestas de varios metabolitos

secundarios, los cuales validan propiedades antioxidantes y estimulantes a la guayusa y tienen la capacidad de ser bien aprovechadas en el sector alimenticio (Wise & Negrin, 2020). Pero también es importante generar un punto de vista donde esta planta sea utilizada como materia prima para la elaboración de productos farmacéuticos y esto se debe a que la guayusa tiene alto contenido en cafeína y flavonoides lo que hace que tenga propiedades antioxidantes comprobables y pueda ser sustituto de los antioxidantes sintéticos del mercado.

Todos estos antecedentes de los sujetos de estudio, dan a conocer la problemática del enfoque de estos ya que como se menciona son ocupados generalmente en el sector alimenticio, mas no en el farmacéutico, por lo tanto, se propone realizar un análisis de los flavonoides presentes en las hojas *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y las cáscaras *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) mediante espectrofotometría UV-visible y espectroscopia infrarroja. Cabe recalcar que, para llegar al objetivo principal del análisis, como preámbulo se realizará una maceración en seco de los patrones de estudio para cuantificar los flavonoides presentes en los extractos y tomarlos en cuenta para que estas sean aplicables en el desarrollo de un producto farmacéutico.

5. Objetivos

5.1. General

Analizar flavonoides provenientes de las plantas *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) para su posible aplicación en productos farmacéuticos.

5.2. Específicos

- Realizar un tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) por

medio de distintos ensayos químicos verificando la presencia de compuestos bioactivos en los extractos obtenidos.

- Analizar los extractos etanólicos de los sujetos de estudio mediante el uso del espectrofotómetro UV-Visible y espectroscopía infrarroja para la cuantificación de los flavonoides.
- Realizar una revisión bibliográfica para la propuesta de una posible formulación de un producto farmacéutico utilizando como base los datos obtenidos de las especies estudiadas.
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

6. Hipótesis

La presencia de flavonoides en *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) es significativa para la propuesta de una formulación de un producto farmacéutico.

Capítulo II

Marco Teórico

2.1 Estado del arte

Desde tiempos remotos las plantas medicinales han sido considerados un recurso de gran importancia para tratar dolencias y necesidades terapéuticas. Su amplio uso como agentes de salud es conocido en varias culturas alrededor del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber tradicional se ha perfeccionado a lo largo del tiempo debido a los estudios científicos y ensayos químicos que han permitido explicar las propiedades medicinales de las plantas principalmente por la acción de los metabolitos secundarios que tienen distintas propiedades farmacológicas (Venegas, 2012).

Dentro de este mismo contexto Chumbia & Kuamar (2019) en su estudio “Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína” mencionan que al aprovechar al máximo los compuestos fenólicos y la cafeína de la especie mediante distintos procesos extractivos donde varía la temperatura, tiempo de extracción, relación etanol-agua y relación sólido-líquido, dará un amplio beneficio para los procesos agroindustriales, debido a que la guayusa es una especie de gran importancia en el sector amazónico ecuatoriano y en la actualidad generalmente se comercializan en forma de té o infusiones.

Por otro lado, en el trabajo experimental “Elaboración de un endulzante a base de miel de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) enriquecido con jengibre (*Zingiber officinale*) y guayusa (*Ilex guayusa*)” de Flores (2019) se enfoca en el desarrollo de un endulzante con un valor agregado

con la utilización de la guayusa, ya que demuestra que la presencia de aminoácidos en la especie y en el jengibre evita la acidificación de la miel, lo que provoca que el tiempo de vida útil sea prolongado y que sea agradable para el consumidor.

En la industria alimenticia la guayusa, es muy bien aprovechada por todas las propiedades que contiene, sin embargo, esta especie también capta la atención en el sector farmacéutico, como lo sugiere Maldonado (2020) en su trabajo experimental titulado “Evaluación de la concentración de cafeína en cápsulas preparadas a partir de extracto fluido de *Ilex guayusa* mediante espectrofotometría UV”, donde utiliza uno de los principales componentes de la guayusa (cafeína) para la formulación de capsulas de gelatina dura a partir de un granulado de 250 mg de extracto de *Ilex guayusa* donde estas tienen un efecto farmacológico atribuyéndole capacidades estimulantes en el organismo.

Por otro lado, Arteaga-Crespo y colaboradores (2020) llevaron a cabo un estudio donde se optimiza la extracción del contenido de polifenoles totales (TPC) utilizando la técnica instrumental del ultrasonido en las hojas de la guayusa, así mismo realizó una evaluación de la capacidad antioxidante del extracto obteniendo excelentes resultados, como consecuencia de estos hallazgos, el autor considera que los extractos de *Ilex guayusa* pueden ser utilizados para bebidas funcionales, formulaciones cosméticas y farmacéutica.

El trabajo de Utreras (2019) menciona que los extractos etanólicos de la especie *Ilex guayusa* Loes. son capaces de inhibir la actividad para alfa-glucosidadas y beta-glucosidasa, por lo que la concentración de los compuestos fenólicos presentes en los extractos es directamente proporcional al porcentaje de la inhibición enzimática, por lo tanto, concluye que el uso de los extractos etanólicos de las hojas de guayusa ayudan a la disminución de la glucosa postprandial.

Su uso después de las comidas contribuye un efecto hipoglucemiante a la salud humana, especialmente en pacientes con diabetes generada por trastornos metabólicos.

Por otro lado, Palchizaca (2019) comprobó la actividad antiinflamatoria de los extractos de las hojas de *Ilex guayusa* mediante el método de edema subplantar inducido por carragenina al 1%, el cual provocó inflamación en la pata izquierda de un grupo de 24 ratas, el extracto con una concentración de 100 mg/kg presentó un efecto antiinflamatorio en un lapso de 24 horas después de la inducción de la patología.

Por último, García (2020) realizó un trabajo investigativo no experimental mediante herramientas computacionales donde indica una hipótesis de la posible inhibición de múltiples mecanismos de virulencia de *H. pylori* haciendo el uso de extractos provenientes de *Ilex guayusa*, debido al alto contenido de flavonoides que se reporta en la especie. Este estudio proporciona una predicción de la posible interacción entre ligandos y proteínas, pero, no obstante, esta hipótesis debe ser corroborada mediante un estudio experimental.

En el presente estudio se consideró el uso de la cáscara de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) la cual tiene varias aplicaciones en la industria alimenticia como se reporta en el estudio “Análisis bibliográfico del uso de colorantes de cáscara de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) frente a colorantes sintéticos” de Arias & Auz (2022) donde da a conocer una evaluación de cinco métodos de extracción para obtener los pigmentos, en la cual concluye que la mejor fue mediante maceración acuosa, demostrando así que se puede extraer pigmentos naturales para consumo humano sin riesgos a la salud a largo plazo.

Por otro lado, Cueva (2020) en su investigación, evaluó las propiedades químicas y microbiológicas de la harina de la cáscara de pitahaya, donde concluye que cumple los parámetros de calidad para ser utilizados en el área agroindustrial como alimento para animales sustituyendo los balanceados brindando otra alternativa al valor nutricional.

Mientras que Vera (2020) en su trabajo de investigación demostró que la extracción de pectina de la cáscara de la pitahaya era posible utilizando métodos de hidrólisis ácida con uso de alcohol y ácido cítrico a diferentes pH y a temperatura constante, el cual le da un enfoque hacia la industria alimenticia como gelificante para diversos preparados.

En el estudio de Auquilla (2021) da a conocer que el consumo de la pulpa de la pitahaya genera desechos (cáscara) que no es aprovechada en la industria, por lo tanto, propone el estudio de los fenoles totales y flavonoides presentes en este utilizando extractos metanólicos, donde demuestra que existe una concentración considerable de estos metabolitos en las cáscaras frescas de pitahaya, para ser utilizados tanto en el sector alimenticio como en el farmacéutico.

Mientras que Chino (2020) realizó una investigación no experimental mediante una revisión bibliográfica utilizando revistas y artículos científicos donde evaluó la relación de los metabolitos secundarios y el efecto terapéutico que posee de la pitahaya, llegando a la conclusión que esta fruta tiene una amplia aplicación en la industria alimentaria como helados, mermeladas, bebidas, etc. Y también farmacéutica utilizando sus extractos como materia prima para elaboración de fármacos de tipo antioxidante e inflamatorio.

En el estudio de Barreto (2021) donde determinó la capacidad antioxidante el zumo de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) mediante el método DPPH utilizando espectrofotometría UV-vis donde obtuvo resultados favorables

concluyendo que los zumos de ambas especies si poseen capacidad antioxidante, pero es mayor para *Hylocereus undatus* (pitahaya roja).

Mientras tanto, Figueroa (2020) experimentó con la cáscara de pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) donde realizó una microencapsulación del extracto con diferentes polímeros y verificó la capacidad antioxidante de los flavonoides obtenidos mediante pruebas in vitro e in vivo. La capacidad antioxidante se realizó mediante el método DPPH donde establece que tiene una inhibición de radicales libres del 58% frente a la vitamina C.

Por otro lado, Bondía & Rosales (2020) determinó que una crema a base de extracto etanólico del mucílago de Aloe vera, del mesocarpio de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) y colágeno de las escamas de *Mugil cephalus* (lisa) presenta un 85.95% de cicatrización en ratones albinos durante 6 días de tratamiento.

Por último, Herrera (2018) concluyó que el extracto hidroalcohólico del fruto de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) tiene un efecto hepatoprotector en ratas con inducción a hepatotoxicidad, a las cuales se les administró una dosis de 500 mg/kg de extracto durante 5 días, dando resultados satisfactorios.

2.2 Definición de términos básicos

En este literal se elabora una revisión bibliográfica de términos básicos a partir de los cuales se sustenta esta investigación. Los términos básicos para considerar son: metabolitos secundarios, métodos de extracción de principios activos, tamizaje fitoquímico y técnicas instrumentales.

2.2.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son considerados un gran conjunto de compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas, las cuales poseen diferentes estructuras y funciones, estos no participan directamente en procesos fotosintéticos, pero estos, una vez extraídos tienen propiedades antitumorales, antibacteriales y antioxidantes que son ampliamente utilizados dentro de industrias farmacéuticas (Melo, 2014). A nivel ecológico la participación de los metabolitos secundarios juega un papel de supervivencia como individuo y genera un equilibrio en los ecosistemas. Los metabolitos secundarios más representativos son los flavonoides, quinonas, alcaloides, cumarinas, taninos, saponinas y aceites esenciales (Almaraz-Abarca et al., 2006).

2.2.2 Extracción de principios activos

Mientras que los métodos de extracción de principios activos se consideran como una separación de los componentes que poseen las sustancias por medio del contacto con un líquido específico, cabe recalcar que los principios activos pueden ser extraídos de diversas maneras para mejorar las ventajas terapéuticas de las mismas. El método de extracción depende del tipo de planta a utilizarse, propiedades farmacológicas y por último la concentración de principios activos que se desea obtener (Guerra, 2005).

2.2.3 Tamizaje fitoquímico

Dentro de este literal se menciona que la marcha fitoquímica tiene como finalidad el aislamiento e identificación de diferentes tipos de compuestos que biosintetiza una planta y que se conoce también como *screening* fitoquímico, estudio fitoquímico sistemático o tamizaje fitoquímico (Bosco, 2011). Esta marcha fitoquímica de los extractos vegetales es una secuencia de

aislamiento y purificaciones de compuestos presentes en una muestra vegetal que permite que sus moléculas den reacciones con determinados reactivos, descartando o afirmando su presencia (Miño & Jadán, 2007).

2.2.4 Técnicas instrumentales

Las técnicas instrumentales forman parte del análisis químico de una muestra con el fin de obtener la información requerida para la resolución de un problema analítico. Generalmente la instrumentación es de vital importancia para la producción y evaluación de nuevos productos que se lancen al mercado. Las técnicas instrumentales se dividen en tres áreas principales, las cuales son: espectroscopía, electroquímica y cromatografía. Cabe recalcar que dependiendo del trabajo experimental a realizar se ocupará la técnica adecuada para dicho experimento para que de esta manera se recolecten datos con un margen de error mínimo (Gomis, 2008).

2.3 Bases teóricas

2.3.1 *Ilex guayusa* Loes. (guayusa)

La especie *Ilex guayusa* es un árbol de acebo nativo de la Amazonía, se encuentra en elevaciones de hasta 2000 msnm registrado en Ecuador, Perú y Colombia. Fue descrita por Theodor Losener en el año de 1901 (Cobos, 2017). La guayusa es una planta de la cual se utilizan sus hojas secas para la elaboración de té medicinal que se le atribuye propiedades estimulantes y medicinales que ha sido usado siglos atrás y que pertenece a la tradición agro-silvícola del pueblo Kichwa amazónico del Ecuador (Crespo, 2013).

Es conocida con diferentes nombres como son: aguaysa, guayupa, guañusa, guayúsa, huayusa, wais (Shuar), wayus (Achuar), weisa (Jibaro) (Jarrett et al., 2012), es considerada una

planta sagrada y una fuente de vida debido a que esta planta se utilizaba en rituales importantes por varias comunidades indígenas, principalmente la Kichwa (Cobos, 2017).

2.3.1.1 Taxonomía

La tabla presentada a continuación detalla los datos taxonómicos de *Ilex guayusa* (guayusa).

Tabla 1

Descripción taxonómica de la planta guayusa

Nombre científico	<i>Ilex guayusa</i>
Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Orden	<i>Alquifoliales</i>
Familia	<i>Aquifoliaceae</i>
Genero	<i>Ilex</i>
Epíteto específico	Guayusa
Autor	Loes

Nota. Adaptado de “Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la guayusa (*Ilex guayusa* Loess.) del Cantón Pastaza por Caranqui Aldaz & Humanante (2011).

2.3.1.2 Descripción morfológica

Es un árbol perenne, nativo de la zona amazónica y también está presente en algunas zonas subtropicales y se encuentra ampliamente distribuido en América del Sur como es en Ecuador, Colombia, Brasil y Perú (Jørgensen & León, 1999). Esta especie tiene un tamaño promedio de 10 metros de altura con un diámetro de 50-80 centímetros, tiene un follaje denso y su copa es irregular. Las hojas son de color verde oscuro con una textura coriácea y de forma simple, mide alrededor de 15 centímetros de largo y 5 centímetros de ancho con un peciolo corto de 1 centímetro de largo. Su flor tiene una corola blanca verdosa con pétalos oscuros y con estambres con el mismo número que los pétalos y su fruto es una baya de color verde con un centímetro de ancho (García, 1992).

2.3.1.3 Composición química

Según el tamizaje fitoquímico realizado por (Radice & Vidari, 2007) permite evidenciar que las hojas de *Ilex guayusa* está compuesto por:

- Alcaloides
- Esteroides
- Terpenos
- Cumarinas
- Saponinas
- Fenoles
- Taninos
- Azúcares reductores
- Flavonoides
- Quinonas

2.3.1.4 Usos de la guayusa

- **Usos medicinales**

La guayusa generalmente es consumida en forma de té o infusión debido a sus efectos estimulantes y es comparada con el té verde por su alto contenido de cafeína y xantinas. Tiene propiedades digestivas que le confieren actividad una actividad eupéptica que ayuda a mejorar la digestión, es hipoglucemiante que al momento de consumir extractos de guayusa retarda la aparición de hiperglucemia y por lo tanto reduce síntomas de hiperfagia, pérdida de peso y actualmente la guayusa ha sido utilizada para el tratamiento de la diabetes. También se le confiere un uso antibacterial que dentro de comunidades indígenas ecuatorianas utilizan esta planta para tratar infecciones bacterianas y por último tiene una propiedad antioxidante que permite la eliminación de radicales peroxilo. En estos últimos años se ha tomado en cuenta la capacidad antioxidante de la guayusa para estudios extensivos de la misma (Carpintero & Salazar, 2014).

- **Usos ancestrales**

Esta planta se ha utilizado ampliamente como una bebida estimulante, en algunas comunidades indígenas le atribuyen el don de suerte y coraje porque las usan antes de ir de cacería, también ayuda a los indígenas a realizar largas caminatas debido a su propiedad energizante. Se le considera como afrodisiaco, restaurador del sistema reproductor femenino y se tiene la creencia que ayuda al éxito de ciertas empresas (Carpintero & Salazar, 2014).

2.3.2 *Hylocereus undatus* (pitahaya roja)

La pitahaya cuyo nombre científico es *Hylocereus spp* es conocida como “fruta del dragón”, es considerada una fruta exótica alrededor del mundo, por lo que su popularidad ha ido aumentando

significativamente en la última década y esto se atribuye gracias a sus características fisicoquímicas, nutricionales y sus compuestos bioactivos, los cuales permiten que esta fruta entre a la categoría de alimentos funcionales. Además, cabe destacar que es ampliamente utilizado por sus excelentes características organolépticas y su valor comercial agregado (Verona-Ruiz et al., 2020).

La pitahaya es una fruta nativa de Latinoamérica, la cual es en un 60% comestible y su cáscara representa un tercio de su peso, donde este último es considerado como un residuo. Tradicionalmente esta fruta se consume fresca aportando beneficios a la salud humana debido a su alta cantidad de antioxidantes como son los polifenoles y la vitamina C (Torres-Valenzuela et al., 2020).

La variedad *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) es rica en betacianinas y pigmentos naturales de color violáceo que generan un gran interés dentro del sector alimenticio, la pulpa de esta es ampliamente utilizada en bebidas por su agradable sabor y su alto contenido antioxidante, por otro lado, su cáscara presenta una composición química favorable que es candidato ideal para la fabricación de harina que es comúnmente utilizado como alimento de animales (Inga, 2022).

2.3.2.1 Taxonomía

La tabla presentada a continuación detalla los datos taxonómicos de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja).

Tabla 2

Descripción taxonómica de la pitahaya

Nombre científico	<i>Hylocereus undatus</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Familia	<i>Cactaceae</i>
Genero	<i>Hylocereus</i>
Especie	<i>H. undatus</i>
Nombre común	Pitahaya, pitaya, fruta del dragón

Nota. Adaptado de “Obtención de Pitahaya Amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum) ex Vaupel) Deshidratada Mediante el Tratamiento de Convección en la Vereda Jerico Municipio de Palestina Departamento del Huila” por Ortega (2020).

2.3.2.2 Descripción morfológica

La pitahaya es una planta trepadora, perenne y cactácea que mide alrededor de 2 m de altura, tiene forma de arbusto con cladodios que miden 1.50 m de largo y 0.06 m de ancho. Los tallos de esta planta son flexibles y triangulares con alto contenido en clorofila encargado de realizar la fotosíntesis y representa hasta un 94% de agua total de la planta. Las flores de la pitahaya miden

entre 2 a 4 cm envuelta de espinas con sépalos de color amarillo verdoso, el color de sus pétalos puede ser blancos, amarillos o rosados dependiendo de la variedad y tienen un aroma intenso a vainilla. Por último, el fruto mide alrededor de 15 cm de longitud con forma de baya ovoide envuelto en escamas y su peso varía entre los 170 a 450 gramos. En su interior presenta las semillas y tiene un sabor agradable (Guartatanga, 2022).

2.3.2.3 Composición química

Según una investigación bibliográfica de Verona-Ruiz y colaboradores (2020) la pitahaya está compuesta de:

- Betalainas
- Betacianinas
- Polisacáridos solubles en agua
- Oligosacáridos
- Azúcares
- Flavonoides
- Quinonas
- Pectinas
- Compuestos grasos

En cuanto a la cáscara se ha demostrado que tiene propiedades nutraceuticas donde se especifica que tiene el potencial para reducir el colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en la sangre de ratones *BALB/c macho*. Por otro lado, la cáscara de la pitahaya contiene pectinas las cuales son utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad de gelificación (Verona-Ruiz et al., 2020).

2.3.2.4 Usos de la pitahaya

Esta fruta se consume fresca con la mínima cantidad de conservantes, lo que hace que aporte beneficios a la salud humana aliviando los problemas estomacales y es altamente recomendada para pacientes con diabetes y problemas endocrinos. Por otro lado, tiene un alto contenido en captina que es útil para tratar complicaciones del corazón, además posee aceites naturales tanto en su pulpa como en las semillas que aporta un buen funcionamiento del sistema digestivo (efecto laxante) (Enciso, 2019).

La pitahaya posee propiedades nutricionales y medicinales que aporta al organismo micronutrientes que ayudan a fortalecer los huesos y dientes, además fortalece el sistema inmunológico por su alto contenido en vitamina C, promueve a la regeneración de colágeno y evita el envejecimiento prematuro debido a su capacidad antioxidante (Verona-Ruiz et al., 2020).

2.3.3 Flavonoides

Los compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas son comúnmente clasificados como metabolitos primarios y secundarios, donde los primeros tienen un papel esencial relacionado con la fotosíntesis, respiración, proceso de crecimiento y desarrollo de la planta, mientras que los metabolitos secundarios son aglomeraciones de sustancias que tienen estructuras diversas (Nader & Lozada, 2013).

A nivel industrial los metabolitos secundarios son de gran interés comercial y se clasifican en tres grandes grupos como son los terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Chinou, 2008). Estos tienen un uso analgésico, antibacteriano, antioxidante, antitumoral, inmunoestimulante, entre otros (Pérez & Jiménez, 2011).

Los flavonoides son representantes de un grupo de compuestos polifenólicos cuya estructura está conformado de benzo-Y-piranos. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y ejercen varias funciones como protección ante agentes patógenos y a los rayos UV. Su principal característica son sus colores llamativos que ayudan a la atracción de agentes polinizadores. Los flavonoides son el resultado de las vías metabólicas del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Gutiérrez-Venegas, 2018).

2.3.3.1 Composición

La estructura química de los flavonoides presenta dos anillos aromáticos bencénicos unido por una cadena de tres átomos de carbono denominada C6-C3-C6, pero también puede formar un tercer anillo, cuyos anillos se denominan A, B y C. La clasificación de este metabolito secundario va a depender de la sustitución en el anillo C formando así diferentes grupos de flavonoides, como son flavonoles, antiocianidinas, flavonas, flavononas e isoflavonas (Gutiérrez-Venegas, 2018).

2.3.3.2 Usos y su aplicación en la Industria Farmacéutica

Este metabolito secundario es de gran utilidad debido a que está libre de calorías y es recomendado para complementar la dieta de forma natural. Por otro lado, son ampliamente utilizados para prevenir enfermedades degenerativas y cardiovasculares, además que ayudan a fijar el cobre y hierro. Es bien sabido que los flavonoides poseen una alta capacidad antioxidante por lo que es fundamental consumirlos para evitar el envejecimiento prematuro y el estrés oxidativo (Guiance et al., 2021).

El valor agregado que ofrecen los flavonoides sobre la salud humana es de vital importancia debido a que estos poseen moléculas de carácter farmacológico como antiinflamatorios,

anticancerígenos y antioxidantes. Tal como es el caso de las isoflavonas que son considerados fitoestrógenos que pueden funcionar como estrógenos, por otro lado, se menciona que pueden ayudar con algunos tipos de cáncer, la pérdida ósea y la menopausia (C. Castillo, 2019).

La actividad fisiológica que presentan los flavonoides está estrechamente relacionada con la reducción del estrés oxidativo, de igual manera inhibe la oxidación del colesterol LDL, favorece a la agregación de plaquetas e inhibe la adherencia de los monocitos al endotelio vascular y según estudios recientes, se les atribuye propiedades antidiarreicas y antiseoretos que ayudan a mantener un buen sistema digestivo, por lo que son un foco de atención dentro de la industria farmacéutica (Arce, 2019).

Mediante una revisión bibliográfica realizado por Gutiérrez-Venegas (2018) menciona que el consumo de flavonoides reduce el riesgo de hipertensión y enfermedades cardiovasculares en pacientes geriátricos, dentro de este mismo contexto, se menciona que la ingesta de este metabolito secundario este asociado a la mejoría de la función endotelial, lo que provoca una vasodilatación efectiva. Por último, los flavonoides participan en la regulación de las cinasas y canales iónicos que inhiben la inflamación vascular.

2.3.3.3 Métodos de extracción

La extracción de los flavonoides generalmente se realiza mediante solventes orgánicos de alta polaridad como son el etanol o metanol debido a que estos arrastran grupos funcionales hidroxilo y carbonilo que son de interés en la industria farmacéutica (Guiance et al., 2021).

- **Maceración**

Es el contacto continuo durante cierto tiempo de la droga a utilizarse con el solvente (agua o etanol) constituyendo un conjunto, el cual es homogenizado, por lo tanto, el solvente actúa directamente sobre la droga, circulando en todas las direcciones y sentidos disolviendo los principios activos de esta hasta que se produzca un equilibrio con el contenido celular. Es considerada la extracción más simple, el conjunto debe estar protegido de la luz y debe agitarse continuamente (Carrión & García, 2010). El tiempo de la maceración depende del tipo de principio activo que se desea extraer. Esta forma de extracción se emplea en plantas con abundante mucilago (Guerra, 2005). Considerando la bibliografía consultada, se toma en cuenta que este método es el adecuado para extraer los principios activos de *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus*.

2.3.4 Tamizaje fitoquímico

La marcha fitoquímica o tamizaje fitoquímico es una secuencia de purificaciones y aislamientos de sustancias presentes en una muestra vegetal. Este proceso permite que ciertas moléculas que biosintetiza la planta reaccionen con determinados reactivos afirmando o descartando su presencia (Miño & Jadán, 2007).

Para la determinación cuantitativa de los distintos metabolitos secundarios se utilizan pruebas como:

2.3.4.1 Reacción de cloruro férrico para taninos

Funciona a través del reactivo Cloruro Férrico la cual proporciona una coloración amarillenta que indica la presencia de 1-OH, verde grisáceo 2-OH adyacentes y azul negro con 3-OH adyacentes (Ardoino et al., 2013).

2.3.4.2 Prueba de espuma para saponinas

Al agitar la muestra con una cierta cantidad de agua, se formará una espuma estable y abundante debido a que las saponinas tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua (Castillo et al., 2010)

2.3.4.3 Reacción de Bornträger para quinonas

Las soluciones que contienen quinonas reaccionan con la presencia de un medio acuoso alcalino, las cuales dan un color rojo (Bosco, 2011).

2.3.4.4 Prueba de Baljet para cumarinas

Se basa en la formación de un complejo entre ácido pícrico y las lactonas alfa y beta, la cual brinda una coloración naranja o rojo oscuro (Bosco, 2011).

2.3.4.5 Reacción de Dragendorff para alcaloides

Se utiliza el reactivo de Dragendorff para la identificación de alcaloides, el cual da la aparición de un precipitado de color rojo pardo-naranja, lo que asegura la presencia de alcaloides en la muestra (Ardoino et al., 2013).

2.3.4.6 Prueba de Shinoda para flavonoides

Los flavonoides que son tratados con ácido clorhídrico y magnesio dan un complejo coloreado (de rojo a pálido oscuro). Se añade alcohol isoamílico y se agita por lo tanto el color pasa a la capa del alcohol (Castañeda et al., 2008).

2.3.5 Técnicas instrumentales para determinar flavonoides

La cuantificación de los metabolitos secundarios es de gran importancia, ya que de esta manera se puede informar de aquellas especies de plantas medicinales que tienen propiedades terapéuticas o que poseen sustancias tóxicas en su composición. También se ha comprobado que la concentración de metabolitos secundarios presentes en plantas es indefinida, es decir, no hay un patrón máximo de producción, por lo tanto, es necesario monitorear estos valores para poder generar fitofármacos eficaces y seguros (Rojas et al., 2015).

2.3.5.1 Espectrofotometría de absorción

Uno de los métodos analíticos más utilizados para la cuantificación de flavonoides es la espectrofotometría de absorción, en concreto la espectroscopía UV visible, ya que es considerada uno de los métodos más accesibles, simples y útiles, mediante la cual se puede identificar y cuantificar biomoléculas en una solución en particular dando uso de reactivos específicos que al reaccionar con la solución forman un producto coloreado que permite detectarlo (Abril et al., 2000).

Este método se fundamenta en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y la cantidad de luz absorbida depende de la concentración de la muestra, de esta manera se cumple la ley de Lambert y Beer. Para realizar estas medidas se debe seleccionar una longitud de onda máxima de absorción de la muestra a usarse y posteriormente se mide la cantidad de luz absorbida por la misma en distintas concentraciones (Skoog et al., 2001).

2.3.5.2 Espectroscopia infrarroja de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja de Fourier (FTIR) es una técnica analítica que se basa en los estudios de la interacción entre la materia y la radiación de origen netamente infrarrojo. El espectro

del infrarrojo este compuesto por bandas o picos, donde el eje de las X representa los valores del intervalo de longitud de onda del infrarrojo medio, ya sea en nanómetros o en número de onda. Por otro lado, el eje Y se representa los valores de la intensidad de transmisión o absorción. Dentro del estudio de los grupos funcionales de las moléculas orgánicas, se utiliza una región del espectro situado entre 4000 y 1400 cm^{-1} para su cuantificación (Mondragón Cortez, 2017).

Esta técnica permite identificar especies químicas a través de la frecuencia, es decir el número de ondas, a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro (Córdova, 2017).

Capítulo III

Marco metodológico

3.1. Nivel de investigación

El presente estudio es una investigación aplicada, ya que está fundamentada en hallazgos tecnológicos de la investigación básica y adicionalmente cabe recalcar que este tipo de investigación promueve a la generación del conocimiento científico con una aplicación directa en el sector productivo. De la misma manera, el tipo de estudio a realizar es una investigación explicativa, la cual utiliza el método cuantitativo para establecer relaciones causa-efecto.

3.2 Población y muestra

Para el presente trabajo de investigación se considera una población finita y accesible correspondiente a dos kilogramos de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) respectivamente, las mismas que pasaran por un proceso de selección rigurosa, donde se toma en cuenta aquellas hojas y cáscaras de los patrones de estudio que no presenten daños en su estructura, de esta población se consideran dos muestras de 200 g de materia vegetal respectivamente para su posterior proceso de maceración con etanol al 96%.

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la investigación se utilizará diferentes técnicas como es el análisis documental, el cual maneja instrumentos como una búsqueda a través de: libros, tesis, revistas científicas, entre otras, bases de datos (Scopus, Scielo, E-libro), gestores de referencias bibliográfica (Mendeley), unidades de almacenamiento (OneDrive, memoria USB, Dropbox) y navegadores, una segunda

técnica a utilizar es el análisis de contenido, manejando instrumentos como cuadros de registros, clasificación de categorías, etc. Dentro de este mismo contexto, otra técnica es la observación no estructurada, donde sus instrumentos son cámaras (fotográfica y de video) y un diario de campo.

3.4 Métodos de manejo estadístico de datos

El método para el manejo estadístico de los datos se dará mediante la correlación de datos obtenidos de las dos especies de estudio. Por lo tanto, se considera un estudio transversal de muestras independientes con variables cuantitativas.

Una vez obtenidos los datos se procederá a realizar una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por lo que se trabajará con una muestra menor a 50 datos. Con este análisis estadístico se verificará si los datos tienen una distribución normal o no. En caso de que los datos tengan una distribución normal, se aplicará la prueba paramétrica de correlación de Pearson y en caso contrario se realizará la prueba no paramétrica Rho de Spearman.

3.5 Procedimientos experimentales

3.5.1 FASE 1: Obtención del extracto etanólico total de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y de las cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja)

Dentro de esta fase se menciona las siguientes actividades realizadas como fueron: la toma de las muestras vegetales, el tratamiento de las muestras vegetales, la maceración y obtención del extracto etanólico total (EET).

3.5.1.1 Recolección de las muestras vegetales de guayusa y pitahaya

Los dos kilogramos de hojas de guayusa se obtuvieron en el Mercado Central Macas perteneciente a la provincia de Morona Santiago. Para el presente estudio se procedió a utilizar solamente las hojas de la guayusa, debido a que varios autores consideran que la mayor capacidad antioxidante de la planta se encuentra en estas.

Mientras que los dos kilogramos de pitahaya se obtuvieron en el Mercado 9 de octubre ubicado en la ciudad de Cuenca. Cabe recalcar que solamente se usó la cáscara de esta fruta para el presente estudio.

3.5.1.2 Tratamiento de las muestras

- ***Ilex guayusa* Loes. (guayusa)**

Una vez obtenida la materia prima se realizó una clasificación de las hojas teniendo como criterio aquellas que no presentan laceraciones, posteriormente se procedió al lavado de la muestra vegetal con agua ultrapura por dos ocasiones, luego el material vegetal se colocó en mesones cubiertos con papel absorbente para eliminar el exceso de agua y finalmente se secaron las muestras durante 24 horas en una estufa a 50 °C.

Figura 1

Hojas de guayusa



Nota. Fotografía tomada en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Fuente: Autora

- ***Hylocereus undatus* (pitahaya roja)**

Se procedió a lavar y desinfectar el fruto de la pitahaya para su posterior descascarado. Una vez obtenida las cáscaras de mejor calidad, se procedió a lavar las muestras con agua ultrapura por dos ocasiones, posteriormente el material vegetal se colocó en mesones cubiertos con papel absorbente para eliminar el exceso de agua y finalmente se secaron las muestras durante 24 horas en una estufa a 50 °C.

Figura 2

Descascarado de la pitahaya



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Fuente: Autora

3.5.1.3 Maceración de las muestras y obtención del extracto etanólico total (EET)

Para la obtención del extracto etanólico total tanto de la guayusa como de las cáscaras de pitahaya se procedió a macerar 200 g de muestra vegetal seca y triturada con 600 mL de etanol al 96%, en frascos ámbar respectivamente. El tiempo de maceración fue de siete días con agitación de cuatro horas diarias mediante el equipo Rote Mix.

Figura 3

Maceración de Ilex guayusa e Hylocereus undatus



Nota. Fotografía tomada en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Fuente: Autora

Los extractos de guayusa y pitahaya obtenidos se filtran al vacío y se llevan al rotavapor a 73.3 °C para obtener un extracto total concentrado. Finalmente, el EET de la guayusa se somete a un proceso de eliminación de la clorofila, donde por cada 25 mL de EET se agrega 2 g de carbón activado granulado, se agita la mezcla durante 20 minutos, posteriormente se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 100 rpm y finalmente se filtra el exceso de carbón activado.

Figura 4

Filtrado al vacío de los EET de guayusa y pitahaya



Figura 5

Rotaevaporación del exceso de solvente de los EET



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Fuente: Autora.

3.5.2 FASE 2: Tamizaje fitoquímico

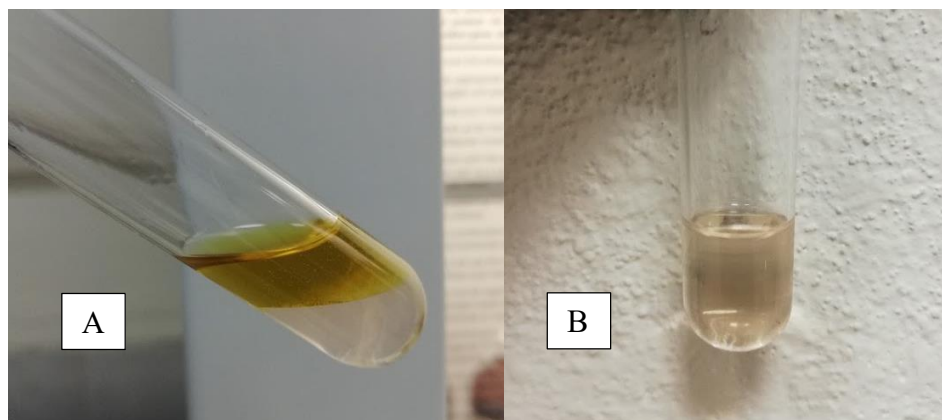
Una vez efectuada la extracción exhaustiva de ambos patrones de estudio, se realizó bioensayos específicos encaminados a demostrar la presencia de sustancias bioactivas. El proceso consta de la cualificación de los metabolitos secundarios que contienen las especies vegetales, así se logrará determinar: saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas y lactonas, quinonas.

a. Reacción de Shinoda – flavonoides

Se procedió a colocar 1 mL de cada EET en un tubo de ensayo respectivamente, posteriormente se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agregó un trozo de cinta de magnesio metálico, luego de cinco minutos se añadió 1 mL de alcohol amílico y se dejó reposar hasta que el alcohol se colorea de amarillo-naranja.

Figura 6

Prueba positiva para flavonoides



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. **A:** EET de guayusa, **B:** EET de pitahaya. Fuente: Autora.

b. Ensayo de Baljet – cumarinas y lactonas

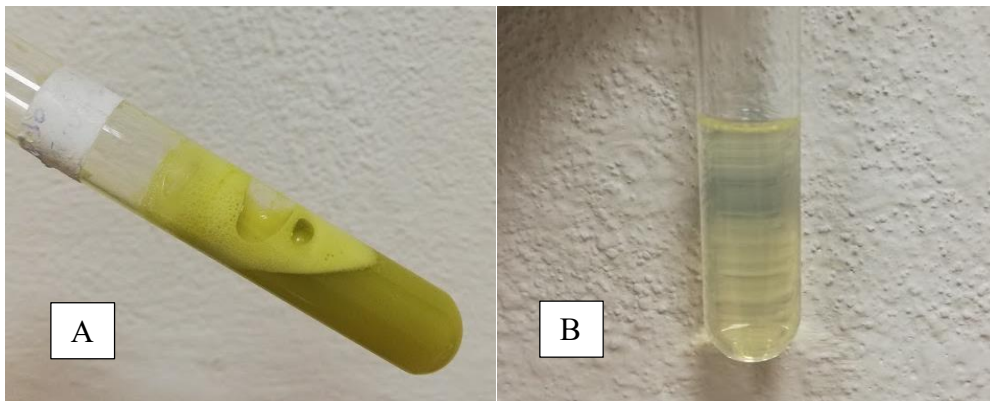
Se añadió 2 mL de cada EET en un tubo de ensayo respectivamente seguido de 1 mL de reactivo de Baljet. El ensayo se considera positivo si se observa un precipitado rojo al fondo del tubo.

c. Prueba de espuma – saponinas

Se colocó 1 mL de cada EET en un tubo de ensayo respectivamente que se diluyó con 5 mL de agua destilada y se agitó fuertemente la mezcla. La prueba es positiva si la espuma formada tiene por lo menos 2 mm de altura y tiene perdura por más de dos minutos.

Figura 7

Prueba de espuma para detección de saponinas



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. **A:** EET de guayusa positivo para saponinas, **B:** EET de pitahaya negativo para saponinas. Fuente: Autora.

d. Prueba de cloruro férrico – taninos

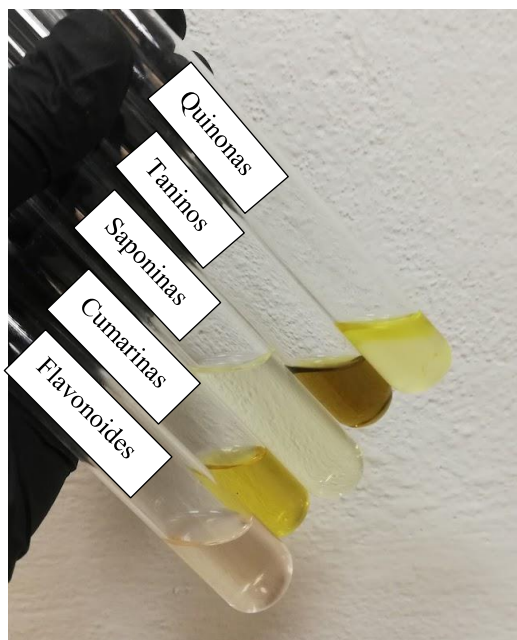
Se tomó 2 mL de cada EET en un tubo de ensayo respectivamente y se adicionó tres gotas de una solución de cloruro férrico al 5%. La prueba es positiva cuando se tiene una coloración verde intensa que demuestra la presencia de taninos de tipo pirocatecólicos y coloración azul para taninos tipo pirogalotánicos.

e. Ensayo de Borntrager – quinonas

Se evaporó el solvente de cada EET mediante baño maría y el residuo restante se disolvió con 1 mL de cloroformo y finalmente se añadió 0.5 mL de hidróxido de sodio al 5%. Se agitó para mezclar las fases y se dejó reposar hasta su separación. Se considera positivo el resultado cuando se presenta una coloración rosa.

Figura 8

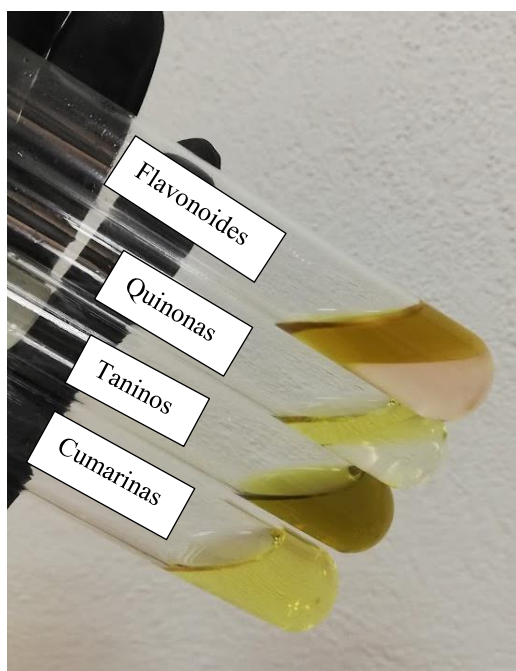
Tamizaje fitoquímico para el EET de pitahaya



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. **Flavonoides** positivos, **Cumarinas** negativo, **Saponinas** negativo, **Taninos** positivo, **Quinonas** negativo. Fuente: Autora.

Figura 9

Tamizaje fitoquímico del EET de guayusa



Nota. Fotografías tomadas en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. **Flavonoides** positivos, **Cumarinas** negativo, **Taninos** positivo, **Quinonas** negativo. Fuente: Autora.

3.5.5 FASE 3: Análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales

3.6.5.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya

Para la cualificación de los flavonoides mediante FTIR se realizó una purificación previa para obtener mejor calidad en los resultados para lo cual, los EET fueron purificados mediante cromatografía de columna, la cual consistía en una pequeña cantidad de algodón en la parte inferior seguida por 1cm de arena fina, posteriormente se introdujo 15 g de sílica gel MESH con 30 g de solvente, luego se dejó caer el eluyente para que la fase estacionaria (sílica gel) quede hidratado y empaquetado. Finalmente, en la parte superior se colocó 10 mL del extracto etanólico total, seguido

del solvente. El extracto colocado pasa a través de la columna por el efecto de la gravedad manteniendo así un equilibrio entre el solvente que fluye dentro de la columna y el soluto adsorbido en la fase estacionaria. Cabe recalcar que el solvente utilizado fue metanol. Una vez obtenido los extractos purificados se rota evaporaron para eliminar la mayor cantidad de solvente excedente.

La técnica instrumental consta en colocar una gota del extracto etanólico de los patrones de estudio directamente en el diamante con un número de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} . Para obtener mejores resultados se debe realizar al menos tres repeticiones por experimento. Entre determinaciones, el diamante debe ser cuidadosamente limpiado para evitar errores en la lectura de datos.

3.5.5.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS

Para la cuantificación de flavonoides de las fracciones etanólica se sigue el manual de Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas de Rojas y colaboradores (2015) de la Universidad de Machala, siguiendo el siguiente protocolo:

a. Preparación de la curva de calibración

A partir de una solución de $AlCl_3$ al 2% y una solución de rutina con quercetina a 200 ppm, se elaboró la curva de calibración, preparando soluciones estándares a concentraciones de 10, 20, 25, 40 y 50 ppm, donde se toma 1 mL de la solución de quercetina se añade 1 mL de $AlCl_3$ seguido de 1 mL de MeOH. Posteriormente se prepara el blanco para calibrar el espectrofotómetro con 1.5 mL de MeOH y 1.5 mL de $AlCl_3$. Todas las soluciones preparadas se colocan en frascos ámbar envueltos en papel aluminio y se deja reposar por una hora. Finalmente, se leen las absorbancias a 420 nm.

b. Análisis de la muestra

Se añade 0.5mL de la fracción que se va a analizar en un tubo de ensayo, se agrega 1mL de $AlCl_3$ al 2% y 1.5mL de MeOH, posteriormente se deja reposar una hora y se lee en el espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-630) a 420 nm. Se debe realizar la muestra por triplicado.

Para calcular las concentraciones de flavonoides en la muestra se utiliza la ecuación de la curva de calibración, las cuales se expresan como mg de quercetina/g de extracto vegetal de la especie.

Capítulo IV

Resultados y discusión

4.1 FASE 1: Obtención del extracto etanólico total de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y de las cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) mediante maceración

Mediante el proceso de maceración tanto de las hojas de guayusa como de las cáscaras de pitahaya se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 3

Datos de la obtención de los EET de guayusa y pitahaya

Especie vegetal utilizada	Peso de la muestra triturada (g)	Volumen del EET obtenido mediante maceración (mL)
<i>Ilex guayusa</i> Loes. (guayusa)	200	80
<i>Hylocereus undatus</i> (pitahaya roja)	200	80

Fuente: Autora

En la tabla 3 se puede evidenciar que a partir de 200 g de hojas de *Ilex guayusa* y cáscaras de *Hylocereus undatus* se obtuvo 80 mL de extracto etanólico respectivamente mediante el método de maceración, cabe recalcar que este volumen final fue conseguido después del proceso de rota evaporación. Según Flores y colaboradores (2016) la maceración etanólica tiene como ventaja la extracción de la mayor parte de los principios activos, debido a que se obtiene mejores niveles de estabilidad y selectividad enfocado hacia los compuestos fenólicos de interés como es el caso de los flavonoides, por otra parte, también se obtiene mayor eficiencia de extracción.

4.2 FASE 2: Tamizaje fitoquímico

Una vez finalizadas las pruebas respectivas para cada bioactivo se obtuvo los siguientes resultados estipulados en la tabla 4 que se muestra a continuación:

Tabla 4

Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico

Metabolito secundario	<i>Ilex guayusa</i> (guayusa)	<i>Hylocereus undatus</i> (pitahaya roja)
Flavonoides	+	+
Cumarinas	-	-
Lactonas	-	-
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Quinonas	-	-

Nota. (+) Presencia del metabolito secundario (-) Ausencia del metabolito secundario. Fuente: Autora

La presencia de compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos se evidenció en los ETT de la guayusa y pitahaya. Por un lado, se evidenció la presencia de flavonoides mediante la prueba de Shinoda proporcionando un color amarillo-naranja indicando su positividad, mientras que con la prueba con cloruro férrico se verificó la presencia de taninos por su coloración verde

intensa. Por otra parte, se demostró la existencia de saponinas solamente en el EET de *Ilex guayusa* mediante la prueba de espuma. Según Azmir et al. (2013), el solvente etanol es utilizado para la extracción de compuestos de interés como son los taninos, flavonoides, polifenoles, terpenoides y saponinas.

4.3 FASE 3: Análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales

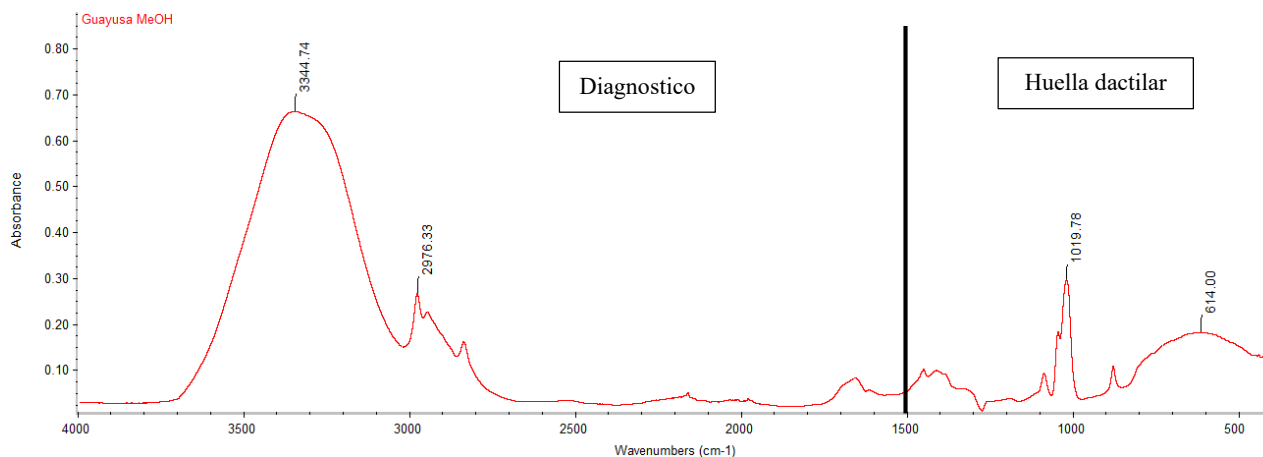
4.3.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya

Los grupos funcionales absorben la radiación en un intervalo específico de frecuencias, la región comprendida entre 4000 y 1500 cm^{-1} se considera la zona de diagnóstico que facilita la identificación del espectro a analizar, mientras que la región entre 1500 y 600 cm^{-1} se denomina huella dactilar y es aquella que presenta vibraciones de enlace propias de la muestra por lo que, esta zona es diferente en cada compuesto que se analice (Cortez, 2020).

4.3.1.1 Espectro IR de *Ilex guayusa* Loes.

Figura 10

Espectro IR de *Ilex guayusa* Loes.



Fuente: Autora

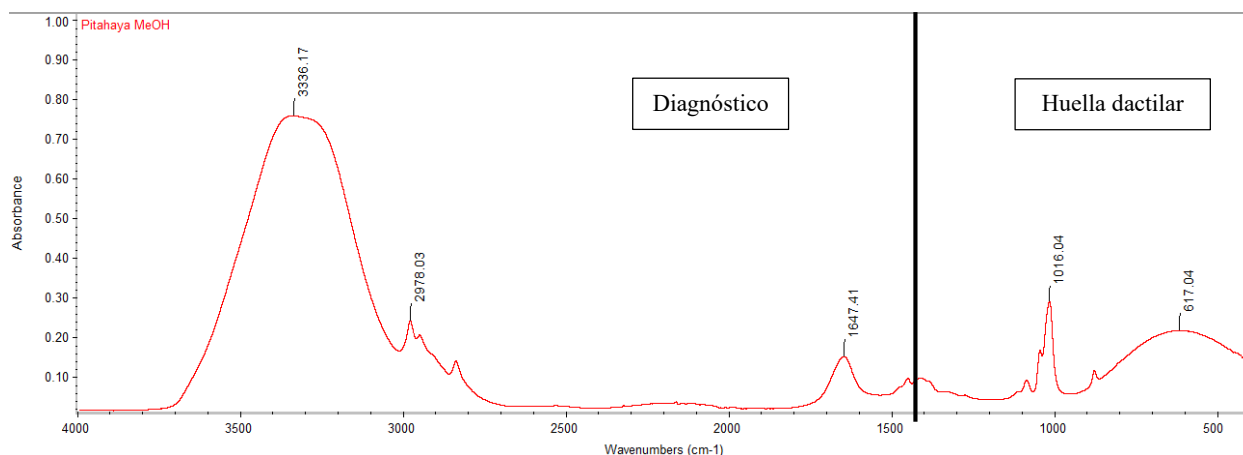
En la figura 10 en la zona de diagnóstico se puede apreciar un estiramiento amplio en la región de 4000-2300 cm^{-1} con un número de onda de 3344.74 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de los grupos O-H que están estrechamente asociados con alcoholes, fenoles y a moléculas de agua. Por otro lado, se observa un estiramiento en la región 3000-2800 cm^{-1} con un número de onda de 2976.33 cm^{-1} la cual tiene una apariencia puntiaguda asimétrica que se asocia a las vibraciones de los grupos C-H característico del flavonoide rutinosa. Mientras que en la región 2000-1500 cm^{-1} presenta un estiramiento con baja intensidad con un número de onda aproximado de 1660 cm^{-1} perteneciente a el enlace C=N (Cortez, 2020).

En el área de la huella dactilar se observan varios estiramientos por lo cual, se consideran los más representativos para su análisis. Se presenta un estiramiento con un número de onda de 1019.78 cm^{-1} que se asocia con alcoholes primarios. Por otro lado, se observa un estiramiento amplio con un número de onda de 614 cm^{-1} que se asocia con la molécula H-O-H que es básicamente agua, cabe aclarar que la mayoría de alimentos contiene agua por lo que en este análisis se ve reflejado (Cortez, 2020).

4.3.1.2 Espectro IR de las cáscaras de *Hylocereus undatus*

Figura 11

Espectro IR de las cáscaras de Hylocereus undatus



Fuente: Autora

En la figura 11 en la zona de diagnóstico se puede apreciar un estiramiento amplio en la región de 4000-2300 cm^{-1} con un número de onda de 3346.17 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de los grupos O-H que están estrechamente asociados con alcoholes, fenoles y a moléculas de agua. Por otro lado, se observa un estiramiento en la región 3000-2800 cm^{-1} con un número de onda de 2976.03 cm^{-1} la cual tiene una apariencia puntiaguda asimétrica que se asocia a las vibraciones de los grupos C-H. Esta última absorción se asocia con la vibración asimétrica perteneciente al flavonoide rutinosa. Finalizando se observa un estiramiento en la región de 1830-1530 cm^{-1} con un número de onda de 1674.41 cm^{-1} perteneciente a grupos carbonilo C=O (Cortez, 2020).

En el área de la huella dactilar se observan varios estiramientos por lo cual, se consideran los más representativos para su análisis. Se presenta un estiramiento con un número de onda de 1016.04 cm^{-1} que se asocia con alcoholes primarios (Cortez, 2020).

Tabla 5

Resumen de las principales frecuencias observadas en Ilex guayusa e Hylocereus undatus y sus grupos funcionales

Especie	Numero de onda	Grupo funcional	Compuesto
<i>Ilex guayusa</i> Loes.	3344.74 cm^{-1}	O-H	Fenoles, alcoholes y moléculas de agua
	2976.33 cm^{-1}	C-H	Flavonoides como la rutinosa
	1019.78 cm^{-1}	-OH	Alcoholes primarios
	614 cm^{-1}	H-O-H	Agua
<i>Hylocereus undatus</i>	3346.17 cm^{-1}	O-H	Fenoles, alcoholes y moléculas de agua
	2976.03 cm^{-1}	C-H	Flavonoides como la rutinosa
	1016.04 cm^{-1}	-OH	Alcoholes primarios
	617.04 cm^{-1}	H-O-H	Agua

Fuente: Autora

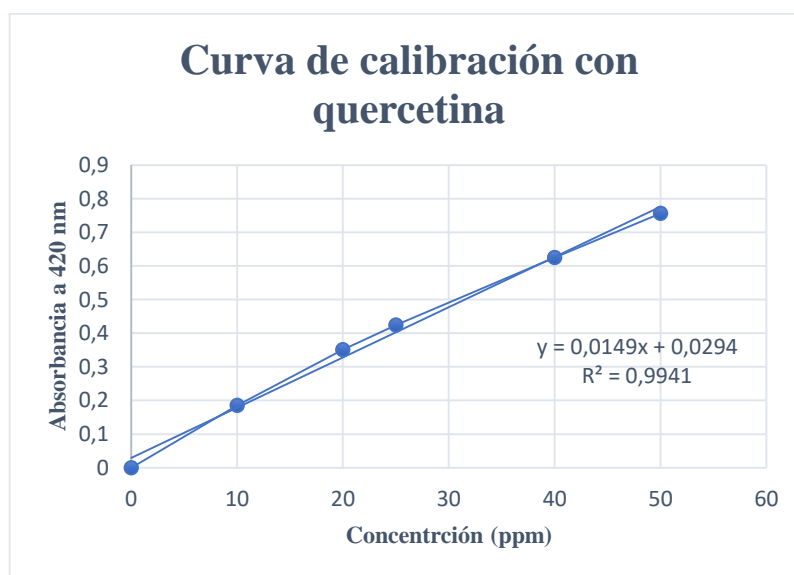
Mediante una revisión bibliográfica sobre espectros IR se llega a la conclusión que este tipo de análisis en hojas de guayusa y cáscaras de pitahaya mediante FTIR no se ha realizado con anterioridad, por lo que los datos obtenidos en este estudio se compararon con la base de datos “Spectral Database for Organic Compounds SDBS”

4.3.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS

La curva de calibración para determinar flavonoides totales se realizó mediante el estándar de quercetina, como se indica en la siguiente figura.

Figura 12

Curva de calibración con quercetina



Fuente: Autora

Mediante la ecuación de la recta $y = 0.0149x - 0.0294$ de la curva de calibración, se calculó los miligramos de quercetina por gramo de muestra vegetal.

Tabla 6

Concentración de flavonoides presentes en Ilex guayusa e Hylocereus undatus

Especie vegetal	Absorbancia a 420 nm			Absorbancia promedio	Concentración mg/mL	Concentración mg/g
<i>Hylocereus undatus</i>	0.0662	0.0606	0.0674	0.0647	0.0353	5.49
<i>Ilex guayusa</i>	0.0811	0.0726	0.0779	0.0772	0,0478	7.43

Fuente: Autora

Los datos de la tabla 5 revelan que el EET de la especie *Ilex guayusa* contiene una concentración de 7.43 mg/g este resultado se puede comparar con el estudio realizado por Palchizaca (2019) donde obtiene una concentración de 7.50 mg/g cuyo resultado es similar al obtenido. Se demuestra la presencia de flavonoides en cantidades significativas, por lo que se considera apto para su uso en la industria farmacéutica.

En cuanto a la cuantificación de los flavonoides en el EET de las cáscaras *Hylocereus undatus* se establece una concentración de 5.49 mg/g, el cual se asemeja al estudio Auquilla (2021) donde describe una concentración de 5.60 mg/g en las cáscaras de *Selenicereus megalanthus* dando a conocer que esta especie vegetal indistintamente de su especie, tiene un alto contenido de flavonoides en su cáscara.

4.4. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis inferencial, el cual utiliza la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, por lo que se trabaja con una muestra menor a 50 datos. A partir de la concentración de flavonoides, se plantea las siguientes hipótesis:

$$H_o = \text{Los datos tienen una distribución normal}$$

$$H_a = \text{Los datos no tienen una distribución normal}$$

La tabla 6 expone que el coeficiente de Shapiro-Wilk es igual a cero, por lo tanto, se rechaza hipótesis nula debido a que el tamaño de la muestra es muy pequeño, por lo tanto, se determina que los datos no tienen una distribución normal y se procede a realizar la correlación de Rho de Spearman.

Tabla 7

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Especie vegetal	X_i	$(X_i - Med)^2$	a_i	X_i INV	Dif ($X_i - X_i$ INV)	Coeficiente de SW
Pitahaya	5.49	0.9409	0.7071	7.43	-1.94	0
Guayusa	7.43	0.9409		5.49		

- **Correlación de Rho de Spearman**

Dentro de esta prueba se verifica la correlación que existe entre los datos obtenidos de las especies vegetales, para esto se aplica la siguiente fórmula:

$$rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2 - 1)}$$

Tabla 8

Datos de la correlación de Spearman

Pitahaya (x)	Guayusa (y)	D	D²
0.0353	0.0478	-0.0125	0.00015625

Fuente: Autora

Para llegar a la interpretación del resultado se debe tener en cuenta que los valores que sean próximos a +1 establecen una correlación fuerte y positiva, mientras que los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa (Martínez et al., 2009).

Reemplazando los datos en la fórmula establecida se obtiene una correlación de +1, esto indica que la dirección de la relación es positiva, por lo tanto, se concluye que la correlación entre estas dos especies vegetales en cuanto a la cantidad de flavonoides que poseen es fuerte.

4.5 FASE 4: Propuesta de un fármaco a base de flavonoides extraídos de *Ilex guayusa* y cáscaras de *Hylocereus undatus*

Considerando el efecto antioxidante que tienen los flavonoides en general, se puede proponer un fármaco que prevenga o retarde la oxidación, dentro de la industria existen varias opciones de fármacos antioxidantes, como son los provenientes de la N-acetil cisteína donde se caracteriza principalmente por su efecto antioxidante de gran eficacia, la cual actúa por efectos directos y por medio de emulación de la vida de glutatión (Gillissen, 2011).

Los antioxidantes de este tipo son producidos en laboratorios por medio de síntesis química y son usualmente modificados para su aplicación dentro de la industria farmacéutica y alimenticia (Cruz, 2017). Dentro estos tenemos el BHT (Butilhidroxitolueno) y BHA

(Butilhidroxianisol), los cuales son antioxidantes fenólicos monovalentes y son altamente solubles en grasas e insolubles en agua. El BHA se lo puede encontrar en una presentación de copos de cera blanca, mientras que el BHT como un compuesto cristalino de color blanco (Villanueva et al., 2017).

Sin embargo, cabe recalcar que hoy en día estos compuestos están siendo cuestionados y estudios clínicos han demostrado que varios de ellos causan efectos nocivos a la salud a largo plazo, actualmente existen restricciones legales levantadas a estos productos (Velasco et al., 2007).

A partir de las hojas *Ilex guayusa* (guayusa) y cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) se puede extraer flavonoides en cantidades considerables para comenzar un diseño racional de fármacos donde se encuentren compuestos específicos para el tratamiento de enfermedades, generalmente esto comienza desde el estudio de plantas medicinales que pueden aportar compuestos cabeza de serie que actúe directamente en una diana específica minimizando efectos secundarios y potenciando su eficacia.

Dentro de este mismo contexto, el presente estudio se propone una formulación en presentación de gotas orales ya que su fabricación es sencilla y reproducible como lo describe Gómez (2013) en su trabajo experimental, donde se ocuparía un jarabe simple como base donde se agregaría el metabolito secundario obtenido mezclando parabenos, propilenglicol, glicerina, EDTA y saborizante. Cabe recalcar que la fabricación de este fármaco estaría sujeto a control de calidad exhaustivo bajo las normas ARCSA.

Se considera que la disponibilidad de este material vegetal es alta, debido a que la guayusa y la pitahaya son ampliamente cultivado en el Ecuador y que su uso está enfocado a la industria

alimentaria, por lo que aprovechar estas especies es fundamental para obtener beneficios a largo plazo dentro de la industria farmacéutica.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

- Analizar flavonoides provenientes de las plantas *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) para su posible aplicación en productos farmacéuticos se obtuvieron resultados favorables que dan paso a una posterior investigación y formulación de un antioxidante proveniente de las especies estudiadas, considerando que tanto las hojas de guayusa como las cáscaras de pitahaya son asequibles.
- En los extractos etanólicos totales de las hojas de guayusa y de las cáscaras de pitahaya se comprobó la presencia de flavonoides y taninos mediante un tamizaje fitoquímico.
- Se empleó dos técnicas instrumentales para el análisis de los flavonoides, la primera fue espectrofotometría UV-VIS donde se obtuvo la concentración de los flavonoides presentes en la guayusa y pitahaya. Por otro lado, mediante la espectroscopia infrarroja FTIR se analizó los espectros IR de las especies donde se comprobó la presencia de grupos funcionales asociados a fenoles, alcoholes, moléculas de agua y flavonoides, debido a los datos obtenidos en este estudio, el uso de estas especies vegetales es apto para emplearse en la industria por su alto contenido de este metabolito secundario.
- Se propuso una posible formulación de producto farmacéutico antioxidante en presentación de gotas orales a partir de flavonoides extraídos de las hojas de *Ilex guayusa* y de las cáscaras de *Hylocereus undatus*. Esta propuesta se debe a los resultados obtenidos y a la revisión bibliográfica realizada que indica que la concentración de flavonoides encontrados en las especies vegetales es alta y tienen una correlación positiva y fuerte, además que este

grupo específico de flavonoides tiene propiedades antioxidantes aprovechables para la industria farmacéutica.

Recomendaciones

- Se sugiere seguir con los estudios de las especies *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus* debido que poseen propiedades estimulantes y antibacterianas, además de la propiedad antioxidante ya demostrada en varios estudios.
- Se propone realizar otros tipos de extracción y purificación que permita tener un mejor aislamiento de los flavonoides presentes en la guayusa y las cáscaras de pitahaya.
- Por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes en *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus* se recomienda realizar un análisis cuantitativo de cada bioactivo para conocer sus posibles propiedades terapéuticas y de esta manera ser utilizados en la industria farmacéutica.
- Finalmente, se aconseja iniciar la formulación del producto farmacéutico propuesto en esta investigación.

Bibliografía

- Abril, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez, F., & Túnez, I. (2000). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Acebo, M., Quezada, A., Rodríguez, J., Méndez, S., & Quijano, J. (2018). *Industria farmacéutica. Estudios Industriales. Orientación estratégica para la toma de decisiones*.
- Almaraz-Abarca, N., Ávila Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E. A., Naranjo-Jiménez, N., & Herrera-Corral, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. Vidsupra, 1*, 39–50.
- Ansaloni, R., & Orellana, A. (2010). *Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal, February 2017*.
- Arauz, Y. M. (2019). *Oportunidades de exportación productos no tradicionales caso de estudio produccion de pitahaya roja de la parroquia Puerto Cayo* [Proyecto de Investigación]. Universidad Estatal del Sur de Manabí “UNESUM.”
- Arce, V. (2019). *Extracción y caracterización de los flavonoides obtenidos de la cáscara del fruto cacao (Theobroma cacao L.) para su valorización* [Escuela de Tecnología en Alimentos]. Universidad de Costa Rica.

- Ardoino, S., Boeris, M., & Toso, R. (2013). *Caracterización fitoquímica de Prosopis flexuosa var. flexuosa (algarrobo) y Prosopis flexuosa var. depressa (alpataco), plantas con acción farmacológica. Revista Ciencias Veterinarias, 1*, 115–125.
- Arias, Angeline., & Auz, A. (2022). *Análisis bibliográfico del uso de colorantes de cáscara de pitahaya roja (Hylocereus undatus) frente a colorantes sintéticos.* www.fcq.ug.edu.ec
- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). *Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from Ilex guayusa Loes. leaves using response surface methodology. Heliyon, 6(1).* <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Aquilla, D. (2021). *Evaluación de fenoles y flavonoides totales en las cáscaras del fruto Cereus undatus Haw y de Selenicereus megalanthus.* Universidad Central del Ecuador.
- Averno, M., & Cisternas, I. (2010). *Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile.* <http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v138n10/art14.pdf>
- Azahuanche, F. P., & Aponte, G. L. (2016). *Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú Preliminary phytochemical study of medicinal plants from the northern of Peru. 22(2)*, 421–426.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, 117(4)*, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L. De, & Macía, M. J. (2008). *Introducción.* 1–3.

- Barreto, Y. (2021). *Capacidad antioxidante del zumo de Hylocereus megalanthus (Pitahaya amarilla) y Hylocereus undatus (Pitahaya roja)*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Becerra, M. (2014). *Costumbres y prácticas que utilizan los agentes de la medicina ancestral y su relación en la salud de los moradores, en la parroquia chinga recinto chigiüe de la provincia de esmeraldas del años 2014*.
- Bondia, A., & Rosales, M. (2020). *Efecto cicatrizante de una crema a base de extracto etanólico del mucílago de Aloe vera (sábila), del mesocarpio de Selenicereus megalanthus (pitahaya amarilla) y colágeno extraído de las escamas de Mugil cephalus (lisa) en ratones albinos*.
- Bosco, U. N. de la P. S. Juan. (2011). Extracción y fraccionamiento. In *Farmacognosia* (pp. 51–62).
- Caranqui Aldaz, J., & Humanante, A. (2011). *Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la guayusa (Ilex guayusa Loess.) del Cantón Pastaza*.
- Carpintero, N., & Salazar, M. E. (2014). *Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto alcohólico foliar de Guayusa, Ilex guayusa Loes (AQUIFOLIACEAE)*.
- Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica* [Escuela de Bioquímica y Farmacia]. Universidad de Cuenca.
- Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., Ibañez, L., Fujita, R., Barnett, & Mendoza, E. (2008). *Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglicemiante*. *Revista Horizonte Médico*, 8(1).

Castillo, C. (2019). *Efecto de la aplicación de Azotobacter chroococcum, Azotobacter vinelandii y Pseudomonas fluorescens sobre la producción de Flavonoides en Calendula officinalis* [Departamento de Microbiología]. Pontificia Universidad Javeriana.

Castillo, E., Castillo, S., & Reyes, C. (2010). Estudio Fitoquímico De Plukenetia Volubilis L Y Su Efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe^{3+} /ascorbato en hígado de *Rattus rattus var. albinus*. *UCV-Scientia*, 2, 11–21.

Chino, Y. (2020). *Composición química y efecto terapéutico de pitahaya (Hylocereus undatus)* Arequipa-2020.

Chinou, I. (2008). *Primary and secondary metabolites and their biological activity*.

Chumbia, G., & Kuamar, A. (2019). *Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en Guayusa (Ilex guayusa Loes) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína*.
<https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/711/1/T.AGROIN.B.UEA.0077.pdf>

Cobos, L. (2017). *Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa (Ilex guayusa)*. Universidad Central del Ecuador.

Córdova, L. (2017). *Métodos para separar, identificar y caracterizar una mezcla binaria constituida por flavonoides Naringenina y Quercetina*. Universidad Técnica de Machala.

Cortez, PM. (2020). *Cap 6 Análisis de los espectros de infrarrojo*.

Crespo, J. M., Vila, D., Karkras, A., Tasiguano, A. L., Cachiguango, G., Lema, A., Yamberla, C., Rosero, F., Villareal, E., Anton, J., Jara, C., Cuji, F. C., Moya, R., Nogales, F., Herrera, L.,

- Escobar, Z., Zaragocín, S., Alvarez, F., Alvarez, J., ... Rodríguez, R. (2014). Saberes Y Conocimientos Ancestrales, Tradicionales Y Populares. *Stream* 5:, 20, 48. <http://floksoociety.org/docs/Espanol/5/5.3.pdf>
- Crespo, P. (2013). *La guayusa. Trayectoria y Sentido*.
- Cruz, J. (2015). *Determinación de fenoles y flavonoides en extractos de hojas de plantas con actividad antioxidante empleando espectroscopia FTIR y análisis multivariado*. Instituto Politécnico Nacional.
- Cueva, R. (2020). *Evaluación de las propiedades físico químicas y microbiológicas, en la harina de cáscara de pitahaya (Selenicereus undatus (haw) d.r. hunt) para uso de raciones alimenticias de animales*. Universidad Estatal Amazonica .
- Enciso, M. (2019). *Elaboración de pulpa de pitahaya fortificada con hierro y usos en la industria alimentaria*.
- Figueroa, J. (2020). *Microencapsulación de antocianinas con actividad antioxidante extraídas a partir de la cáscara de pitahaya roja (Hylocereus undatus)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Flores, H., León, C., Estarrón, E., & Orozco, I. (2016). *Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (Lippia graveolens HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR)*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 1–14.
- Flores, M. (2019). *Elaboración de un endulzante a base de miel de caña de azúcar (Saccharum officinarum) enriquecido con jengibre (Zingiber officinale) y guayusa (Ilex guayusa)*.

- García, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica*.
- García, L. (2020). *Estudio de metabolitos secundarios presentes en Ilex guayusa, Ilex paraguariensis, Passiflora tripartita f mollissima y Passiflora tarminiana y su posible efecto sobre Helicobacter pylori. Análisis bibliográfico y computacional*.
- Gillissen, A. (2011). *Principios de la Acción Antiinflamatoria de la N-Acetilcisteína y sus Posibles Usos Terapéuticos*. *Siic*, 65(9), 549–557.
- Gómez, J. Carlos. (2013). *Influencia de los factores físicos y del material de envase en la estabilidad de Ácido ascórbico en gotas orales*. [Carrera de Química farmacéutica]. Universidad Central del Ecuador.
- Gomis, V. (2008). *Tema 1. Introducción a las técnicas Instrumentales en el análisis instrumental*.
- Guartatanga, C. D. (2022). *Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de la pulpa del fruto de pitahaya (Cereus sp.) producida en la provincia de Morona Santiago para posible uso en la industria alimentaria*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Guerra, A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades Físico-Químicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como tinturas del Rizoma y de la Fronda de Calahuala (Phelebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Guiance, H., Marino, ;, Isern, ;, Coria, ;, & Irurzun, ; (2021). *Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales*.

- Gutiérrez-Venegas, G. (2018). Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 94–101.
- Herrera, S. (2018). *Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcoholico del fruto Selenicereus megalanthus “Pitaya” en ratas con inducción a hepatotoxicidad agudo.*
- Inga, E. (2022). *Comparación de métodos de deshidratado para obtener harina de cáscara de pitahaya de dos variedades de pitahaya con potencial bioactivo* [Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. <https://orcid.org/0000-0003-2203-0465>
- Jarrett, C., Shiguango, M., & Salazar, E. (2012). Guayusa traditions in Napo Runa, Culture. Ecuador. *Nuestra Amazonia*.
- Jørgensen, P. M., & León, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot.*, 1–1182.
- Maldonado, M. E. (2020). *Evaluación de la concentración de cafeína en capsulas preparadas a partir de extracto fluido de Ilex guayusa mediante espectrofotometría UV.*
- Martínez, R., Tuya, L., Martínez, M., Pérez, A., & Cánovas, A. (2009). El coeficiente de correlacion de los rangos de Spearman caracterización. *Rev Haban Cienc Méd La Habana*, VIII(2), 1–19.
- Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes.* Universidad San Francisco de Quito.
- Miño, G., & Jadán, M. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1226/1/T-ESPE-025146.pdf>
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1226>

Mondragón Cortez, P. (2017). *Espectroscopía de infrarrojo para todos...y 51 espectros de alimentos consumidos en México.*

Nader, B., & Lozada, J. (2013). *Metabolitos secundarios.*

Ortega, F. (2020). *Obtención de Pitahaya Amarilla (Selenicereus megalanthus (K. Schum) ex Vaupel) Deshidratada Mediante el Tratamiento de Convección en la Vereda Jerico Municipio de Palestina Departamento del Huila.*

Palchizaca, M. (2019a). “*Evaluación del efecto antiinflamatorio de Ilex guayusa (Loes), Vernonia patens (Kunt) y Theobroma cacao (Linneo) en el modelo animal rata (Rattus norvegicus) de laboratorio*” [Escuela de Bioquímica y Farmacia]. Universidad Superior Politécnica de Chimborazo.

Palchizaca, M. (2019b). *Evaluación del efecto antiinflamatorio de Ilex guayusa (Loes), Vernonia patens (Kunth) Y Theobroma cacao (Linneo) en el modelo animal rata (Rattus norvegicus) de laboratorio.*

Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.

Radice, M., & Vidari, G. (2007). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial.*

- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas*.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (5th ed.). McGRAW-HILL.
- Torres-Valenzuela, L. S., Serna-Jiménez, J. A., Pinto, V., & Vargas, D. (2020). Evaluación de condiciones de extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de cáscara de pitahaya amarilla. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(1), 70–83. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a6>
- Utreras, V. (2019). *Determinación de la concentración mínima de fenoles presentes en extractos etanólicos de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes.) con mayor actividad inhibitoria en las enzimas α - y β -glucosidasa*. Universidad Central del Ecuador.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>
- Venegas, E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Ucv-Scientia*, 4(2), 161–174.
- Vera, G. (2020). *Evaluación de la influencia del pH para la extracción de pectina en la cáscara de pitahaya (Selenicereus undatus (HAW) DR HUNT)*. Universidad Estatal Amazónica.
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>

Villanueva, E., Rodríguez, G., Aguirre, E., & Castro, V. (2017). Influence of antioxidants on oxidative stability of the oil Chia (*Salvia hispanica* L.) by rancimat. *Scientia Agropecuaria*, 8, 19–27. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.02>

Wise, G., & Negrin, A. (2020). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2393–2404. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>

ANEXOS

Análisis de flavonoides en *Ilex guayusa* Loes. (Guayusa) y cáscaras de *Hylocereus undatus* (Pitahaya roja) con técnicas instrumentales para su posible aplicación en productos farmacéuticos

Analysis of flavonoids in *Ilex guayusa* Loes. (Guayusa) and husks of *Hylocereus undatus* (Red Pitahaya) with instrumental techniques for their possible application in pharmaceutical products

Carmen Gabriela Idrovo Yulan

Resumen

En el presente estudio se analizó los flavonoides provenientes de la maceración etanólica de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) y de las cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja), para lo cual se usaron técnicas instrumentales como la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) donde se verificó la presencia de grupos funcionales O-H y C-H que se asocian a fenoles, alcoholes, moléculas de agua y flavonoides. Por otro lado, se realizó la cuantificación de los flavonoides mediante espectrofotometría UV-VIS obteniendo una concentración de 7.43 mg/g para la guayusa y de 5.49 mg/g para las cáscaras de pitahaya. Finalizando, se propuso una posible formulación de producto farmacéutico antioxidante en presentación de gotas orales a partir de los flavonoides extraídos de las hojas de *Ilex guayusa* y de las cáscaras de *Hylocereus undatus*.

Palabras clave: guayusa, pitahaya roja, flavonoides, FTIR, espectrofotometría UV-VIS.

Abstract

In the present study, the flavonoids from the ethanolic maceration of *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) leaves and from the husks of *Hylocereus undatus* (pitahaya Roja) were analyzed through instrumental techniques such as Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) were used, where the presence of O-H and C-O functional groups associated with phenols, alcohols, water and flavonoids. On the other hand, flavonoids were quantified by UV-VIS spectrophotometry, obtaining a concentration of 7.43 mg/g for guayusa and 5.49 mg/g for pitahaya husks. Finally, a possible formulation of an antioxidant pharmaceutical product in presentation of oral drops from flavonoids extracted from *Ilex guayusa* leaves and *Hylocereus undatus* husks was proposed.

Keywords: Guayusa, pitahaya roja, flavonoids, FTIR, UV-VIS spectrophotometry.

1 Introducción

En la actualidad la industria farmacéutica ecuatoriana relacionada con el campo de la biotecnología se abastece a través de medicamentos importados que suman alrededor de USD 991 millones desde el 2017, mientras que las exportaciones de medicamentos solo alcanzan USD 39 millones desde el 2017 (Acebo y colaboradores, 2018) estas cifras dan a conocer que los recursos biológicos de nuestro país no se están aprovechando correctamente por la falta de conocimiento e investigación acerca de estos, razón por la cual realizar este estudio puede ser de gran utilidad para la industria farmacéutica ecuatoriana.

Existen muchos estudios que dan a conocer que la especie *Hylocereus undatus* (pitahaya Roja) es más utilizada en la industria alimentaria por sus propiedades organolépticas excelentes, lo que hace que su funcionalidad dentro de esta industria sea adecuada y perfecta, creando así varios productos alimenticios, pero también genera desperdicio (cáscaras). Sin embargo, estas cáscaras mediante tratamientos también pueden ser de utilidad en el mismo sector. Por lo tanto, se propone un nuevo enfoque a *Hylocereus undatus* donde sus residuos sean

objeto de estudio, específicamente obteniendo flavonoides y cuantificándolos mediante técnicas instrumentales para su posible aplicación en un producto farmacéutico y de esta manera aprovechar totalmente todo el componente frutal.

La misma situación se presenta con la planta *Ilex guayusa* Loes (guayusa) ya que el desarrollo del mercado internacional es constante por lo que existe una necesidad de evaluar la seguridad de nuevos alimentos, durante varios años esta especie ha sido foco de investigaciones, las cuales demuestran que la composición química de esta no presenta mayor riesgo para la salud humana debido a que no está asociada a un historial de efectos adversos. Estudios bioquímicos y fitoquímicos han descrito que las hojas de esta planta están compuestas de varios metabolitos secundarios, los cuales validan propiedades antioxidantes y estimulantes a la guayusa y tienen la capacidad de ser bien aprovechadas en el sector alimenticio (Wise & Negrin, 2020). Pero también es importante generar un punto de vista donde esta planta sea utilizada como materia prima para la elaboración de productos farmacéuticos y esto se debe a que la guayusa tiene alto contenido en cafeína y flavonoides lo que hace que tenga propiedades antioxidantes

comprobables y pueda ser sustituto de los antioxidantes sintéticos del mercado.

Es importante considerar la investigación de nuevos medicamentos que tomen en cuenta a los metabolitos secundarios como son los flavonoides como punto de partida, donde a través de ensayos clínicos controlados se produzcan fármacos con altos estándares de calidad para satisfacer distintas necesidades de sus consumidores. Los estudios sobre el contenido de flavonoides que posee *Ilex guayusa* Loes. (guayusa). e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja), son de suma importancia para poder explicar sus ventajas dentro del sector farmacéutico. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación se planteó comprobar la presencia de flavonoides en cantidades significativas de los dos patrones de estudio para su posterior aplicación en la industria farmacéutica.

2 Materiales y métodos

2.1 Población y muestra

Para el presente trabajo de investigación se considera una población finita y accesible correspondiente a dos kilogramos de *Ilex guayusa* Loes. (guayusa) e *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) respectivamente, las mismas que pasaran por un proceso de selección rigurosa, donde se toma en cuenta

aquellas hojas y cáscaras de los patrones de estudio que no presenten daños en su estructura, de esta población se consideran dos muestras de 200 g de materia vegetal respectivamente para su posterior proceso de maceración por siete días con etanol al 96%.

Los extractos de guayusa y pitahaya obtenidos se filtran al vacío y se llevan al rotavapor a 73.3°C para obtener un extracto total concentrado. Finalmente, el EET de la guayusa se somete a un proceso de eliminación de la clorofila, donde por cada 25 mL de EET se agrega 2 g de carbón activado granulado, se agita la mezcla durante 20 minutos, posteriormente se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 100 rpm y finalmente se filtra el exceso de carbón activado.

2.2 Tamizaje fitoquímico

Una vez efectuada la extracción exhaustiva de ambos patrones de estudio, se realizó bioensayos específicos encaminados a demostrar la presencia de sustancias bioactivas. El proceso consta de la cualificación de los metabolitos secundarios que contiene *Ilex guayusa* Loes. (Figura 1) y las cáscaras de *Hylocereus undatus* (Figura 2) así se logrará determinar: saponinas (Prueba de espuma), flavonoides (Prueba de Shinoda), taninos (Prueba del cloruro férrico),

cumarinas y lactonas (Ensayo de Baljet),
quinonas (Ensayo de Borntrager).

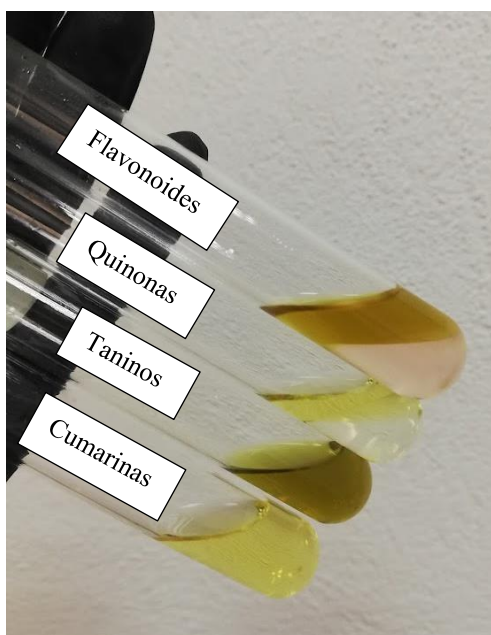


Figura 1 Tamizaje fitoquímico para el EET de *Ilex guaysa* Loes.

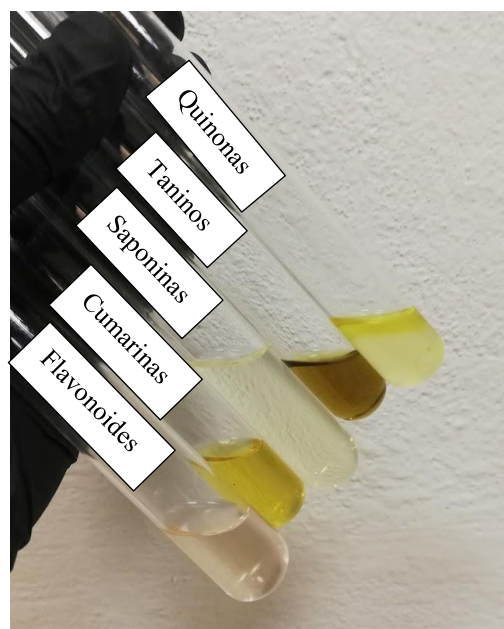


Figura 2 Tamizaje fitoquímico para el EET de *Hylocereus undatus*

2.3 Análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales

2.3.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya

Para esta técnica instrumental se realizó una purificación previa para obtener mejor calidad en los resultados para lo cual, los EET fueron purificados mediante cromatografía de columna, la cual consistía en una pequeña

cantidad de algodón en la parte inferior seguida por 1cm de arena fina, posteriormente se introdujo 15 g de sílica gel MESH con 30g de solvente, luego se dejó caer el eluyente para que la fase estacionaria (sílica gel) quede hidratado y empaquetado. Finalmente, en la parte superior se colocó 10 mL del extracto etanólico total, seguido del solvente. El extracto colocado pasa a través de la columna por el efecto de la gravedad

manteniendo así un equilibrio entre el solvente que fluye dentro de la columna y el soluto adsorbido en la fase estacionaria. Cabe recalcar que el solvente utilizado fue metanol.

La técnica instrumental consta en colocar una gota del extracto etanólico de los patrones de estudio directamente en el diamante con un número de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} . Para obtener mejores resultados se debe realizar al menos 3 repeticiones por experimento. Entre determinaciones, el diamante debe ser cuidadosamente limpiado para evitar errores en la lectura de datos.

2.3.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS

Para la cuantificación de flavonoides de las fracciones etanólica se sigue el manual de Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas de Rojas et al. (2015) de la Universidad de Machala, siguiendo el siguiente protocolo:

a) Preparación de la curva de calibración

A partir de una solución de $AlCl^3$ al 2% y una solución de rutina con quercetina a 200 ppm, se elaboró la curva de calibración, donde se preparan soluciones estándares a concentraciones de 10, 20, 25, 40 y 50 ppm,

donde se toma 1 mL de la solución de quercetina se añade 1 mL de $AlCl^3$ seguido de 1 mL de MeOH. Posteriormente se prepara el blanco para calibrar el espectrofotómetro con 1.5 mL de MeOH y 1.5 mL de $AlCl^3$. Todas las soluciones preparadas se colocan en frascos ámbar envueltos en papel aluminio y se deja reposar por una hora. Finalmente, se leen las absorbancias a 420 nm.

b) Análisis de la muestra

Se añade 0.5mL de la fracción que se va a analizar en un tubo de ensayo, se agrega 1mL de $AlCl^3$ al 2% y 1.5mL de MeOH, posteriormente se deja reposar una hora y se lee en el espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-630) a 420 nm. Se debe realizar la muestra por triplicado.

Para calcular las concentraciones de flavonoides en la muestra se utiliza la ecuación de la curva de calibración, las cuales se expresan como mg de quercetina/g de extracto vegetal de la especie.

Metabolito secundario	<i>Ilex guayusa</i> (Guayusa)	<i>Hylocereus undatus</i> (Pitahaya roja)
Flavonoides	+	+
Cumarinas	-	-
Lactonas	-	-
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Quinonas	-	-

Figura 3 Resultados del Tamizaje fitoquímico de las especies de estudio

3 Resultados y discusión

3.1 Obtención del extracto etanólico total de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. (Guayusa) y de las cáscaras de *Hylocereus undatus* (Pitahaya roja) mediante maceración

A partir de 200 g de hojas de *Ilex guayusa* y cáscaras de *Hylocereus undatus* se obtuvo 80 mL de extracto etanólico respectivamente mediante el método de maceración, cabe recalcar que este volumen final fue conseguido después del proceso de rota evaporación. Según Flores et al. (2016) la

maceración etanólica tiene como ventaja la extracción de la mayor parte de los principios activos, debido a que se obtiene mejores niveles de estabilidad y selectividad enfocado hacia los compuestos fenólicos de interés como es el caso de los flavonoides, por otra parte, también se obtiene mayor eficiencia de extracción.

3.2 Tamizaje fitoquímico

Una vez finalizadas las pruebas respectivas para cada bioactivo se obtuvieron los siguientes resultados estipulados en la figura 3.

La presencia de compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos se evidenció en

los ETT de la guayusa y pitahaya. Por un lado, se evidenció la presencia de flavonoides mediante la prueba de Shinoda proporcionando un color amarillo-naranja indicando su positividad, mientras que con la prueba con cloruro férrico se verificó la presencia de taninos por su coloración verde intensa. Por otra parte, se demostró la existencia de saponinas solamente en el EET de *Ilex guayusa* mediante la prueba de espuma. Según Azmir et al. (2013), el solvente etanol es utilizado para la extracción de compuestos de interés como son los taninos, flavonoides, polifenoles, terpenoides y saponinas.

3.3 Análisis de flavonoides mediante técnicas instrumentales

3.3.1 Absorción FTIR de los extractos etanólicos totales de guayusa y pitahaya

Los grupos funcionales absorben la radiación en un intervalo específico de frecuencias, la región comprendida entre 4000 y 1500 cm^{-1} se considera la zona de diagnóstico que facilita la identificación del espectro a analizar, mientras que la región entre 1500 y 600 cm^{-1} se denomina huella dactilar y es aquella que presenta vibraciones de enlace propias de la muestra por lo que,

esta zona es diferente en cada compuesto que se analice (Cortez, 2020).

a) *Ilex guayusa* Loes.

En la figura 4 en la zona de diagnóstico se puede apreciar un estiramiento amplio en la región de 4000-2300 cm^{-1} con un número de onda de 3344.74 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de los grupos O-H que están estrechamente asociados con alcoholes, fenoles y a moléculas de agua. Por otro lado, se observa un estiramiento en la región 3000-2800 cm^{-1} con un número de onda de 2976.33 cm^{-1} la cual tiene una apariencia puntiaguda asimétrica que se asocia a las vibraciones de los grupos C-H característico del flavonoide rutinosa. Mientras que en la región 2000-1500 cm^{-1} presenta un estiramiento con baja intensidad con un número de onda aproximado de 1660 cm^{-1} perteneciente a el enlace C=N (Cortez, 2020).

En el área de la huella dactilar se observan varios estiramientos por lo cual, se consideran los más representativos para su análisis. Se presenta un estiramiento con un número de onda de 1019.78 cm^{-1} que se asocia con alcoholes primarios. Por otro lado, se observa un estiramiento amplio con un número de onda de 614 cm^{-1} que se asocia con la molécula H-O-H que es básicamente agua,

cabe aclarar que la mayoría de alimentos contiene agua por lo que en este análisis se ve reflejado (Cortez, 2020).

b) Cáscaras de *Hylocereus undatus*

En la figura 5 en la zona de diagnóstico se puede apreciar un estiramiento amplio en la región de $4000-2300\text{ cm}^{-1}$ con un número de onda de 3346.17 cm^{-1} perteneciente a vibraciones de los grupos O-H que están estrechamente asociados con alcoholes, fenoles y a moléculas de agua. Por otro lado, se observa un estiramiento en la región $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ con un número de onda de 2976.03 cm^{-1} la cual tiene una apariencia puntiaguda asimétrica que se asocia a las vibraciones de los grupos C-H. Esta última absorción se asocia con la vibración asimétrica perteneciente al flavonoide

rutinosa. Finalizando se observa un estiramiento en la región de $1830-1530\text{ cm}^{-1}$ con un número de onda de 1674.41 cm^{-1} perteneciente a grupos carbonilo C=O (Cortez, 2020).

En el área de la huella dactilar se observan varios estiramientos por lo cual, se consideran los más representativos para su análisis. Se presenta un estiramiento con un número de onda de 1016.04 cm^{-1} que se asocia con alcoholes primarios. Por otro lado, se observa un estiramiento amplio con un número de onda de 617.04 cm^{-1} que se asocia con la molécula H-O-H que es básicamente agua, cabe aclarar que la mayoría de alimentos contiene agua por lo que en este análisis se ve reflejado (Cortez, 2020).

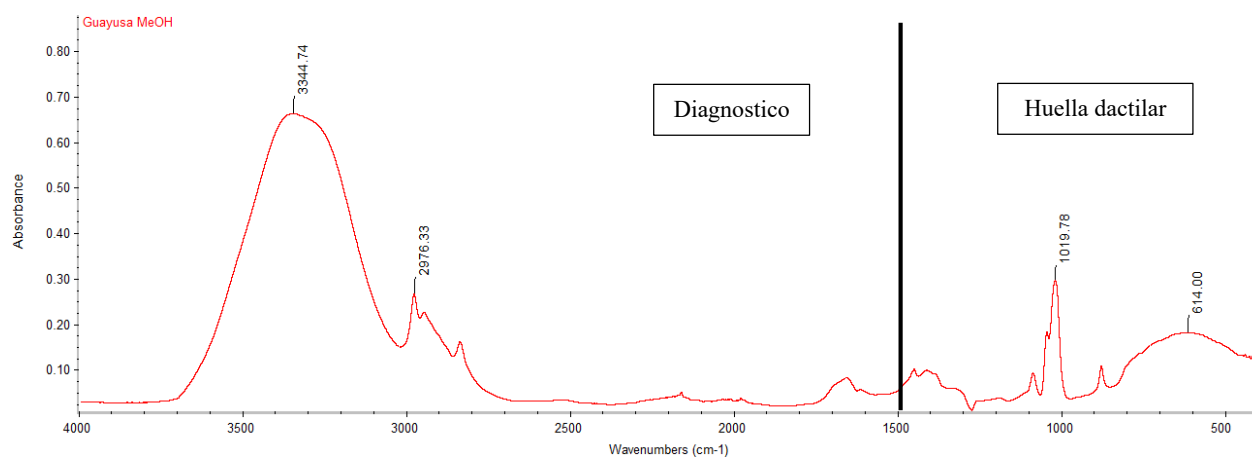


Figura 4 Espectro IR para *Ilex guayusa*

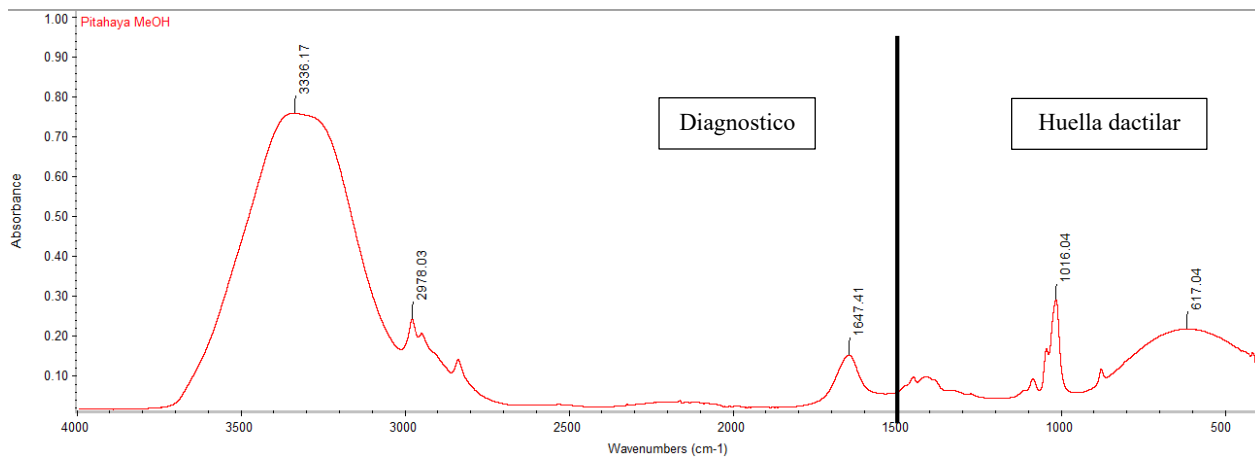


Figura 5 Espectro IR para las cáscaras de *Hylocereus undatus*

Mediante una revisión bibliográfica se llega a la conclusión que este tipo de análisis de flavonoides en hojas de guayusa y cáscaras de pitahaya mediante FTIR no se ha realizado con anterioridad, por lo que los resultados obtenidos en este estudio se compararon con la base de datos “Spectral Database for Organic Compounds SDBS”.

3.3.2 Cuantificación de flavonoides mediante Espectrofotometría UV-VIS

La curva de calibración para determinar flavonoides totales se realizó mediante el estándar de quercetina, como se indica en la figura 7.

Los datos de la figura 8 revelan que el EET de la especie *Ilex guayusa* contiene una concentración de 7.43 mg/g este resultado se puede comparar con el estudio realizado por Palchizaca (2019) donde obtiene una concentración de 7,50 mg/g cuyo resultado es similar al obtenido. Se demuestra la presencia de flavonoides en cantidades significativas, por lo que se considera apto para su uso en la industria farmacéutica.

En cuanto a la cuantificación de los flavonoides en el EET de las cáscaras *Hylocereus undatus* se establece una concentración de 5.49mg/g, el cual se asemeja al estudio Auquilla (2021) donde describe una concentración de 5.60 mg/g en

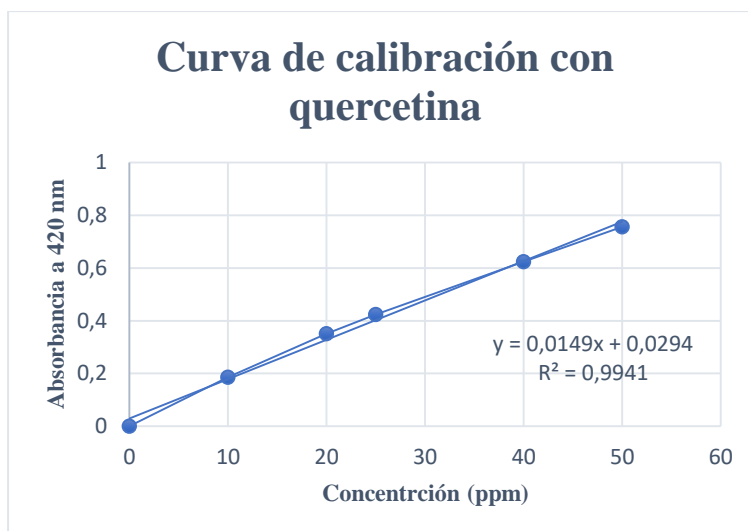


Figura 6 Curva de calibración con quercetina

Especie vegetal	Absorbancia a 420 nm			Absorbancia promedio	Concentración mg/mL	Concentración mg/g
<i>Hylocereus undatus</i>	0.0662	0.0606	0.0674	0.0647	0.0353	5.49
<i>Ilex guayusa</i>	0.0811	0.0726	0.0779	0.0772	0,0478	7.43

Figura 7 Concentración de flavonoides presentes en *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus*

las cáscaras de *Selenicereus megalanthus* dando a conocer que esta especie vegetal indistintamente de su especie, tiene un alto contenido de flavonoides en su cáscara.

3.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis inferencial, el cual utiliza la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, por lo que se trabaja con una muestra menor a 50 datos. A partir de la concentración de

flavonoides, se plantea las siguientes hipótesis con relación a los datos:

$$H_0 = \text{distribucion normal}$$

$$H_a = \text{no tienen una distribucion normal}$$

La figura 9 expone que el coeficiente de Shapiro-Wilk es igual a cero, por lo tanto, se rechaza hipótesis nula debido a que el tamaño de la muestra es muy pequeño, por lo tanto, se determina que los datos no tienen una

Especie vegetal	Xi	$(Xi - Med)^2$	ai	Xi INV	Dif (Xi-Xi INV)	Coefficiente de SW
Pitahaya	5.49	0.9409	0.7071	7.43	-1.94	0
Guayusa	7.43	0.9409		5.49		

Figura 8 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Pitahaya (x)	Guayusa (y)	D	D ²
0.0353	0.0478	-0.0125	0.00015625

Figura 9 Datos de la correlación de Spearman

distribución normal y se procede a realizar la correlación de Rho de Spemann.

- **Correlación de Rho de Spearman**

Dentro de esta prueba se verifica la correlación que existe entre los datos obtenidos de las especies vegetales, para esto se aplica la siguiente fórmula:

$$rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2 - 1)}$$

Para llegar a la interpretación del resultado se debe tener en cuenta que los valores que sean próximos a +1 establecen una correlación fuerte y positiva, mientras que los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa (Martínez et al., 2009).

Reemplazando los datos de la figura 10 en la fórmula establecida se obtiene una correlación de +1, esto indica que la dirección de la relación es positiva, por lo tanto, se concluye que la correlación entre estas dos especies vegetales en cuanto a la cantidad de flavonoides que poseen es fuerte.

3.5 Propuesta de un fármaco a base de flavonoides extraídos de *Ilex guayusa* y cáscaras de *Hylocereus undatus*

Considerando el efecto antioxidante que tienen los flavonoides en general, se puede proponer un fármaco que prevenga o retarde la oxidación, dentro de la industria existen varias opciones de fármacos antioxidantes, como son los provenientes de la N-acetil cisteína que se caracteriza principalmente por su efecto antioxidante de gran eficacia la cual actúa por efectos directos y por medio de

emulación de la vida de glutatión (Gillissen, 2011).

Los antioxidantes de este tipo son producidos en laboratorios por medio de síntesis química y son usualmente modificados para su aplicación dentro de la industria farmacéutica y alimenticia (Cruz, 2017). Dentro estos tenemos el BHT (Butilhidroxitolueno) y BHA (Butilhidroxianisol), los cuales son antioxidantes fenólicos monovalentes y son altamente solubles en grasas e insolubles en agua. El BHA se lo puede encontrar en una presentación de copos de cera blanca, mientras que el BHT como un compuesto cristalino de color blanco (Villanueva et al., 2017).

Sin embargo, cabe recalcar que hoy en día estos compuestos están siendo cuestionados y estudios clínicos han demostrado que varios de ellos causan efectos nocivos a la salud a largo plazo, actualmente existen restricciones legales levantadas a estos productos (Velasco et al., 2007).

A partir de las hojas *Ilex guayusa* (guayusa) y cáscaras de *Hylocereus undatus* (pitahaya roja) se puede extraer flavonoides en cantidades considerables para comenzar un diseño racional de fármacos donde se encuentren compuestos específicos para el tratamiento de enfermedades, generalmente

esto comienza desde el estudio de plantas medicinales que pueden aportar compuestos cabeza de serie que actúe directamente en una diana específica minimizando efectos secundarios y potenciando su eficacia.

Dentro de este mismo contexto, el presente estudio se propone una formulación en presentación de gotas orales ya que su fabricación es sencilla y reproducible como lo describe Gómez (2013) en su trabajo experimental, donde se ocuparía un jarabe simple como base donde se agregaría el metabolito secundario obtenido mezclado parabenos, propilenglicol, glicerina, EDTA y saborizante. Cabe recalcar que la fabricación de este fármaco estaría sujeto a control de calidad exhaustivo bajo las normas ARCSA.

Se considera que la disponibilidad de este material vegetal es alta, debido a que la guayusa y la pitahaya es ampliamente cultivado en el Ecuador y que su uso está enfocado a la industria alimentaria, por lo que aprovechar estas especies es fundamental para obtener beneficios a largo plazo dentro de la industria farmacéutica.

4 Conclusiones y recomendaciones

Analizar flavonoides provenientes de las plantas *Ilex guayusa* Loes. (Guayusa) e *Hylocereus undatus* (Pitahaya roja) para su

posible aplicación en productos farmacéuticos se obtuvieron resultados favorables que dan paso a una posterior investigación y formulación de un antioxidante proveniente de las especies estudiadas, considerando que tanto las hojas de guayusa como las cáscaras de pitahaya son asequibles.

En los extractos etanólicos totales de las hojas de guayusa y de las cáscaras de pitahaya se comprobó la presencia de flavonoides y taninos mediante un tamizaje fitoquímico.

Se empleó dos técnicas instrumentales para el análisis de los flavonoides, la primera fue espectrofotometría UV-VIS donde se obtuvo la concentración de los flavonoides presentes en la guayusa y pitahaya. Por otro lado, mediante la espectroscopia infrarroja FTIR se analizó los espectros IR de las especies donde se comprobó la presencia de grupos funcionales asociados a fenoles, alcoholes, moléculas de agua y flavonoides, debido a los datos obtenidos en este estudio, el uso de estas especies vegetales es apto para emplearse en la industria por su alto contenido de este metabolito secundario.

Se propuso una posible formulación de producto farmacéutico antioxidante en presentación de gotas orales a partir de flavonoides extraídos de las hojas de *Ilex*

guayusa y de las cáscaras de *Hylocereus undatus*. Esta propuesta se debe a los resultados obtenidos y a la revisión bibliográfica realizada que indica que la concentración de flavonoides encontrados en las especies vegetales es alta y tienen una correlación positiva y fuerte, además que este grupo específico de flavonoides tiene propiedades antioxidantes aprovechables para la industria farmacéutica.

Recomendaciones

- Se sugiere seguir con los estudios de las especies *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus* debido que poseen propiedades estimulantes y antibacterianas, además de la propiedad antioxidante ya demostrada en varios estudios.
- Se propone realizar otros tipos de extracción y purificación que permita tener un mejor aislamiento de los flavonoides presentes en la guayusa y las cáscaras de pitahaya.
- Por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes en *Ilex guayusa* e *Hylocereus undatus* se recomienda realizar un análisis cuantitativo de cada bioactivo para conocer sus posibles propiedades terapéuticas y de

esta manera ser utilizados en la industria farmacéutica.

- Finalmente, se aconseja iniciar la formulación del producto farmacéutico propuesto en esta investigación.

Bibliografía

- Abril, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez, F., & Túnez, I. (2000). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Acebo, M., Quezada, A., Rodríguez, J., Méndez, S., & Quijano, J. (2018). *Industria farmacéutica. Estudios Industriales. Orientación estratégica para la toma de decisiones*.
- Almaraz-Abarca, N., Ávila Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E. A., Naranjo-Jiménez, N., & Herrera-Corral, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vid supra*, 1, 39–50.
- Ansaloni, R., & Orellana, A. (2010). *Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. February 2017*.
- Arauz, Y. M. (2019). *Oportunidades de exportación productos no tradicionales caso de estudio producción de pitahaya roja de la parroquia Puerto Cayo [Proyecto de Investigación]. Universidad Estatal del Sur de Manabí “UNESUM.”*
- Arce, V. (2019). *Extracción y caracterización de los flavonoides obtenidos de la cáscara del fruto cacao (Theobroma cacao L.) para su valorización [Escuela de Tecnología en Alimentos]. Universidad de Costa Rica*.
- Ardoino, S., Boeris, M., & Toso, R. (2013). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Revista Ciencias Veterinarias*, 1, 115–125.
- Arias, Angeline., & Auz, A. (2022). *Análisis bibliográfico del uso de colorantes de cáscara de pitahaya roja (Hylocereus undatus) frente a colorantes sintéticos*. www.fcq.ug.edu.ec
- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>

- Aquilla, D. (2021). *Evaluación de fenoles y flavonoides totales en las cáscaras del fruto Cereus undatus Haw y de Selenicereus megalanthus*. Universidad Central del Ecuador.
- Averno, M., & Cisternas, I. (2010). *Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile*.
<http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v138n10/art14.pdf>
- Azahuanche, F. P., & Aponte, G. L. (2016). *Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú Preliminary phytochemical study of medicinal plants from the northern of Peru*. 22(2), 421–426.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L. De, & Macía, M. J. (2008). *Introducción*. 1–3.
- Barreto, Y. (2021). *Capacidad antioxidante del zumo de Hylocereus megalanthus (Pitahaya amarilla) y Hylocereus undatus (Pitahaya roja)*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Becerra, M. (2014). *COSTUMBRES Y PRÁCTICAS QUE UTILIZAN LOS AGENTES DE LA MEDICINA ANCESTRAL Y SU RELACIÓN EN LA SALUD DE LOS MORADORES, EN LA PARROQUIA CHINGA RECINTO CHIGÜE DE LA PROVINCIA DE ESMERALDAS DEL AÑO 2014*.
- Bondia, A., & Rosales, M. (2020). *Efecto cicatrizante de una crema a base de extracto etanólico del mucílago de Aloe vera (sábila), del mesocarpio de Selenicereus megalanthus (pitahaya amarilla) y colágeno extraído de las escamas de Mugil cephalus (lisa) en ratones albinos*.
- Bosco, U. N. de la P. S. Juan. (2011). Extracción y fraccionamiento. In *Farmacognosia* (pp. 51–62).
- Caranqui Aldaz, J., & Humanante, A. (2011). *Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (Ilex guayusa Loess.) del Cantón Pastaza*.
- Carpintero, N., & Salazar, M. E. (2014). *Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto*

- alcohólico foliar de Guayusa , Ilex guayusa Loes (AQUIFOLIACEAE).*
- Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica* [Escuela de Bioquímica y Farmacia]. Universidad de Cuenca.
- Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., Ibañez, L., Fujita, R., Barnett, & Mendoza, E. (2008). Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglicemiante. *Revista Horizonte Médico*, 8(1).
- Castillo, C. (2019). *Efecto de la aplicación de Azotobacter chroococcum, Azotobacter vinelandii y Pseudomonas fluorescens sobre la producción de Flavonoides en Calendula officinalis* [Departamento de Microbiología]. Pontificia Universidad Javeriana .
- Castillo, E., Castillo, S., & Reyes, C. (2010). Estudio Fitoquímico De Plukenetia Volubilis L Y Su Efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de Rattus rattus var. albinus. *UCV-Scientia*, 2, 11–21.
- Chino, Y. (2020). *Composición química y efecto terapeutico de pitahaya (Hylocereus undatus) Arequipa-2020.*
- Chinou, I. (2008). *Primary and secondary metabolites and their biological activity.*
- Chumbia, G., & Kuamar, A. (2019). *Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en Guayusa (Ilex guayusa Loes) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína.*
<https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/711/1/T.AGROIN.B.UEA.0077.pdf>
- Cobos, L. (2017). *Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa (Ilex guayusa).* Universidad Central del Ecuador.
- Córdova, L. (2017). *Métodos para separar, identificar y caracterizar una mezcla binaria constituida por flavonoides Naringenina y Quercetina.* Universidad Técnica de Machala .
- Cortez, PM. (2020). *Cap 6 Análisis de los espectros de infrarrojo.*
- Crespo, J. M., Vila, D., Karkras, A., Tasiguano, A. L., Cachiguango, G., Lema, A., Yamberla, C., Rosero, F., Villareal, E., Anton, J., Jara, C., Cuji, F. C., Moya, R., Nogales, F., Herrera, L., Escobar, Z., Zaragocín, S., Alvarez, F., Alvarez, J., ... Rodríguez, R. (2014). *Saberes Y Conocimientos Ancestrales, Tradicionales*

- Y Populares. *Stream* 5:, 20, 48. <http://floksocty.org/docs/Espanol/5/5.3.pdf>
- Crespo, P. (2013). *La guayusa. Trayectoria y Sentido*.
- Cruz, J. (2015). *Determinación de fenoles y flavonoides en extractos de hojas de plantas con actividad antioxidante empleando espectroscopia FTIR y análisis multivariado*. Instituto Politécnico Nacional.
- Cueva, R. (2020). *Evaluación de las propiedades físico químicas y microbiológicas, en la harina de cáscara de pitahaya (Selenicereus undatus (haw) d.r. hunt) para uso de raciones alimenticias de animales*. Universidad Estatal Amazonica .
- Enciso, M. (2019). *Elaboración de pulpa de pitahaya fortificada con hierro y usos en la industria alimentaria*.
- Figuroa, J. (2020). *Microencapsulación de antocianinas con actividad antioxidante extraídas a partir de la cáscara de pitahaya roja (Hylocereus undatus)*. Universidad Técnica de Ambato .
- Flores, H., León, C., Estarrón, E., & Orozco, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 1–14.
- Flores, M. (2019). *Elaboración de un endulzante a base de miel de caña de azúcar (Saccharum officinarum) enriquecido con jengibre (Zingiber officinale) y guayusa (Ilex guayusa)*.
- García, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica*.
- García, L. (2020). *Estudio de metabolitos secundarios presentes en Ilex guayusa, Ilex paraguariensis, Passiflora tripartita f mollissima y Passiflora tarminiana y su posible efecto sobre Helicobacter pylori. Análisis bibliográfico y computacional*.
- Gillissen, A. (2011). Principios de la Acción Antiinflamatoria de la N-Acetilcisteína y sus Posibles Usos Terapéuticos. *Siic*, 65(9), 549–557.
- Gómez, J. Carlos. (2013). *Influencia de los factores físicos y del material de envase en la estabilidad de Ácido ascórbico en gotas orales*. [Carrera de Química farmacéutica]. Universidad Central del Ecuador.
- Gomis, V. (2008). *Tema 1. Introducción a las técnicas Instrumentales en el análisis instrumental*.

- Guartatanga, C. D. (2022). *Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de la pulpa del fruto de pitahaya (Cereus sp.) producida en la provincia de Morona Santiago para posible uso en la industria alimentaria*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Guerra, A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades Físico-Químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como tinturas del Rizoma y de la Fronda de Calahuala (Phelebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Guiance, H., Marino, ;, Isern, ;, Coria, ;, & Irurzun, ; (2021). *Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales*.
- Gutiérrez-Venegas, G. (2018). Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 94–101.
- Herrera, S. (2018). *Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico del fruto Selenicereus megalanthus "Pitaya" en ratas con inducción a hepatotoxicidad agudo*.
- Inga, E. (2022). *Comparación de métodos de deshidratado para obtener harina de cáscara de pitahaya de dos variedades de pitahaya con potencial bioactivo* [Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. <https://orcid.org/0000-0003-2203-0465>
- Jarrett, C., Shiguango, M., & Salazar, E. (2012). *Guaysa traditions in Napo Runa, Culture. Ecuador. Nuestra Amazonia* .
- Jørgensen, P. M., & León, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monogr. Syst. Bot.*, 1–1182.
- Maldonado, M. E. (2020). *Evaluación de la concentración de cafeína en capsulas preparadas a partir de extracto fluido de Ilex guayusa mediante espectrofotometría UV*.
- Martínez, R., Tuya, L., Martínez, M., Pérez, A., & Cánovas, A. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Rev Haban Cienc Méd La Habana, VIII(2)*, 1–19.
- Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes*. Universidad San Francisco de Quito .
- Miño, G., & Jadán, M. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/2100/1226/1/T-ESPE->

025146.pdf%5Cnhttp://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1226

- Mondragón Cortez, P. (2017). *Espectroscopía de infrarrojo para todos...y 51 espectros de alimentos consumidos en México*.
- Nader, B., & Lozada, J. (2013). *Metabolitos secundarios*.
- Ortega, F. (2020). *Obtención de Pitahaya Amarilla (Selenicereus megalanthus (K. Schum) ex Vaupel) Deshidratada Mediante el Tratamiento de Convección en la Vereda Jerico Municipio de Palestina Departamento del Huila*.
- Palchizaca, M. (2019a). "Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunt) y *Theobroma cacao* (Linneo) en el modelo animal rata (*Rattus norvegicus*) de laboratorio" [Escuela de Bioquímica y Farmacia]. Universidad Superior Politécnica de Chimborazo.
- Palchizaca, M. (2019b). *Evaluación del efecto antiinflamatorio de Ilex guayusa (Loes), Vernonanthura patens (Kunth) Y Theobroma cacao (Linneo) en el modelo animal rata (Rattus norvegicus) de laboratorio*.
- Pereira, O. (2015). *Prevención e intoxicaciones por N-acetilcisteína*. 1–20.
- Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotechnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial*.
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). *Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas*.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (5th ed.). McGRAW-HILL.
- Torres-Valenzuela, L. S., Serna-Jiménez, J. A., Pinto, V., & Vargas, D. (2020). Evaluación de condiciones de extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de cáscara de pitahaya amarilla. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(1), 70–83. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a6>
- Utreras, V. (2019). *Determinación de la concentración mínima de fenoles presentes en extractos etanólicos de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes.) con mayor actividad inhibitoria en las enzimas α - y β -glucosidasas*. Universidad Central del Ecuador .

- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>
- Venegas, E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Ucv-Scientia*, 4(2), 161–174.
- Vera, G. (2020). *Evaluación de la influencia del pH para la extracción de pectina en la cáscara de pitahaya (Selenicereus undatus (HAW) DR HUNT)*. Universidad Estatal Amazónica .
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Villanueva, E., Rodríguez, G., Aguirre, E., & Castro, V. (2017). Influence of antioxidants on oxidative stability of the oil Chia (*Salvia hispanica* L.) by rancimat. *Scientia Agropecuaria*, 8, 19–27. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.02>
- Wise, G., & Negrin, A. (2020). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2393–2404. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>