

**CUANTIFICACIÓN DE CAFEINA, FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE EN LA INFUSIÓN Y DECOCCIÓN DE HOJAS DE  
GUAYUSA (*Ilex guayusa*)**

**ALVARO FRANKLIN CEBALLOS CHITÁN  
LENIN ARMANDO CORAL MORENO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO  
2012**

**CUANTIFICACIÓN DE CAFEINA, FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE EN LA INFUSIÓN Y DECOCCIÓN DE HOJAS DE GUAYUSA  
(*Ilex guayusa*)**

**ALVARO FRANKLIN CEBALLOS CHITÁN  
LENIN ARMANDO CORAL MORENO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:  
M.Sc. Olga Lucia Benavides Calvache**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO  
2012**

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo primero del acuerdo No 323 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**Nota de aceptación:**

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

\_\_\_\_\_  
**M.Sc. Olga Lucia Benavides**

\_\_\_\_\_  
**M.Sc. Oscar Arango Bedoya**

\_\_\_\_\_  
**M.Sc. Sonia Ximena Delgado**

San Juan de Pasto, 9 de Abril de 2012

## DEDICATORIA

*A Dios por las fuerzas necesarias para luchar día tras día, por iluminar el camino de mi vida, regalarme salud y sabiduría*

*A mis padres Gerardo y Ligia, por darme la vida, por su ejemplo de amor al trabajo y estudio*

*A mis hermanos Pablo y Darío que me apoyaron indudablemente ejemplos de lucha y amor.*

*No hay palabras para agradecer a Dios y, a estas personas que amo.*

*Álvaro Ceballos.*

## DEDICATORIA

*A la persona más valiente y luchadora, que me ha enseñado que la felicidad no está más allá de la próxima vuelta del camino, sino en el sendero que estoy recorriendo en estos momentos. Reconociendo que es ilógico pensar en una vida sin problemas ni adversidades, ya que son la oportunidad perfecta para hacer trabajar la mente y la propia capacidad de luchar, encontrando soluciones que día a día enriquecen el crecimiento espiritual e intelectual.*

*aunque decirte gracias sea un gesto muy pequeño, me alegra poder aportar a esa gran deuda, Compartiendo este gran sueño contigo, en el que tus sabios consejos, lograron ser más que bellas palabras y hoy se convierten en un hecho.*

*Té amó Madre...*

**Lenin Coral Moreno.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Directora Olga Lucia Benavides, por guiarnos en el camino del éxito, por mostrarnos la senda de una verdadera realización, por esos momentos de entrega con toda generosidad, por sus palabras y consejos que siempre recordaremos, por la amistad que siempre nos ha brindado.

A nuestros jurados, Oscar Arango, Ximena Delgado por sus recomendaciones y opiniones en el desarrollo del trabajo.

Al grupo de investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) por darnos la oportunidad de desarrollar esta investigación.

David Arturo, Juan Pablo, Químicos, sección laboratorios UDENAR.

Deicy Solarte Muñoz, Ingeniera Agroindustrial

Hugo Andrés Gomajoa, planta piloto –Ingeniería Agroindustrial.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. ANTECEDENTES	22
3. MARCO TEORICO	24
3.1.1 Generalidades.	24
3.2 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA CAFEÍNA.	25
3.2.1 Propiedades fisiológicas de la cafeína.	26
3.3 EXTRACCIÓN DE LA CAFEÍNA	26
3.4 EXTRACCIÓN	27
3.4.1 Extracción solido-líquido.	27
3.4.2 Extracción líquido-líquido.	27
3.4.3 Disolventes para la extracción.	29
3.5 EMULSIONES	29
3.6 FILTRACIÓN	30
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAFEÍNA	30
3.7.1 Cromatografía.	30
3.7.2 Cromatografía de capa fina.	30
3.7.3 Cromatografía de gases.	32
3.8 FENOLES TOTALES	33
3.8.1 Actividad biológica de los compuestos fenólicos	36
3.8.2 Actividad antioxidante en aromáticas.	37

3.9	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES,METODO DE FOLIN - CIOCALTEAU.	38
4.	TIPOS DE ANTIOXIDANTES	39
4.1	TIPOS DE ANTIOXIDANTES	39
4.1.1	Método de captura de radicales.	39
4.1.2	Método 2,2-difenil-1-privirilhidrazil (DPPH).	40
5.	METODOLOGIA	41
5.1	IDENTIFICACION TAXONOMICA	42
5.2	PREPARACION DE LA MUESTRA	42
5.2.1	Secado.	42
5.2.2	Triturado..	43
5.3	DISEÑO EXPERIMENTAL	44
5.3.1	Análisis estadístico.	44
5.4	OBTENCIÓN DE LA INFUSIÓN	44
5.5	OBTENCIÓN DE LA DECOCCIÓN	44
5.6	DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.	45
5.7	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	46
5.8	DETERMINACIÓN DE CAFEINA	46
5.8.1	Obtención de cafeína. cromatográfico de capa fina (Benavides, 2005).	46
5.8.2	Calculo teórico de la cafeína remanete.	47
5.8.3	Método de cromatografía de capa fin.	47
5.8.4	Método de cromatografía de gases.	48
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1	HUMEDAD DE LA HOJAS DE GUAYUSA (Ilex guayusa)	49
6.2	TAMIZADO	49
6.3	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES	50

6.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	54
6.5	CUANTIFICACION DE CAFEÍNA	59
6.5.1	Cromatografía de capa fina.	59
6.5.2	Concentración de cafeína.	60
6.6	CROMATOGRAFÍA DE GASES	62
7.	CONCLUSIONES	67
8.	RECOMENDACIONES	68
	BIBLIOGRAFIA	69
	ANEXOS	76

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estructura molecular de la cafeína .....	25
Figura 2. Esquema de cromatografía de capa fina .....	32
Figura 3. Esquema general de cromatografía de gases.....	33
Figura 4. Estructura de un fenol simple.....	34
Figura 5. Estructura de un fenilpropanoide .....	34
Figura 6. Estructura de un tanino .....	35
Figura 7. Estructura de una quinona .....	35
Figura 8. Estructura de un flavonoide.....	36
Figura 9. Reacción de reducción de DPPH*, (Radical , -difenil- -picrilhidracilo).40	40
Figura 10. Arbusto guayusa (Ilex guayusa).....	41
Figura 11. Ejemplar de (Ilex guayusa) y muestra (Ilex guayusa) .....	42
Figura 12. Secador de Bandejas .....	43
Figura 13. Obtención de los extractos de guayusa (Ilex guayusa).....	45
Figura 14. Proceso de extracción de cafeína .....	46
Figura 15. Cromatografía de capa delgada.....	47
Figura 16. Serie de tamiz estándar .....	49
Figura 17. Curva de calibración de ácido gálico.....	50
Figura 18. Gráfico de medias para fenoles totales. ....	52
Figura 19. Comparación del contenido de fenoles con otras plantas .....	54
Figura 20. Curva de calibración del trolox. ....	55
Figura 21. Gráfico de medias para actividad antioxidante.....	57
Figura 22. Comparación de actividad antioxidante con otras plantas .....	58
Figura 23. Cromatogramas de CCD.....	59
Figura 24. Cafeína cruda.....	61
Figura 25. Muestras de cafeína lavadas con acetona .....	61
Figura 26. Gráfico de medias para cafeína .....	64

Figura 27. Comparación de bebida de guayusa con bebidas comerciales. .... 65

Figura 28. Comparación entre rangos de cafeína de diferentes plantas ..... 66

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Propiedades físico-químicas para diclorometano .....	29
Cuadro 2. Abertura de tamiz estándar .....	43
Cuadro 3. Diámetro promedio de partícula .....	50
Cuadro 4. Cantidad de fenoles totales encontrados en extractos acuosos.....	51
Cuadro 5. ANOVA para fenoles totales.....	51
Cuadro 6. Prueba de rangos múltiple para fenoles totales.....	52
Cuadro 7. Cantidad de fenoles totales en algunas plantas .....	53
Cuadro 8. Actividad antioxidante en mM equivalente a Trolox.....	55
Cuadro 9. ANOVA para actividad antioxidante .....	56
Cuadro 10 .Prueba Rangos Múltiple para actividad antioxidante .....	56
Cuadro 11. Actividad antioxidante en algunas plantas.....	57
Cuadro 12. Cafeína total y pureza.....	62
Cuadro 13. Contenido de cafeína en extracto acuoso .....	62
Cuadro 14. ANOVA para cafeína .....	63
Cuadro 15. Prueba de rangos múltiples para cafeína .....	63
Cuadro 16. Cafeína promedio en bebidas comerciales.....	64
Cuadro 17. Rangos de cafeína en porcentajes en diferentes especies .....	65

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A .....	77
ANEXO B .....	78
ANEXO C .....	79

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

TEAC: Actividad antioxidante equivalente a trolox

ms: Materia seca

mL: Mililitro

mg: Miligramos

H: Humedad

g: Gramo

FT: Fenoles totales

FTI: Fenoles totales en infusión

FTD: Fenoles totales en decocción

CFTI: cafeína total en infusión

CFTD: Cafeína total en decocción

CCD: Cromatografía de Capa Delgada

AOIN: Actividad antioxidante en infusión

AOD: Actividad antioxidante en decocción

A.G.E: Ácido gálico equivalente

$\mu$ L: Micro litro

CG: Cromatografía de gases

Sr: Solute remanente

mM: milimoles

$\mu$ M: micromoles

## RESUMEN

A extractos acuosos de *Ilex guayusa* obtenidos por dos métodos de preparación: infusión a 80 y 60°C y decocción a 92°C. Se cuantificó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. El mayor contenido de fenoles totales se obtuvo por el método decocción a temperatura de 92°C con un valor de 103.49 mg AGE/g de muestra seca. El contenido fenólico disminuyó progresivamente con respecto a la temperatura, obteniendo 76.27 mgGAE/g ms a 80°C y 51,27 mgGAE/g ms a 60°C.

La actividad antioxidante evaluada por el método DPPH<sup>\*</sup> redujo progresivamente en cada uno de los tratamientos, alcanzando 0,0445 mM equivalente a trolox/g ms a 92°C, 0.0406mM equivalente a trolox/g ms a 80°C y 0.0366mM equivalente a trolox/g ms a 60°C. Así mismo se evaluó el contenido de cafeína en cada uno de los extractos acuosos utilizados como bebida tradicional de la amazonia Colombo Ecuatoriana, por medio de cromatografía de gases utilizando cafeína al 100% de pureza como patrón. El contenido de cafeína en los tratamientos a 92°C, 80°C y a 60°C arrojaron resultados promedios de 29.26 33 mg/150 mL, 25,856 mg /150 mL y 23.62 mg/150 mL respectivamente, con un grado de pureza que oscila entre 77,122 -100,0 %. La bebida preparada a diferentes temperaturas no presentó diferencia en el contenido total de cafeína.

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA), Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS CENTURIÓN © Plus versión XV.II.

Palabras claves: extracto de guayusa (*Ilex guayusa*), fenoles totales, actividad antioxidante, cafeína.

## ABSTRACT

A guayusa Ilex aqueous extracts obtained by two methods of preparation: infusion at 80 and 60 ° C and 92 ° C. decoction We quantified the total phenolic content by Folin-Ciocalteu method. The highest total phenol content was obtained by the method decoction temperature of 92 ° C with a value of 103.49 mg AGE / g of dry sample. The phenolic content decreased with respect to temperature, obtaining 76.27 mg GAE / g ms at 80 ° C and 51.27 mg GAE / g of dry at 60 ° C.

Antioxidant activity evaluated by the method DPPH• reduced progressively by each of the treatments, reaching 0,0445 mM equivalent to trolox/g ms 92°C, 0.0406 mM equivalent to trolox g /ms to 80°C and 0.0366 mM equivalent to trolox/g ms to 60°C. Likewise assessed the content of caffeine in each of the aqueous extracts used as traditional drink of the Amazonia Ecuadorian Colombo, through gas chromatography using caffeine 100% purity as patron. The content of caffeine in 92 °C, 80 °C and treatments to 60 °C threw results 29.26 averages 33 mg / 150 mL, 25,856 mg 150 mL and 23.62 mg/ 150 mL respectively, with a degree of purity that oscillates between 77,122-100.0%. The drink prepared at different temperatures not present difference in total content of caffeine.

Is a design used unreservedly randomly (DIA), statistical analyses were performed with the help of the statistical programme STATGRAPHICS CENTURION © Plus version XV.II

**Keywords:** extract of guayusa Ilexguayusa, total phenols, antioxidant activity, caffeine

## INTRODUCCIÓN

La zona Andina de Colombia concentra cerca del 75 % de la diversidad en especies de plantas y animales, es una región con una enorme variedad de plantas que son fuente de investigación y de interés científico, especialmente para el desarrollo de nuevas materias primas del mercado farmacéutico, cosmético y alimentario (Estrella *et al.*, 2005).

Guayusa es el nombre de un arbusto aromático que pertenece al mismo género del acebo (*Ilex aquifolium*), y presenta analogía con yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Familia de las aquifoliáceas que posee cuatro géneros y 450 especies en su mayoría del género *Ilex*. La distribución de esta especie es principalmente tropical en estado cultivado y silvestre, desde el nivel del mar hasta los 2600 m.s.n.m. (Jørgensen *et al.*, 1999).

La planta de guayusa (*Ilex guayusa*) en Ecuador es cultivada de forma extensiva por la comunidad Kichwa en colaboración de un equipo de técnicos de norteamericanos bajo el nombre de Fundación Runa. En Colombia se encuentra en estado silvestre y en jardines botánicos de la comunidad Ingano Camza del alto Putumayo (García, 1992).

El género *Ilex* es conocido por su contenido de cafeína, sustancia psicoactiva más popular del mundo y, sin duda, una de las más aceptadas y toleradas a nivel social. Este alcaloide es admitido culturalmente en todas las sociedades del mundo, siendo la fuente de consumo más común el café y productos elaborados a base de hojas de té y mate que son muy populares. Además se debe agregar la existencia de un sinnúmero de bebidas gaseosas y energizantes con cafeína (Radice *et al.*, 2008).

Gran parte del conocimiento de las plantas se fundamenta en el uso de extractos vegetales o de sus componentes activos; por lo que en la actualidad ha tomado mucha fuerza el estudio de la actividad antioxidante, luego de descubrir que muchas enfermedades se presentan en forma asociada a estados de estrés oxidativo (Soler, 2000).

El uso de antioxidantes en la industria farmacéutica y alimentaria se ha estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para enfermedades cerebro vasculares y neurodegenerativas. Los antioxidantes también son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos para mantener la salud y prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica. Otras aplicaciones a nivel industrial son en forma de conservantes de alimentos y cosméticos.

Se realizó la cuantificación de cafeína por medio de cromatografía de gases, fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau y se determinó la actividad antioxidante mediante el método equivalente a trolox (TEAC), utilizando como radical libre DPPH\*, en la infusión y decocción de hojas de guayusa.

## JUSTIFICACIÓN

Las tendencias de la alimentación en los últimos años han puesto a diferentes industrias alimentarias a buscar y diseñar alimentos que además de contener nutrientes contengan sustancias fisiológicamente activas, cumpliendo una función en la reducción de enfermedades y que eliminen sensaciones de fatiga y agotamiento (Siens, 1997)

De este modo en la región sur colombiana se conocen bebidas culturalmente admitidas por diferentes poblaciones indígenas y mestizas como la bebida tradicional preparada con hojas de guayusa consumida desde tiempos antiguos hasta la actualidad (innerhfer, 2011). Esta bebida cumple los requerimientos exigidos por los consumidores actuales debido a su complejo químico, el cual ofrece cafeína, sustancia que produce efectos de psicoestimulación del sistema nervioso central, respiratorio y músculo cardiovascular eliminando sensaciones de agotamiento y fatiga causada por los trabajos o actividades realizadas comúnmente por las personas en su vida diaria.

Además la bebida de guayusa proporciona una función antioxidante, que regula enfermedades asociadas a un estrés oxidativo por la gran concentración de compuestos fenólicos, ayudado a contrarrestar enfermedades tales como envejecimiento problemas del sistema cardiovascular, sistema nervioso, mutaciones y cáncer (Lampe, 1999)

En países como Ecuador a esta bebida se comercializa por su actividad, al provocar una inmediata disminución de glicemia en pacientes con diabetes, en Perú se utilizan las hojas secas como suplemento dietético para la protección de la próstata y riñones favoreciendo la eliminación de cálculos renales (Vasallo, 1985) De aquí la importancia para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética al tener una nueva materia prima para elaborar bebidas energizantes, tizanas, medicamentos homeopáticos y cremas de uso tópico. Entrando a competir de manera directa en mercados nacionales y extranjeros proporciona oportunidades económicas para productores, transformadores y comercializadores de guayusa, respondiendo a necesidades culturales y económicas de la sociedad consumidora. En América la investigación del género *Ilex* es bastante pobre y requiere de más estudio para encontrar las diferencias químicas en cuanto a su composición; de hecho la mayoría de investigaciones se han realizado para la planta (*Ilex paraguariensis*), existiendo poca información con respecto a (*Ilex guayusa*) lo que genera interés desde el punto de vista químico y agroindustrial en el uso de esta planta (Reginato *et al.*, 1999)

A pesar de que Colombia puede ofrecer este tipo de productos hasta la fecha no se han desarrollado estudios de investigación para la cuantificación de cafeína, fenoles totales y determinación de la actividad antioxidante de la bebida de hojas de guayusa, siendo este un estudio pionero en esta área con el fin de proyectar y aprovechar la diversidad en plantas que nos ofrece la flora colombiana para transformarla a un nivel agroindustrial.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar cafeína, fenoles totales y evaluar la actividad antioxidante en infusión y decocción de hojas de guayusa (*Ilex guayusa*).

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer la cafeína de la bebida de guayusa preparada por infusión y decocción.
- Determinar la cantidad de cafeína del extracto solvente por comparación cromatográfica con patrón externo.
- Identificar las condiciones de temperatura más adecuadas para obtener mayor rendimiento de cafeína en las hojas de guayusa.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos por infusión y decocción.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por infusión y decocción.

## 2. ANTECEDENTES

Las hojas de guayusa son consideradas estimulantes y medicinales, pues han sido usadas por los indígenas de la Alta Amazonia desde tiempos inmemoriales. De hecho, numerosas tribus de la Amazonía Peruano-Ecuatoriana, toman diariamente la tisana de guayusa como emético para la limpieza del estómago y es un ritual de profundo significado (Correa *et al*, 1989).

Los nativos Ingano-Kamsá, Amajuanes, Parajunes y Blancos de Sibundoy del alto Putumayo que habitan en la región sur Colombiana, emplean la guayusa como estimulante, nervínico, digestivo, expectorante y antidiabético, (García barriga ,1992). En la población indígena kichwa, del cantón Loreto (Ecuador), esta planta tiene importancia cultural, por haberse propagado desde tiempos antiguos hasta la actualidad, (Innerhofer, 2011).

Dado que la guayusa contiene cafeína, sustancia psicoactiva más popular del mundo y una de las más aceptadas y toleradas por las personas, varias universidades y entidades han investigado la cantidad de cafeína presente en plantas del género *Ilex*, en especial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) seguido por el estudio de *Ilex guayusa*.

En el laboratorio ABC TESTING, se empleó una muestra de 2.5 g de *Ilex guayusa* y se reportó un análisis por HPLC de cafeína en una cantidad de 32.80 mg/g. demostrando que la guayusa contiene un alto contenido de cafeína par la elaboración de bebidas cafeinadas (ABC TESTING, INC, 2010), otro estudio realizado por la empresa REMEDIOS NATURALES SELVATICOS (Renase) CIA. LTDA. (Quito-Ecuador), reporta que la guayusa contiene 2.90% de cafeína utilizando el método HPLC. (Renase CIA. LTDA, 2009). Estudio solicitado por la fundación runa para su comercialización de hojas de guayusa (*Ilex guayusa*)

En una investigación realizada por la Università degli Studi di Pavía (Italia), se realizó la caracterización fitoquímica de la especie (*Ilex guayusa*) para la elaboración de un fitofármaco y se desarrolló un método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), el cual permitió la cuantificación de la cafeína en el fármaco final, obteniéndose una concentración de cafeína de 8.13 mg/mL (Radice *et al.*, 2008). El estudio permitió el desarrollo de un prototipo de jarabe de *Ilex guayusa* con mira aun uso comercial; Sin embargo, se sometió pruebas analíticas de actividad, que comprueben la estabilidad, seguridad y eficacia del producto, para ser sometido a estudios preclínicos y clínicos en el tratamiento sintomático de manifestaciones dolorosas como gripe, jaqueca y estados febriles (Radice *et al.*, 2008).

El extracto de guayusa obtenido con solventes orgánicos posee un alto contenido de fenoles y una capacidad antioxidante superior a los extractos de *Crotón*

(*wagneri*) “mosquera”, (*Neonelsonia acuminata*), “Zanahoria blanca”, (*Adiantum poiretii*) “Culantrillo” (Burneo, 2009). La fundación Runa reporta que las hojas de guayusa contienen un 50% más de antioxidantes y un 30% más de polifenoles que el té verde. Haciendo atractivo el comercio de la hoja de guayusa en los estados unidos, exportando grandes volúmenes de hoja bajo la responsabilidad de la fundación Runa (Fundación Runa 2010).

Estudios llevados en plantas aromáticas reportan datos sobre el contenido Fenólico, entre los cuales el mayor contenido lo registra el “matico” con un valor de 78 mg AGE /g ms y la “zarzaparrilla” con 29 mg AGE /g ms (Gálvez, 2010), “Mosquera”, “culantrillo”, “caña agria”, “tres filos”, “insulina”, utilizadas en la medicina tradicional Ecuatoriana tienen una cantidad de fenoles totales inferiores al encontrado en la especie de (*Ilex guayusa*), (Burneo, 2009).

En Colombia el Proyecto de Desarrollo Alternativo propone el cultivo, transformación y mercadeo de plantas medicinales, aromáticas y especias, Así como, el desarrollo de productos útiles para la medicina Alternativa que tengan demanda en mercados nacionales y extranjeros, proporcionando oportunidades económicas lícitas para sustituir cultivos ilícitos. De esta manera se seleccionaron cinco especies como las más importantes. “Guayusa” (*Ilex guayusa*), “Sangre de drago” (*Crotonlechleri*), “Uña de gato” (*Uncaria tomentosa*), “Ajenjo anual” (*Artemisia annua*) “Chuchuhuaza” (*Maytenus laevis*), (Bastos, 2002).

En Ecuador la Fundación Runa comenzó en 2009, un proyecto de colaboración entre la comunidad Kichwa y un equipo de técnicos norteamericanos que tiene por objetivo la reforestación aproximadamente 900 hectáreas para el cultivo de 2'533.729 árboles de guayusa, todo esto en un periodo de 4 años y medio. Los árboles plantados durante este periodo generarán aproximadamente un ingreso de \$ 1.771.838. Las estimaciones muestran que 1 hectárea puede producir aproximadamente 3000 kilos de hojas de guayusa que generaría alrededor de \$2000 por año. Los productos de Runa compiten en un segmento del mercado de bebidas que supera \$10 billones de dólares / año (Fundación Runa, 2010)

En países como Argentina, Paraguay y Brasil el cultivo comercial de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*), que tiene analogía con (*Ilex guayusa*) ha aumentado en los últimos años, con el fin de producir una bebida aromática con un alto contenido de cafeína generando un consumo en estos países que alcanza aproximadamente el 30% de la población representando en promedio un litro de estas bebidas por día (Borille *et al.*, 2005). Además la especie del género *Ilex* se puede combinar con cultivos anuales como el maíz, soya y frijol, masificando el ingreso de los agricultores y generando en el transcurso de los años un aprovechamiento racional de la tierra (Montoya *et al.*, 2001).

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA GUAYUSA (*Ilex guayusa*)

Arbusto aromático de hojas alternas dentado- espinosas miden aproximadamente 15 cm de longitud por 7 cm de ancho, flores de peciolo cortos, cáliz persistente, 5 lóbulos y corola de pétalos obtusos, fruto globuloso de 4 a 6 celdillas (García *et al.*, 1992). Posee 4 géneros y 450 especies distribuidas en el neotrópico de Colombia, Ecuador, Brasil, Uruguay, Paraguay y el norte de Argentina (Radice *et al.*, 2000).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Aquifoliales
Familia	Aquifoliaceae
Género	<i>Ilex</i>
Subgénero	<i>Euilex</i>
Especie	<i>I. guayusa</i>
Familia	Aquifoliáceas
Nombre científico	<i>Ilex guayusa</i>
Nombre común	Guayusa

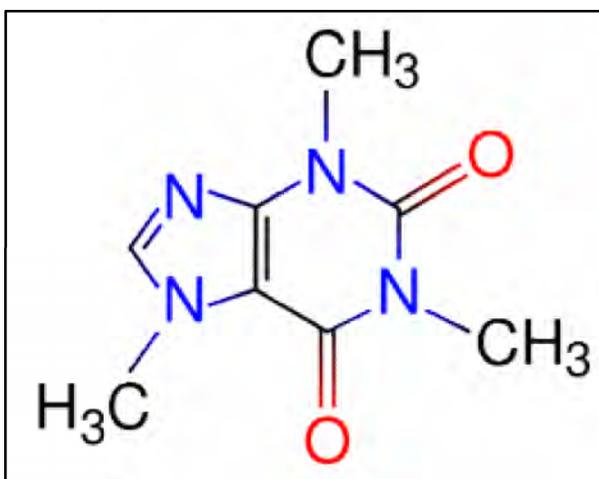
**3.1.1 Generalidades.** El arbusto *Ilex guayusa* es originario de la Amazonia, se encuentra en estado silvestre y en jardines botánicos de la comunidad Ingano-kamsa, Municipio de Santiago, Departamento del Putumayo. La familia de las aquifoliáceas posee cuatro géneros y 450 especies en su mayoría pertenecientes al género *Ilex*, esta especie crece desde el nivel del mar hasta los 2600m.s.n.m. (Jørgensen *et al.*, 1999).

Esta planta pertenece al mismo género del acebo (*Ilex aquifolium*), y presenta analogía con yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Se le atribuyen efectos tónicos, estimulantes y medicinales, y ha sido utilizada de diversas maneras en países andinos. En Colombia es aconsejada como estimulante en la regularización de los problemas del sueño, y como regulador de la menstruación; en Ecuador se ha estudiado su actividad al provocar una inmediata disminución de la glicemia en pacientes con diabetes; en Perú se utilizan las hojas secas como suplemento dietético, para la protección de la próstata y riñones, favoreciendo la eliminación de cálculos renales, (Vassallo *et al.*, 2006).

### 3.2 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA CAFEÍNA

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, concretamente pertenece a la familia de las metilxantinas. Las bases xánticas o púricas son alcaloides derivados de la purina. Concretamente, provienen del anillo de la purina que se forma a través de la condensación de una pirimidina con un imidazol. Las metilxantinas más importantes son la cafeína, teofilina y teobromina, conocidas respectivamente como 1, 3,7-trimetilxantina, 1,3-dimetilxantina y 3,7-dimetilxantina (Melgarejo, 2004).

**Figura 1. Estructura molecular de la cafeína**



Fuente: Pasto, 1981.

La fórmula química de la cafeína es  $C_8H_{10}N_4O_2$ , con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros. Su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina, también es conocida como trimetilxantina, mateína, guaranina, metilteobromina ya que se obtiene por extracción de materiales vegetales como el café, té, guaraná, chocolate, yerba mate o la nuez de cola.

En estado puro es un sólido cristalino blanco inodoro, con un gusto muy amargo, que tiene una densidad de 1,23 g/mL, un punto de fusión de 237 °C y es eflorescente en contacto con aire. A presión atmosférica sublima a 176 °C, sin descomposición. También, puede cristalizar en forma de prismas hexagonales.

Es muy soluble en agua hirviendo en la que cristaliza como mono hidrato, ya que va perdiendo progresivamente la molécula de agua, hasta que lo hace totalmente a los 100 °C. Sin embargo tiene más afinidad por algunos disolventes orgánicos,

como el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y el diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), que a su vez son casi inmiscibles en agua.

La cafeína puede formar combinaciones estables con sales alcalinas de ácidos débiles, como el benzoato y silicato de sodio, pero su reacción con ácidos da lugar a compuestos muy inestables. Se descompone fácilmente por la acción de álcalis calientes y por cloro, (Pasto, 1981).

**3.2.1 Propiedades fisiológicas de la cafeína.** La cafeína es el estimulante leve psicoactivo más consumido en el mundo y se encuentra en bebidas no alcohólicas, estimula el sistema nervioso central evitando la somnolencia, también estimula la mente y aumenta la energía del organismo. Tiene efecto diurético, relaja los músculos lisos favoreciendo la vasodilatación, aumenta la secreción ácida del estómago y potencia la contracción del músculo esquelético (Barry, 2006).

La cafeína está presente en muchas formulaciones farmacéuticas asociada a otras sustancias como el ácido acetil salicílico, ácido ascórbico, codeína y paracetamol. Los medicamentos que contienen cafeína y se encuentran en el mercado son, Tonopan (Novartis) y Tempra Plus (Bristol- Myers Squibb) que sirven para el tratamiento sintomático de manifestaciones dolorosas, febriles, estados inflamatorios, gripe y dolores menstruales (Gutiérrez, 2005).

El ingerir cafeína cuando se hace ejercicio de alta intensidad aumenta el rendimiento físico (Wiles, 1992). De hecho investigaciones realizadas en el 2004, en deporte de corta duración y elevada intensidad; confirmaron que la ingestión de 250 mg de cafeína antes de realizar el ejercicio físico, mejora su rendimiento en un 12.4% (Doherty *et al.*, 2004).

Otras investigaciones demuestran, que el efecto diurético es insignificante cuando se hace ejercicio (Armstrong, 2002), por lo contrario los efectos perjudiciales se presentan al retirar esas bebidas del régimen habitual (Maughan *et al.*, 2003).

### 3.3 EXTRACCIÓN DE LA CAFEÍNA

El proceso común de extracción de cafeína consiste en una etapa inicial de extracción sólido – líquido y una posterior de extracción líquido – líquido. A continuación se presentan sus definiciones y su aplicación al caso específico de la extracción de cafeína de guayusa.

### 3.4 EXTRACCIÓN

Es un proceso mediante el cual se aísla una sustancia o grupos de sustancias basándose en la diferencia de solubilidad de los mismos en un determinado solvente. Las razones más frecuentes por las que se usa una extracción son aislar, concentrar o separar un analito de una especie que interferiría en su análisis. La sustancia a separar puede tratarse tanto de un sólido como de un líquido, Por lo tanto, la extracción puede clasificarse dependiendo del estado físico en sólido-líquido o líquido-líquido (Gary, 1988).

**3.4.1 Extracción sólido-líquido.** Es una operación básica que separa uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante una fase líquida o disolvente. El componente que se transfiere a la fase líquida recibe el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina solvente.

La extracción se lleva a cabo mediante un sistema de reflujo que consiste en calentar a ebullición una mezcla que contenga un líquido en el interior del matraz, en cuya boca se adapta un refrigerante de camisa o serpentín, de modo que los vapores generados en el matraz se condensan y vuelven a caer en el interior del mismo. Permitiendo mantener el proceso a temperatura constante (punto de ebullición del disolvente), el tiempo que sea necesario y sin pérdida de disolvente. La cafeína es perfectamente soluble en agua caliente, por lo que se puede extraer eficazmente. La cafeína pasa a la disolución acuosa, pero acompañada de otros compuestos orgánicos que también son solubles en agua caliente, especialmente taninos(Sanz, 2002).

**3.4.2 Extracción líquido-líquido.** La extracción de una disolución acuosa debe tener un disolvente orgánico de baja solubilidad en agua, alta capacidad de solvatación hacia la sustancia que se va a extraer y bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación posterior.

Cuando las dos fases se separan se forma un equilibrio donde la concentración del soluto en cada fase viene dada por una constante llamada Coeficiente de Distribución o de partición,  $K_d$ , que está definido por:

$$k_d = \frac{C_A}{C_B} = \frac{S_A}{S_B} \text{ Ecuación 1}$$

Donde  $C_A$  es la concentración en gramos por litro del compuesto en el disolvente A y  $C_B$  es la concentración del mismo en el disolvente B y /o  $S_A$ ,  $S_B$  solubilidad del soluto en cada uno de los disolventes a la temperatura de la extracción, expresada en masa de soluto por unidad de volumen del disolvente.

A nivel de laboratorio el proceso se desarrolla en un embudo de decantación. La extracción obtiene más eficacia cuando la cantidad del segundo disolvente se divide en varias fracciones y se hacen sucesivas extracciones. Así que agitando la muestra con un cierto volumen de disolvente, la cafeína pasa mayoritariamente a la fase orgánica. Dado que el disolvente orgánico es más denso que el agua, formando una capa inferior, que se podrá recoger simplemente abriendo la llave del embudo (Climent, 2005).

En ciertos casos puede ser necesario separar totalmente un soluto, cuando la extracción cuantitativa no se logra de un solo paso. El porcentaje extraído puede aumentar al aumentar el volumen. No obstante la extracción cuantitativa se efectúa con más eficacia mediante extracciones múltiples con porciones más pequeñas de volúmenes iguales del mismo disolvente por lo que es posible calcular el número de etapas de extracción requeridas para extraer algún soluto, mediante la aplicación de la siguiente ecuación, (Gary, 1988).

$$SR = Si \left( \frac{Vi}{Kd * Vs + Vi} \right)^n \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

$S_r$ : soluto remanente en la solución, después de la extracción (g)

$S_i$ : soluto en la solución inicial (g)

$V_i$ : volumen en la solución inicial (mL)

$V_s$ : volumen del solvente añadido (mL)

$K_d$ : constante de distribución o de reparto

n: número de extracciones

Los vegetales como la yerba mate, guaraná, café, guayusa y té, contienen celulosa, que es un polímero de la glucosa, principal material estructural de las células de todas las plantas. Dado que la celulosa es insoluble en agua, no presenta problemas en el procedimiento de separación de la cafeína. Mientras que los taninos se disuelven en agua caliente utilizada para extraer los compuestos químicos presentes en estos vegetales. Los taninos son compuestos que tienen naturaleza de polifenoles.

La cafeína es soluble en agua pero mucho más soluble en cloroformo o diclorometano, por eso puede ser extraída con disolventes orgánicos, mientras las sales de sodio del ácido gálico y los taninos permanecen en la fase acuosa. Así, la extracción con el disolvente de la solución básica separa la cafeína casi pura, ayudada a extraer con sulfato de sodio anhidro que actúa eliminando toda el agua y las sales solubles que se mantienen en el disolvente orgánico.

El disolvente orgánico puede ser eliminado fácilmente por evaporación o por destilación, teniendo en cuenta su punto de ebullición, o mediante vacío usando un equipo de evaporación rotatoria, para conseguir la cafeína (Primo, 1991).

**3.4.3 Disolventes para la extracción.** Son compuestos orgánicos volátiles basados en el elemento químico del carbono. Se utilizan solos o en combinación con otros agentes disolventes, estas sustancias son capaces de destruir las agregaciones de las moléculas de un cuerpo soluble. Entre los principales se encuentran el éter dietílico, tolueno y hexano, que son inmiscibles con agua y menos densos que ésta. Todos ellos forman una fase separada por encima de la fase acuosa. Los disolventes orgánicos utilizados son el tolueno ( $C_6H_5-CH_3$ ), el éter de petróleo, el cloruro de metileno ( $CH_2Cl_2$ ), el cloroformo ( $CHCl_3$ ), el tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ), el acetato de etilo ( $CH_3-COOC_2H_5$ ) y el alcohol n-butílico ( $CH_3CH_2CH_2CH_2OH$ ). La elección del disolvente se realiza teniendo en cuenta su solubilidad en la sustancia a extraer y la facilidad con que pueden separarse en una etapa posterior (Palomino, 2001).

**Cuadro 1. Propiedades físico-químicas para diclorometano**

Disolvente	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Peso molecular	solubilidad en agua
Diclorometano	39.8	-97	84.9	1.3 g/100mL a 20 °C

Fuente: Química técnica Ltda. , 2006.

### 3.5 EMULSIONES

La extracción líquido-líquido con ayuda del embudo no puede ser demasiado vigorosa, para evitar la formación de emulsiones que retardan drásticamente la definición de las dos fases. Una emulsión es una dispersión de gotas muy finas de un líquido en otro inmiscible, y en los procesos de extracción puede causar tropiezos.

Es aconsejable adicionar un compuesto iónico como cloruro de sodio ( $NaCl$ ) o sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) a la fase acuosa; los componentes iónicos disminuyen la tensión en la superficie de las gotas de agua, e incrementan drásticamente la incompatibilidad entre el agua y los solventes orgánicos, facilitando la rápida y clara distinción de las dos capas (Aznar, 2011)

### 3.6 FILTRACIÓN

Es un método físico-mecánico para la separación de mezclas o sustancias compuestas de diferentes fases, está compuesta por una membrana porosa que separa en caliente, frío, por gravedad o por vacío. La disolución de la mezcla sólida en disolvente caliente, permite separar las impurezas insolubles, es más rápida; y se mantiene a la temperatura del disolvente evitando la formación de cristales en el papel de filtro.

Las filtraciones que se realizan en la separación de la cafeína se hacen con la solución caliente para evitar la formación de cristales y obtener un rendimiento óptimo. Esta operación debe efectuarse con mucho cuidado y rápidamente, con un mínimo de evaporación en el embudo y provisto de un filtro de pliegues para aumentar la velocidad de filtración (Fernández, 2008).

### 3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAFEÍNA

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas que se encuentra en muchas especies de plantas. Las fuentes más comunes son el café, el té (teína), guaraná (guaranina), mate (mateína), cacao y refrescos de cola, entre otros. El contenido de cafeína varía enormemente de unas plantas a otras e incluso también dentro de una misma especie. Así, el contenido en cafeína varía dependiendo de la variedad vegetal, y del método de separación. Las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: técnicas de separación y técnicas espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas proporcionan para cada compuesto analizado una información compleja relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos (Ribas, 2005).

**3.7.1 Cromatografía.** La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la diferencia de distribución de una muestra entre dos fases. La fase estacionaria que puede ser sólida o una película delgada y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa que se percola sobre la fase estacionaria o alrededor de la misma. Dependiendo el tipo de fase estacionaria se establece una clasificación de cromatografía, para la determinación de cafeína puede emplearse las técnicas cromatográficas de capa delgada y cromatografía gaseosa (Keeneth, 2001).

**3.7.2 Cromatografía de capa fina.** La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un

adsorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

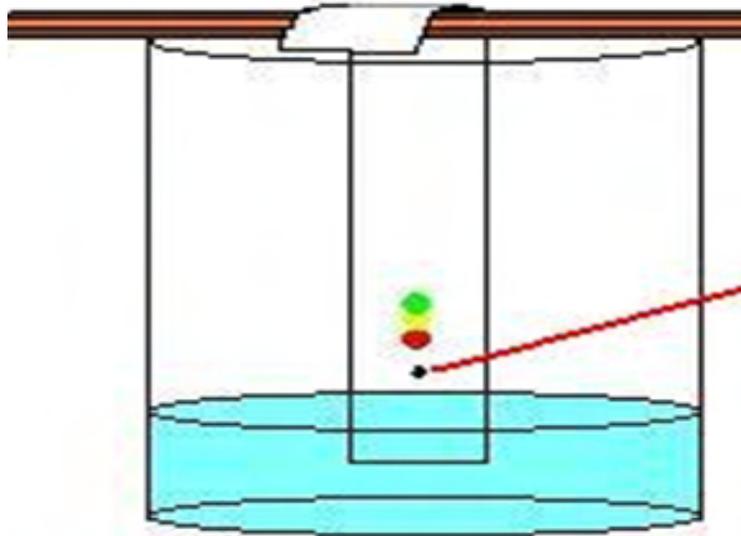
La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria por lo general es polar y el eluyente menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La separación depende de las propiedades adsorbentes de la capa, lo que hace de ésta una técnica analítica versátil, sensible en alto grado y rápido para separar en forma definida compuestos estructuralmente muy parecidos. Dependiendo del tipo de capa empleada, el mecanismo de la separación puede ser de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de inclusión, o una combinación de éstos.

El adsorbente tiene que tener afinidad por las sustancias a separar, tales como acidez, basicidad, carácter iónico, solubilidad y posibilidad de reacción con la capa o con el disolvente. Las sustancias hidrofílicas se separan sobre celulosa y celulosa con intercambio de iones, en cambio, el gel de sílice es apropiado para separar los aldehídos, cetonas, alcaloides, azúcares, fenoles, esteroides, ácidos grasos y aminoácidos.

El método de desarrollo ascendente es el método más sencillo en cromatografía de capa delgada (CCD) y en consecuencia el más usado. La fuerza gravitatoria limita el ascenso de disolventes y compuestos, que solo ascienden entre 10 y 18 cm sobre el punto de origen, por lo general colocado a 10 -15 mm del borde inferior de la placa. Las placas se acomodan en cubas o frascos de vidrio de fondo plano, El borde inferior de la placa se sumerge unos de 5 a 10 mm en el disolvente, sin que llegue a la línea de origen (Domínguez, 1982).

**Figura 2. Esquema de cromatografía de capa fina**



Fuente: Brewster, 1978.

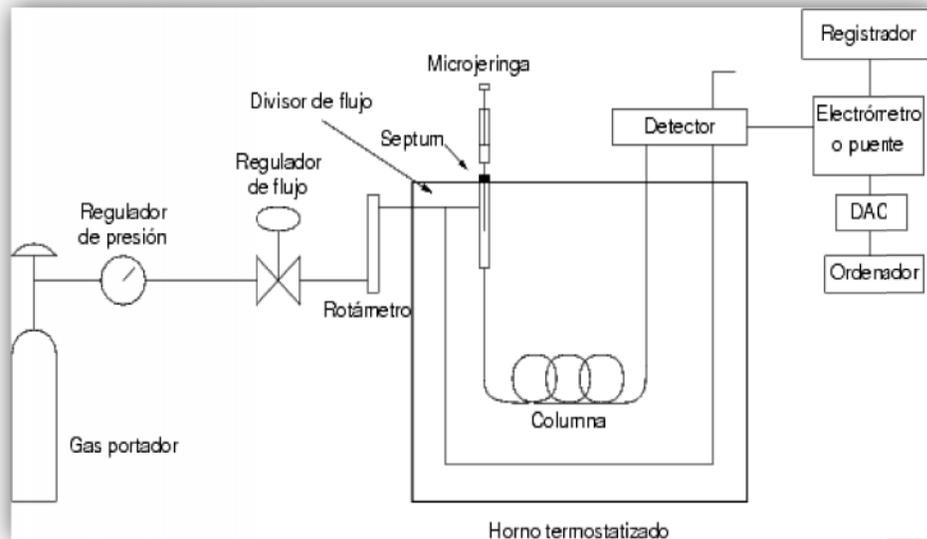
**3.7.3 Cromatografía de gases.** En la cromatografía de gases (CG) se utiliza un gas transportador de componentes volátiles que debe ser inerte y no puede reaccionar con la fase estacionaria ni con la muestra, puede ser helio o nitrógeno, éste fluye continuamente a través de un cilindro de gas a través de la cámara de inyección, de la columna y del detector.

El caudal del gas transportador se controla cuidadosamente para tener tiempos de retención reproducibles y disminuir al mínimo la derivada y los ruidos del detector. La muestra se inyecta comúnmente con una jeringa graduada en micro litros en la cámara de inyección donde se vaporiza y arrastra hasta la columna donde se encuentran partículas sólidas distribuidas de modo uniforme en una película delgada de un líquido de alto punto de ebullición (la fase estacionaria). La muestra se reparte entre el gas portador y la fase estacionaria y se separa en cada uno de sus componentes. Los componentes de la muestra que contiene mayor solubilidad en la fase estacionaria se desplazan con más lentitud y se eluyen mucho después en la columna.

Posteriormente, la muestra pasa a través de un detector, el cual mide la concentración de la muestra y genera una señal eléctrica. Esta señal se registra en un cromatograma. En muchos casos con la ayuda de un procesador de datos se integra automáticamente el área del pico y efectúa cálculos e imprime resultados cuantitativos y tiempos de retención (Domínguez, 1981).

Además la cromatografía de gases presenta ventajas como la alta resolución, velocidad, sensibilidad (detecta en ppm) y resultados cuantitativos. La exactitud y precisión en los resultados es función de factores técnicos, operacionales e instrumentales, como la elección correcta de la columna (tipo, longitud y diámetro) y el correcto uso de los componentes del cromatografía de gases: el sistema de inyección, la columna y el detector (Keulemans, 1957). En la figura 3 se muestra el esquema general de la CG.

**Figura 3. Esquema general de cromatografía de gases**

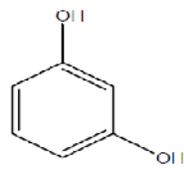


Fuente: Guil, 1958.

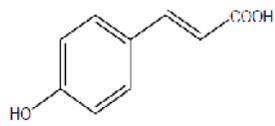
### 3.8 FENOLES TOTALES

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Debido a su reactividad se encuentran en la mayoría de los casos combinados con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero (Gracia, 2007).

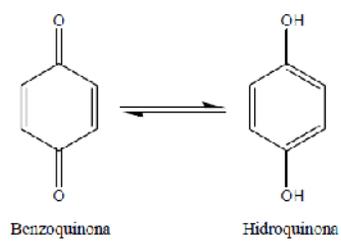
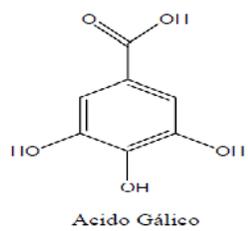
Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad

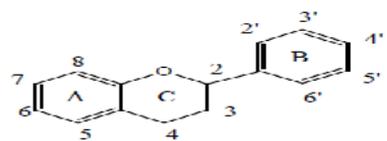


Resorcinol



Acido Cinámico





Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Otras propiedades incluyen actividad anti-cáncer, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la artero génesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas, oxidativas y acción antiinflamatoria (Siddhuraju, 2003).

**3.8.2 Actividad antioxidante en aromáticas.** En China por cientos de años el té es usado como bebida de consumo diario y como medicina. Posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anti cáncer, así como también capacidad para capturar los radicales libres y el oxígeno activo. Previene el daño oxidativo sobre el ADN e inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad.

La ingesta regular de té mejora el status antioxidante in vivo, y por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades coronarias. Los antioxidantes del té protegen contra fuertes mutágenos en modelos animales. Por otra parte, en estudios epidemiológicos se ha comprobado una disminución de la incidencia de cáncer en asociación a altos consumos de té.

El poder antioxidante del té se correlaciona fuertemente con el contenido de los flavonoles de las hojas verdes, principalmente catequinas y sus ésteres gálicos, sufren una polimerización oxidativa catalizada por la polifenoloxidasas, que vuelve negras las hojas. El contenido inicial de catequina, se convierte en tearubingenina y teaflavinas, que dan al té negro su característica astringencia (Benzie *et al.*, 1999).

En hierbas aromáticas tales como salvia, “tomillo, ginkgo biloba, menta, artemisia, aloe, valeriana, ciboulette, diente de león, dill, lavanda, hinojo, orégano, mejorana, melisa, perejil, romero, albahaca, laurel, sauco, coriandro, perejil, azafrán, manzanilla, tilo, tomillo, y vinca” se estudió el poder antioxidante y la composición polifenólica. Cada hierba tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad anti-oxidante de los flavonoides se incrementa con el número de grupos hidroxilo. Existe una relación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, en consecuencia, las hierbas son una buena fuente potencial de antioxidantes naturales (Proestos, 2005).

### **3.9 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES, METODO DE FOLIN - CIICALTEAU**

Los polifenoles tienen una alta capacidad de capturar radicales libres, resulta muy útil la evaluación del contenido total de fenoles porque se puede determinar la relación entre ésta y la actividad antioxidante evaluada.

Actualmente los fenoles totales son cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu, los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está formado por los ácidos fosfomolibdico (Slinkard *et al.*, 1997), luego de la reacción se forma una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno; esta coloración azul produce una absorbancia máxima a 765nm. Desarrollado el color azul se mide por espectrofotometría a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por muestra a analizar (Kuskoski, 2005).

## 4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes retrasan la oxidación inhibiendo la reacción en cadena. La propiedad redox se debe a compuestos fenólicos, que absorben y neutralizan radicales libres, descomponiendo radicales de oxígeno o peróxidos. Son compuestos con capacidad retardante que previenen el desarrollo de la ranciedad en los alimentos y el deterioro del flavor que se produce como consecuencia de la oxidación. Éstos propagan el periodo de inducción por lo que su adición retarda el enranciamiento (Pokonyet *al.*, 2001).

Los compuestos fenólicos capturan las especies reactivas del oxígeno, tales como radicales anión superóxido y radicales lípidos peroxi (Freitas, 1998). Las pro-cianidinas tienen actividad de captura de radicales libres y de oxígeno (Bagchi, 2000).

### 4.1 TIPOS DE ANTIOXIDANTES

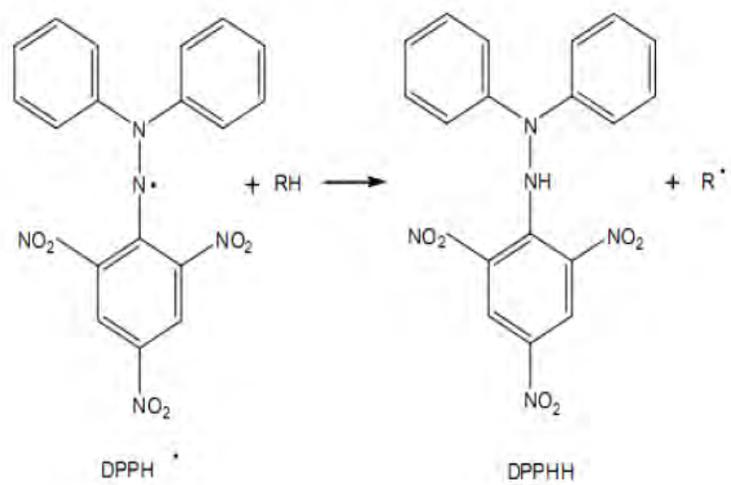
**Sintéticos:** son compuestos como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), la butilhidroxiquinona terciaria (TBHU), y los ésteres de ácido gálico, como el galato de propilo (PG). Son sustancias alquílicas que tienen solubilidad en grasas y aceites. Su uso en alimentos es del 0,02 % del contenido de grasa o aceite del alimento (Simic, 1981).

**Antioxidantes Naturales:** Éstos se encuentran en casi todas las plantas, microorganismos, hongos, incluso en los tejidos animales. Los principales son los tocoferoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Pokorny, 1999).

**4.1.1 Método de captura de radicales.** El principal mecanismo de los antioxidantes es la captura de radicales libres en todo tipo de alimentos. Se han desarrollado muchos métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la captura de los radicales libres sintéticos en solventes orgánicos polares, metanol, a temperatura ambiente entre otros. Los radicales usados son del tipo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) y 2,2- azinobis -3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).

La captura del DPPH<sup>•</sup> se mide a través de la disminución de la absorbancia, medida a 517 nm, que se produce por reducción de un antioxidante (AH) o por reacción con especies radicales (R), (Brand, 1995).





## 5. METODOLOGIA

El material vegetal (hojas de color verde-naranja) utilizado para los diferentes tratamientos, fue recolectado en el Municipio de Santiago, Departamento del Putumayo, en estado maduro, puesto que en esta etapa de crecimiento se cosechan las hojas para elaborar la bebida de guayusa. Se cortó con una tijera de podar previamente desinfectadas, las partes superiores de la planta para asegurar su regeneración. La identificación taxonómica de las muestras se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño.

**Figura 10. Arbusto guayusa (*Ilex guayusa*)**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

## 5.1 IDENTIFICACION TAXONOMICA

Figura 11. Ejemplar de (*Ilex guayusa*) y muestra (*Ilex guayusa*)



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La identificación taxonómica de las muestras se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño en comparación con el herbario de MISSOURI BOTANICAL GARDEN HERBARIUM. La planta a investigar recolectada en el municipio de Santiago esta clasificada y referenciada con el código de planta número 1961581.

## 5.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

**5.2.1 Secado.** Las hojas sanas, frescas y maduras se seleccionaron y lavaron con agua destilada. Posteriormente el material vegetal se procedió a secarlo utilizando unsecador de bandejas (INDUSTRIAS QUIMICAS FIQ LTDA), a una temperatura de 57°C con velocidad de aire de 20 m/s durante 7 horas. Se determinó la humedad del material vegetal dejando una muestra de hojas a 105°C por 5 horas hasta obtener peso constante.

**Figura 12. Secador de Bandejas**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

**5.2.2 Triturado.** Las hojas secas se trituraron en un molino de disco consiguiendo partículas pequeñas, luego se tamizó utilizando la serie de tamices estándar (TAYLOR).

**Cuadro 2. Abertura de tamiz estándar**

N° tamiz	pulgadas	milímetros
10	0,0797	2,02438
20	0,0331	0,84074
30	0,0234	0,59436

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

$$D_{pi} = ((D_{pi+1} + D_{pi})/2) \quad \text{Ecuación 3}$$

$D_{pi}$  = Diámetro promedio de la partícula

$D_{pi+1}$  = Diámetro promedio de la abertura del tamiz que paso

$D_{pi}$  = D diámetro del tamiz que retiene la partícula

### 5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA), con tres tratamientos, el tratamiento B que corresponde a la infusión preparada a una temperatura de 60°C. A que corresponde a la decocción preparada a temperatura de 92 °C (punto ebullición del agua en la Universidad de Nariño) y el tratamiento C que corresponde a la infusión preparada a una temperatura de 80°C, con tres repeticiones por cada tratamiento (*Legarda,2001*)

Las variables de respuesta fueron: contenido de Cafeína, fenoles totales y actividad antioxidante en los tratamientos de la bebida de guayusa(*Ilex guayusa*). El análisis estadístico de los datos fue realizado con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS CENTURIÓN © Plus versión XV.II.

**5.3.1 Análisis estadístico.** Se realizó un análisis de varianza para determinar la significancia estadística de los tratamientos sobre la variable de respuesta, por medio de:

- ✓ Cuadro ANOVA
- ✓ Prueba de rangos múltiples
- ✓ Gráfico de medias

### 5.4 OBTENCIÓN DE LA INFUSIÓN

En 100 mL de agua destilada a una temperatura de 60 y 80 °C respectivamente se adicionó 10 g de muestra molida y seca se mantuvo la temperatura durante 15 minutos (*Cubides et al., 2002*). Los extractos se filtraron en caliente y por separado se ambientaron luego se envasaron en recipientes de vidrio. Luego, se conservaron en refrigeración para posteriores análisis.

### 5.5 OBTENCIÓN DE LA DECOCCIÓN

A 100 mL de agua destilada se adicionó 10 g de muestra molida y seca, se llevó a temperatura de ebullición de 92°C (a presión atmosférica experimental), se mantuvo la temperatura durante 15 minutos (*Endara et al., 2008*). El extracto se filtró en caliente se dejó ambientar y se envasó en recipientes de vidrio. Se conservó en refrigeración para posteriores análisis.

**Figura 13. Obtención de los extractos de guayusa (*Ilex guayusa*)**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

## **5.6 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES**

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el método de Folin y Ciocalteu, la reacción fue realizada con 0,1 mL de extracto, 0,5 mL del reactivo Folin –Ciocalteu y 1,5mL de una solución acuosa de carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%p/v; aforando a 10 mL con agua grado HPLC. Transcurridas 2 horas se realizó el seguimiento por espectrofotometría. se tomó lectura de absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (uv-vis perkinelmer modelo lambda 11)(Kuskoski, 2005).

De igual manera se realizó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 50; 100; 150; 250 y 500 ppm, expresando los resultados en mg equivalente ácido gálico/g de muestra seca. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

## 5.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

**Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).** Se tomó 1,5 mL de la solución DPPH• a una concentración de 0,1 mM y se mezcló con 1,5 mL de extracto. La mezcla se agitó y se dejó por treinta minutos a temperatura ambiente: luego se midió la absorbancia a 517 nm espectrofotómetro (uv-vis perkinelmer modelo lambda 11). Para el blanco se utilizó agua grado HPLC.

De igual manera se realizó una curva de calibración con el antioxidante sintético trolox en soluciones de 0.005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05; y 0,06 mM, expresando los resultados en mM equivalentes a trolox / g de materia seca. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

## 5.8 DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA

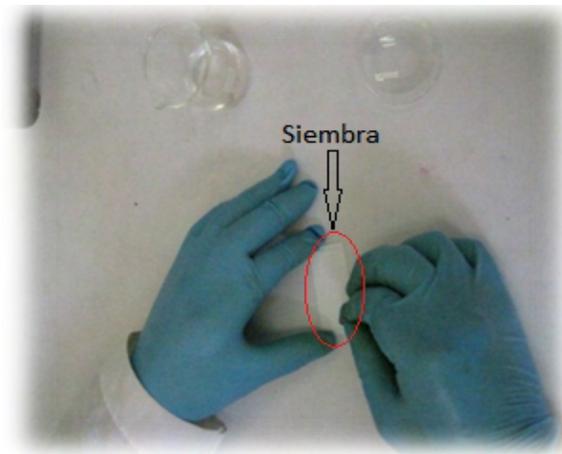
**5.8.1 Obtención de cafeína.** De los extractos obtenidos por infusión y decocción descritos en el numeral 5.3 y 5.4 se midieron 150 mL, adicionando 5 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se filtró y se dispuso en un embudo de separación, se agregó 15 mL de diclorometano y se removió la capa inferior orgánica. Se repitió la extracción de acuerdo al seguimiento cromatográfico de capa fina (Benavides, 2005).

**Figura 14. Proceso de extracción de cafeína**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

$$SR = Si \left( \frac{100mL}{7.8 * 15mL + 100mL} \right)^{21}$$



**5.8.4 Método de cromatografía de gases.** Obtenidas las distintas fases orgánicas se transfirieron a sus respectivos viales para el análisis cromatográfico; se empleó la siguiente programación de temperatura: 180°C (2) minutos hasta 300°C a 5°C/minuto (10 minutos). El detector FID se mantuvo a 300°C y el puerto de inyección Split a 28°C. El flujo de gas de arrate se mantuvo constante a 1 mL/ minuto. Se empleó una columna cromatográfica DB5- MS (30m; 0,25mm; 0,25umL .Integración programa Class VP v.43.Volumen de inyección 1,0 µL. Equipo shimadzu GC17AV3 (Domínguez, 1981).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 HUMEDAD DE LA HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa*)

La humedad de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa*) es del 67.1% valor obtenido con el desarrollo de la metodología del numeral (5.1.1). Indicando que su rendimiento es de 32,3 g/100 g de muestra seca, igualándose al rendimiento de las plantas aromáticas deshidratadas que se encuentran en el comercio actual.

### 6.2 TAMIZADO

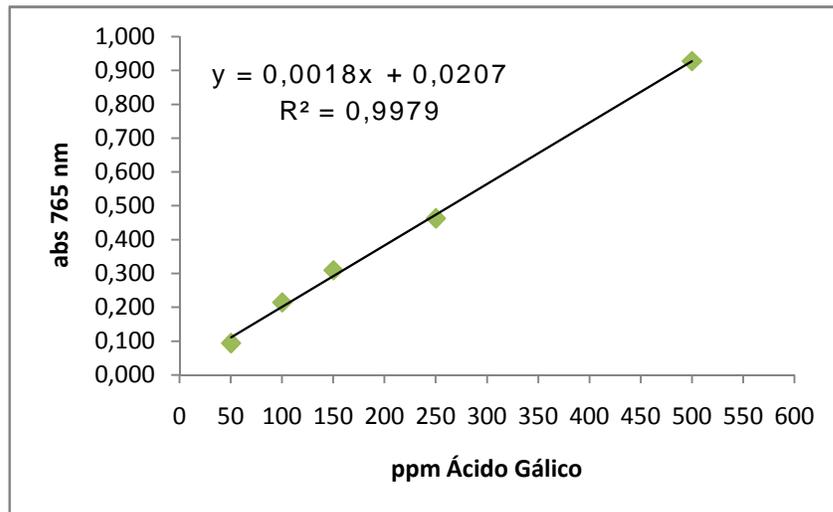
Figura 16. Serie de tamiz estándar



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

Una vez tamizado se tomó la muestra retenida en el tamiz No.20 con un tamaño de partícula promedio de 0,717 mm, tomando como referencia el tamaño de partícula de las plantas aromáticas que se distribuyen como tizanas, el tamaño de partícula de las tizanas se realizó con experimentación en la planta piloto con la cual se realizaron los diferentes experimentos. El diámetro promedio de partícula se calculó con la ecuación 3.

Tamiz	DP+1	Dpi	Dpi promedio mm
10	2,02438	0,84074	1,43256
20	0,84074	0,59436	0,71717



#### Cuadro 4. Cantidad de fenoles totales encontrados en extractos acuosos

R: Replicas; FTIN: fenoles totales infusión 80°C; FTIN: fenoles totales infusión 60°C; FTD: fenoles totales decocción 92°C

Muestra	Fenolestotales ( mg AGE / g ms)		
	R1	R2	R3
FTIN60	51,83 ± 0,002	51,27±0,001	50,72±0,001
FTIN 80	76.83±0,002	76,27±0,002	75,72±0,002
FTD 92	103.5± 0,003	102.94±0,003	104.05±0,001

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La Cuadro 4 indica el contenido de fenoles totales valores expresados en mg equivalentes a ácido gálico (GAE)/ g ms. Los resultados obtenidos para cada tratamiento se obtienen de tres réplicas por triplicado, cada réplica es el promedio obtenido de las absorbancias del anexo A. La matriz de resultados presenta el valor y la desviación estándar que es analizada con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS CENTURIÓN © Plus versión XV.II y se muestran a continuación.

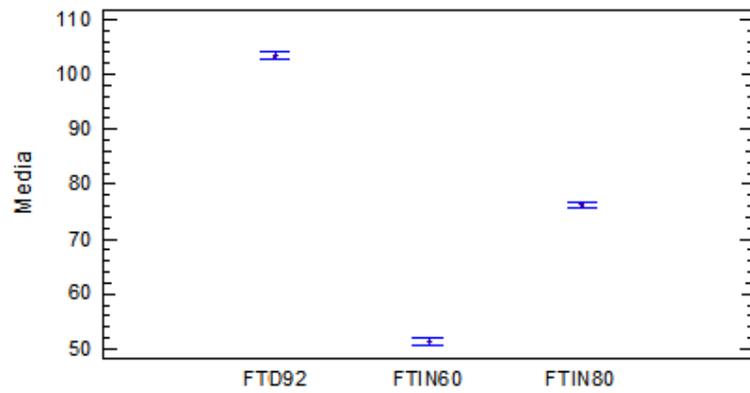
#### Cuadro 5. ANOVA para fenoles totales

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4093,39	2	2046,69	6644,39	0,0000
Intra grupos	1,8482	6	0,308033		
Total (Corr.)	4095,23	8			

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

El análisis de varianza de la Cuadro 5 muestra que el efecto de la temperatura es significativo en la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos acuosos con un valor-P menor que 0.05 por lo que se establece una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos asociados por la temperatura, con un nivel de confianza del 95%. Por tanto a una temperatura de 92°C se obtiene mayor cantidad de fenoles totales, mientras que a temperaturas de 80°C y

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
FTIN60	3	51,2733	X	
FTIN80	3	76,2733		X
FTD92	3	103,497		X



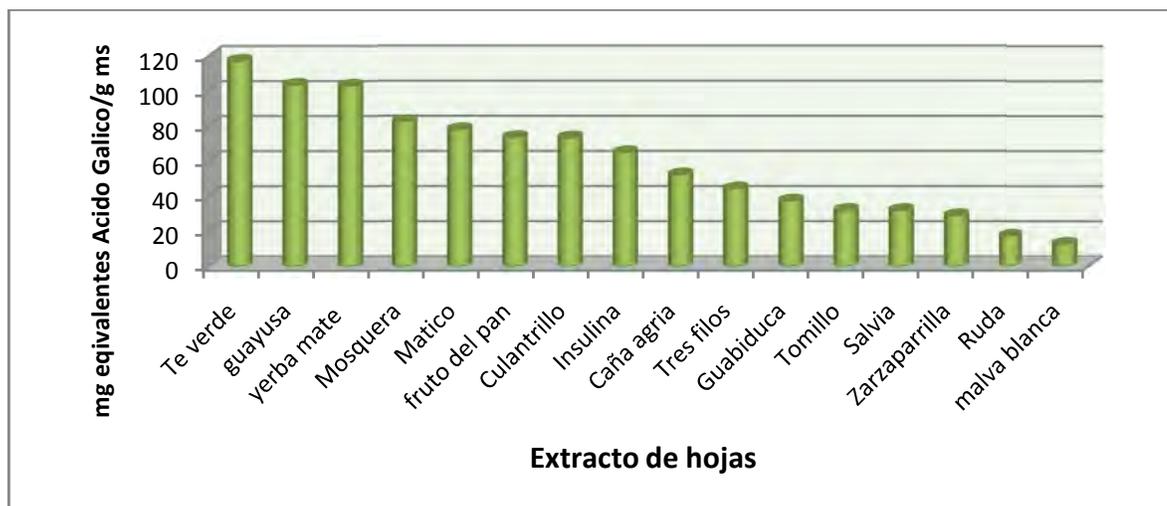
método de infusión a 80°C se obtuvo un valor de 76,27 mg equivalentes en GAE /g ms a 60°C la cantidad obtenida es de 51,27 mg GAE /g ms la temperatura de 92°C es la más eficiente para obtener mayor concentración de fenoles totales en la bebida de guayusa corroborado con la investigación de Paladino (2008), sobre la cinética de extracción de compuestos fenólicos en semillas de vid, empleando agua destilada como solvente y temperaturas de tratamiento de 60°C y 90 °C. Demostrando que la extracción a 90° es 6,7 veces mayor que la lograda a 60°C. En la extracción a 60°C, la velocidad es pequeña y se mantiene prácticamente constante. Mientras que en la extracción a mayor temperatura, se reduce a un 4,2 % de la velocidad inicial, resultando siempre más eficiente la extracción a 90°C aun cuando se consideren tiempos mínimos. De igual manera Oszmianski (1986), trabajó con maceraciones de semillas de vid en soluciones acuosas obteniendo resultados similares.

#### Cuadro 7. Cantidad de fenoles totales en algunas plantas

Nombre Común	Especie	mg GAE /g ms	Referencia
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	32	(Armatu,2010)
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	32	
Zarzaparrilla	<i>Smilax officinalis</i>	29	(Gálvez <i>et al.</i> , 2010)
Matico	<i>Piper angustifolium</i>	78	
yerba mate	<i>Ilex paraguariensis</i>	103	
malva blanca	<i>Malva silvestres</i>	12,8	
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	17,43	
Te verde	<i>Camellia sinensis</i>	117,3	(Naveda, 2010)
Mosquera	<i>Croton wagneri</i>	82,6	(Samman, 2001)
fruto del pan	<i>Artocarpus altilis</i>	73,5	
Culantrillo	<i>Adiantum poiretii</i>	73,3	
Insulina	<i>Justicia colorata</i>	64,9	
Caña agria	<i>Costus comosus</i>	52,3	
Tres filos	<i>Baccharis genistelloides</i>	44,3	
Guabiduca	<i>Piper crasinervium</i>	37,4	
Guayusa	<i>Ilex guayusa</i>	103.49	

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

**Figura 19. Comparación del contenido de fenoles con otras plantas**



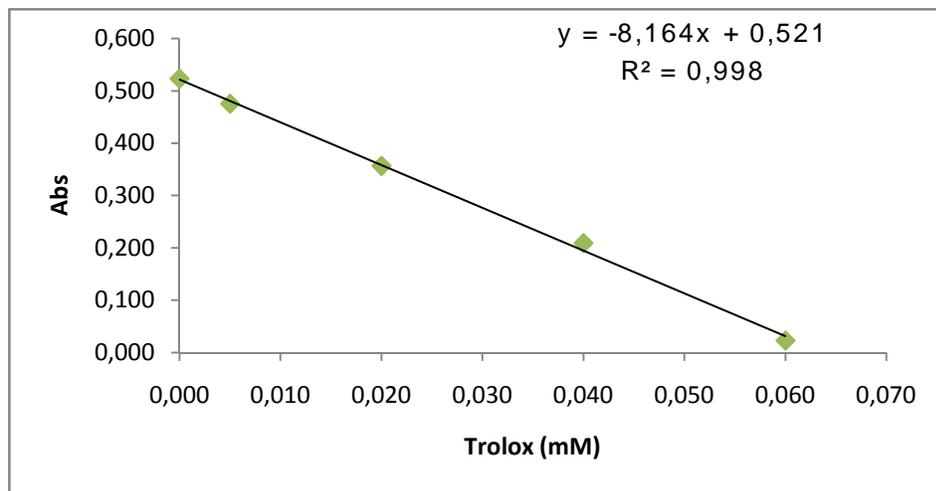
Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La Cuadro 7 indica que el extracto acuoso de guayusa (*Ilex guayusa*) contiene una considerable cantidad de fenoles totales respecto a otras plantas, este resultado crea la posibilidad de utilizar la especie como una planta promisoría para generar un aislamiento de sustancias fenólicas proyectando una bebida que se incluya en la dieta alimenticia.

La guayusa aparte de ser una planta medicinal se considera como un té tradicional, ratificando el nombre de mate Ecuatoriano por Innerhofer (2001), los resultados de este trabajo sugieren que la bebida de guayusa podría promoverse como una bebida de consumo popular similar al mate en Argentina y el té en el Oriente.

#### **6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Uno de los métodos más utilizados en la medición de la actividad antioxidante, es la Capacidad antioxidante equivalente en trolox (TEAC), está basada en la reducción del radical DPPH<sup>•</sup> estableciendo un grado de decoloración que vira de púrpura a amarillo que puede ser determinada espectrofotométricamente. La curva de calibración se realizó con el promedio de lecturas de absorbancia de las tres réplicas a 517nm versus la concentración de trolox en mM. Los datos obtenidos fueron analizados por regresión simple con la ayuda del programa STATGRAPHICS CENTURIÓN © Plus versión XV.II, obteniendo un coeficiente de variación de 0,9982 el cual indica que hay una buena linealidad entre los datos.



Tratamientos	mM TEAC /g ms		
	R1	R2	R3
AOD92	0,0445±0,002	0,0445±0,002	0,0446±0,002
AOIN80	0,0406±0,001	0,0405±0,001	0,0407±0,001
AOIN 60	0,0365±0,002	0,0364±0,002	0,0371±0,002

La matriz de resultados indica el valor y la desviación estándar que es analizada con la ayuda del programa STATGRAPHICS CENTURIÓN © Plus versión XV.II.

### Cuadro 9. ANOVA para actividad antioxidante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0000928267	2	0,0000464133	888,77	0,0000
Intra grupos	3,13333E-7	6	5,22222E-8		
Total (Corr.)	0,00009314	8			

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

El análisis de varianza de la Cuadro 9 muestra un valor-P menor que 0.05 lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativo entre los tres tratamientos asociados por la temperatura, con un nivel de confianza del 95%. Por lo que a una temperatura de 92°C se obtiene mayor actividad antioxidante, mientras que a temperaturas de 80°C y 60°C disminuye progresivamente.

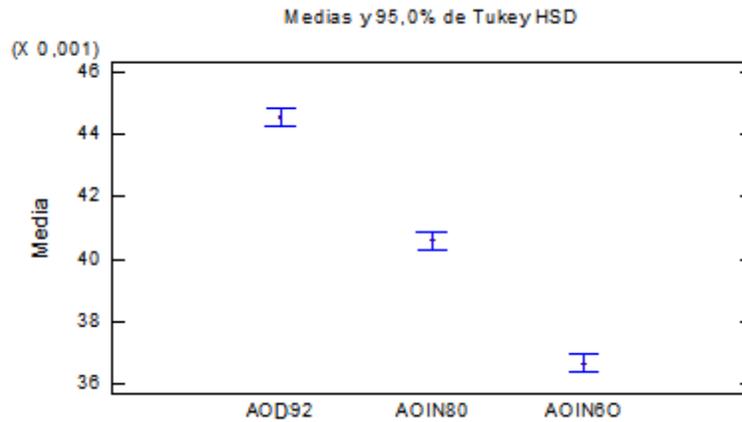
### Cuadro 10 .Prueba Rangos Múltiple para actividad antioxidante

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>		
AOIN 60	3	0,0366667	X		
AOIN 80	3	0,0406		X	
AOD 92	3	0,0445333			X

AOD92= actividad antioxidante decocción 92°C; AOIN80 =actividad antioxidante infusión 80°C; AOIN60= actividad antioxidante infusión 60°C

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

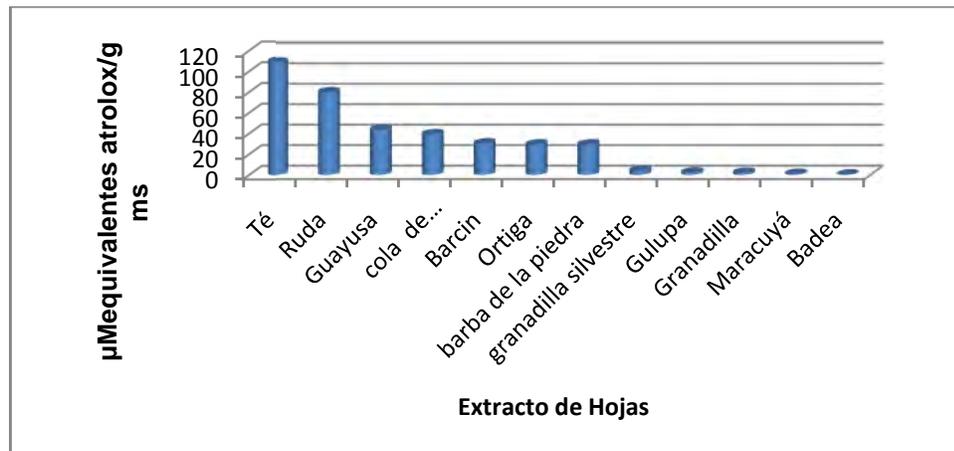
La prueba de rangos múltiples de la Cuadro 10 comprueba la existencia de grupos no homogéneos encontrando una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% entre sus medias contrastadas por el método HSD de Tukey.



Nombre Común	Especie	uMequivalentes a Trolox /g ms	Referencia
Badea	<i>Passiflora quadrangularis</i>	0,57	
Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i> Juss	2,32	(Carvajal et al.,2011)
granadilla silvestre	<i>Passiflora sp</i>	4,3	
Gulupa	<i>Passiflora edulissimis</i>	2,6	
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i>	1,2	
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	81	(Naveda, 2010)
Té	<i>Camellias inensis</i>	110	(Garcia,2011)
cola de quirquincho	<i>Lycopodium saururus</i>	40	(Dadé et al.,2009)
Ortiga	<i>Urtica dioica</i>	30	
barba de la piedra	<i>Usnea gracilis</i>	30	
Barcin	<i>Caphyllum sp.</i>	31	(Mesa et al.,2010)
Guayusa	<i>Ilex guayusa</i>	44,5	Esta investigación

En la Cuadro 11 se presenta la actividad antioxidante de extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de diferentes especies de plantas (hojas), con su respectiva capacidad antioxidante expresada en  $\mu\text{M}$  equivalentes a Trolox/g ms

**Figura 22. Comparación de actividad antioxidante con otras plantas**

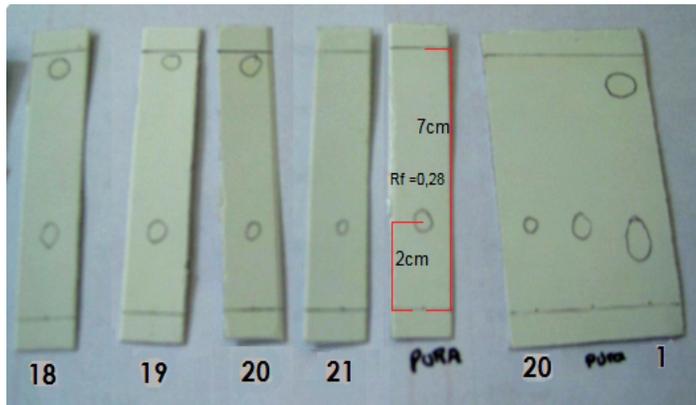
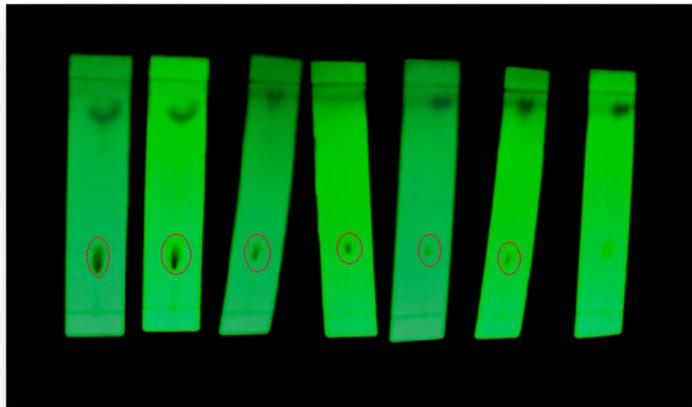


Fuente: Este Estudio, año, 2012.

En la figura 22 se compara la actividad antioxidante del extracto de la guayusa (*Ilex guayusa*) obtenido por el método de cocción a  $92^{\circ}\text{C}$ , representado con un valor de  $44,5\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g.ms teniendo en cuenta que el extracto de guayusa fue obtenido por extracción con agua, indicando que podría aumentar su valor si se haría una extracción con solventes orgánicos los cuales tienen más afinidad por los componentes químicos que ejercen la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas de la especie *Passiflora* reportados por Carvajal (2011), indican valores entre  $0,57$  y  $4,3\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g. Dado que otros (2009), en su investigación sobre extractos acuosos de plantas nativas del Argentina encontraron valores de  $40\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g.ms para "cola de quirquincho", "ortiga"  $30\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g.ms y  $30\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g.ms., para "barba de piedra". Mesa y otros (2010), investigadores de la universidad de Antioquia en Colombia, encontraron que las hojas de "barcin" poseen una actividad antioxidante de  $31\mu\text{M}$  equivalente a Trolox/g.ms. Los anteriores datos en comparación con las hojas de guayusa registran una actividad antioxidante menor.

Por tanto la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*) presenta un promedio considerable en cuanto a su actividad antioxidante, demostrando que los compuestos fenólicos totales se correlacionan de manera directa con los valores de la acción antioxidante, confirmando que el método de decocción con una temperatura de



Los cromatogramas se revelaron con lámpara UV a 517nm. Se marcaron las manchas con un lápiz y se calculó el factor de retención con la ecuación 4, el procedimiento de cromatografía de capa delgada pudo identificar la cafeína desde la primera extracción, donde la muestra sembrada generó un punto grande equidistante al patrón. También se eluyeron otros compuestos catalogados en el ensayo como impurezas. Las muestras problema mantuvieron el mismo Rf del patrón, equivalente a 0,28. Al aumentar el número de etapas de extracción el punto de cada muestra disminuye de diámetro, sin embargo, se mantiene su Rf. En la extracción 21 la placa reveló el patrón mas no la muestra, generando un punto único de cafeína pura (patrón). Indicando que la cafeína extraída era muy mínima y no se detectaba con la cromatografía. Lo cual significa que es suficiente realizar 21 extracciones sucesivas para extraer la mayor cantidad de cafeína presentes en las hojas de guayusa. Para calcular el soluto remanente se utilizó la ecuación del numeral 5.7.2

$$SR = 0,035g \left( \frac{100mL}{7,8 * 15mL + 100mL} \right)^{21} = 2,289 * 10^{-38} g$$

La ecuación 2 indica que el valor teórico del soluto remanente en el extracto acuoso del experimento es de  $2,289 \times 10^{-38} g$ ; este valor teórico se acerca a cero lo que refleja que la extracción realizada en las condiciones referentes al numeral 5.7.1 tiene buena eficiencia, además comprueba la utilidad del seguimiento cromatografico por (CCD), ya que éste puede detectar hasta mínimas concentraciones de cafeína en el extracto solvente de diclorometano.

**6.5.2 Concentración de cafeína.** Los extractos de cada tratamiento y a la vez de cada extracción se mezclaron por separado obteniendo un volumen total de 300mL de diclorometano para cada tratamiento, luego se concentró la cafeína por medio de destilación simple hasta obtener una cafeína en estado sólido, de color verde claro, que es indicativo de sus impurezas.

**Figura 24. Cafeína cruda**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

Se concentraron de 20 a 35 mg en promedio de cafeína cruda por cada tratamiento. Estas impurezas se relacionan con la muestra sólida debido a que no solo se puede extraer cafeína, sino muchos más componentes de la solución madre, a pesar de que se utilizó una metodología de extracción de alcaloides. Para liberar la cafeína de las impurezas las muestras se limpiaron mediante 2 lavados con gotas de acetona a temperatura ambiente, después de separada la acetona se obtuvo el sólido con color blanco. Las muestras se enviaron al laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño sede Torobajo, para el análisis por cromatografía de gases.

**Figura 25. Muestras de cafeína lavadas con acetona**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

## 6.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES

De cada una de las muestras se tomaron 1,9 mg, se disolvieron en 4mL de metanol grado HPLC y se almacenaron en viales de color ámbar para el análisis de CG.

**Cuadro 12. Cafeína total y pureza**

TRATAMIENTO	CAFEINA TOTAL (mg)	PUREZA (%)	TIEMPO DE RETENCION EN MINUTOS
PATRON	1,9	100,0	7,949
CFTD921 <sup>a</sup>	31,35	89,75	7,999
CFTD922 <sup>a</sup>	34,35	98,903	7,958
CFTD923 <sup>a</sup>	29,1	88,437	7,841
CFTI801 <sup>a</sup>	29,1	96,045	8,058
CFTI802 <sup>a</sup>	29,85	100,0	8,049
CFTI803 <sup>a</sup>	20,1	98,373	7,983
CFTI601 <sup>a</sup>	17,661	77,122	7,941
CFTI602 <sup>a</sup>	16,40	100,0	7,891
CFTI603 <sup>a</sup>	13,18	98,374	7,891

<sup>a</sup>. Replicas por tratamiento, CFTD92: Cafeína Total Decocción a 92°C, CFTI80: cafeína Total Infusión a 80°C, CFTI60: cafeína Total Infusión a 60 °C.

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La Cuadro 12 presenta el contenido de cafeína cruda total en mg obtenido de cada uno de los tratamientos por triplicado, logrado de las extracciones de la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*). Además muestra la pureza de cada una de las réplicas obtenidas por medio de cromatografía de gases. El rango de impureza oscila entre 22,87-0,0%. Los porcentajes más altos se atribuyen a errores experimentales desde la preparación de la muestra hasta la inyección de la misma.

**Cuadro 13. Contenido de cafeína en extracto acuoso**

Tratamiento	Cafeína en mg/ 150 mL		
	R1	R2	R3
CFTD92	28,08	33,97	25,74
CFTI80	27,95	29,85	19,77
CFTI60	26,49	24,60	19,77

R: Replicas

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

Los valores de cafeína en mg obtenidos por cada réplica fueron calculados teniendo en cuenta la pureza reportada por el método de cromatografía de gases. Para su identificación se utilizó cafeína al 100% marca Merck como patrón externo, el cual arrojó un tiempo de retención de 7,949 minutos. Los cromatogramas se indican con detalle en el anexo C.

#### **Cuadro 14. ANOVA para cafeína**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	48,4553	2	24,2276	1,24	0,3546
Intra grupos	117,363	6	19,5605		
Total (Corr.)	165,818	8			

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

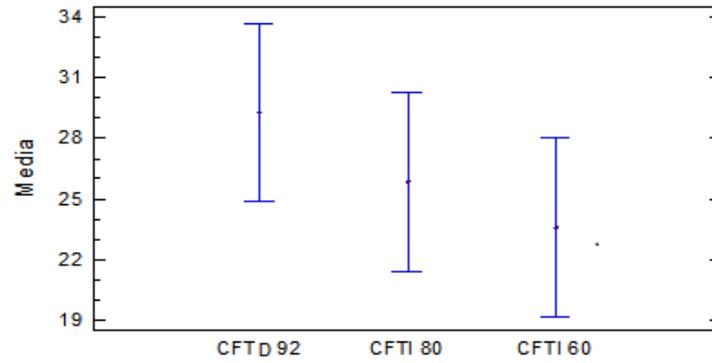
La Cuadro 14 ANOVA indica que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%,  $P > 0.05$ , por tanto los extractos de guayusa obtenidos a diferentes temperaturas no presentan diferencias significativas en cuanto al contenido de cafeína.

#### **Cuadro 15. Prueba de rangos múltiples para cafeína**

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CFTI 60	3	23,62	X
CFTI 80	3	25,8567	X
CFTD 92	3	29,2633	X

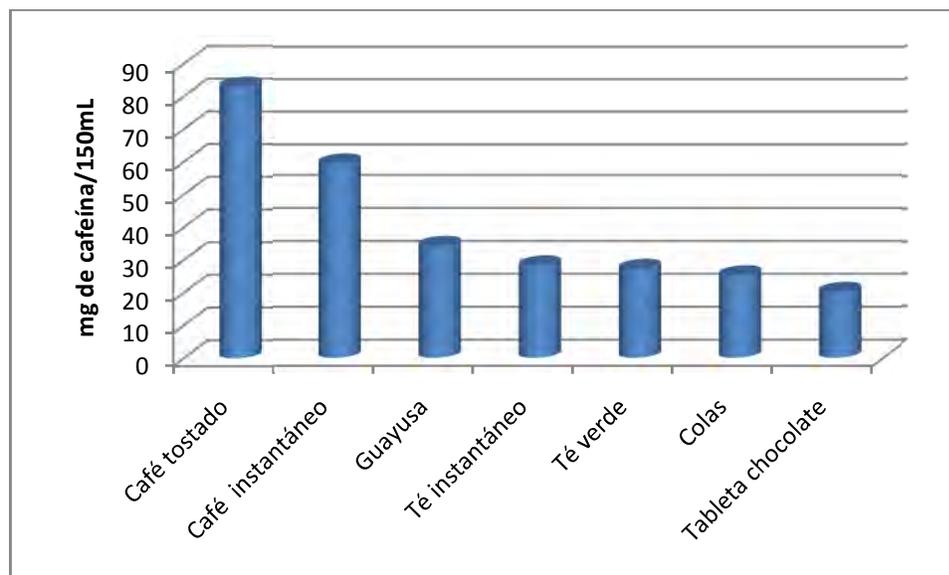
Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La Cuadro 15 comprueba la existencia de grupos homogéneos, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de infusión a temperaturas de 60 y 80°C con un nivel de confianza del 95% entre sus medias contrastadas por el método HSD de Tukey.



BEBIDAS COMERCIALES	CAFEÍNA PROMEDIO mg/150 mL
Café tostado	83
Café instantáneo	59
Té instantáneo	28
Té verde	27
Colas	25
Tableta chocolate	20
Guayusa	33,97

**Figura27. Comparación de bebida de guayusa con bebidas comerciales.**



Fuente: Este Estudio, año, 2012.

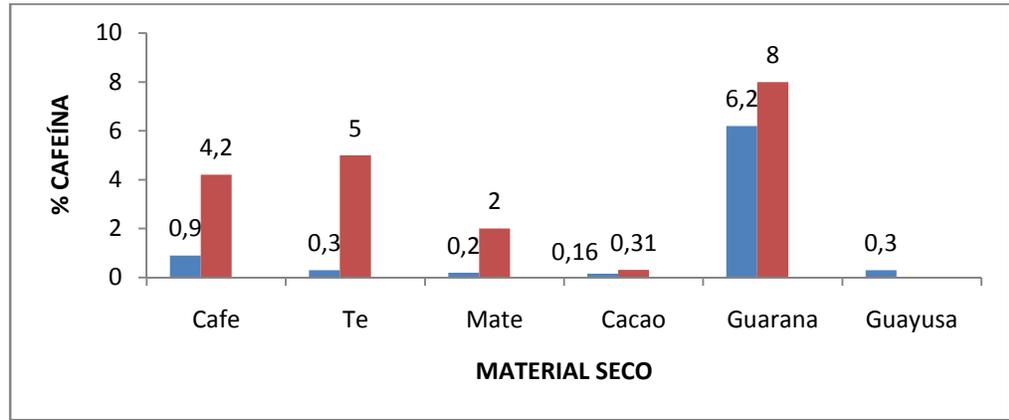
Según la comparación de la figura 27 Se establece que la bebida de guayusa puede ser parte de las bebidas comerciales más populares que contienen cafeína sin importar el método de preparación, ya que en infusión a temperaturas de 60 y 80°C y la cocción a 90°C presentan similitud en la cantidad de cafeína. Se puede considerar como una bebida que supera en el contenido de cafeína al té verde, té instantáneo, colas y chocolate, pero muestra una cantidad menor de cafeína con respecto al café, lo cual indica que la guayusa se encuentra entre las plantas que contiene cafeína utilizadas par bebidas energizantes.

**Cuadro 17. Rangos de cafeína en porcentajes en diferentes especies**

PLANTA	%DE CAFEÍNA EN MATERIAL SECO	FUENTE
Café	0,9 - 4,2	(Aznar,2011)
Té	0,3 – 5	
Mate	0,2 – 2	
Cacao	0,16 - 0,31	
Guaraná	6,2 – 8	
Guayusa	0,3	

Fuente: Este Estudio, año, 2012.

La Cuadro 17 indica los rangos en porcentajes del contenido de cafeína de diferentes plantas comerciales.



## 7. CONCLUSIONES

La cantidad de fenoles totales determinada en la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*) mediante el método de Folin- Cicalteau, es de 103.49 mg de AGE/g ms para el método de decocción a 92 °C, y de 76,27 mg de AGE/g ms para el método de infusión a 80 °C y 51,27 mg de AGE/g ms para 60°C mostrando ser superior en el contenido de fenoles totales a la bebida de mate.

La actividad antioxidante evaluada por el método DPPH\* en la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*) preparada por los métodos de infusión y decocción, presentó un valor de 0,0445 mM equivalentes a trolox (TEAC) / g ms a 92 °C que en comparación con extractos de hojas de plantas medicinales referenciadas en la investigación se encuentra en un límite superior, dando como resultado una buena actividad antioxidante para la elaboración de una bebida con propiedades funcionales.

El análisis cromatográfico para el contenido de cafeína en la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*) preparada por los métodos de infusión y decocción, dio como resultado un valor de 29,3 mg/ 150 mL de bebida con una pureza que varía entre 77,12 y 100%. Indicando que la bebida contiene un alto contenido de cafeína ya que su valor cuantitativo es superior al té verde, té instantáneo, colas y tabletas de chocolate.

La investigación generó un resultado positivo en cuanto al contenido de cafeína fenoles totales y actividad antioxidante, lo cual da pie a la industrialización de la hoja de guayusa para su comercialización en el mercado regional nacional e internacional en presentaciones de bebida o tizana, compitiendo con el café chocolate y te pero resaltando que la guayusa contiene componentes activos para mantener la salud y prevenir enfermedades degenerativas.

## 8. RECOMENDACIONES

Dar continuación a la investigación enfocándose al tiempo de conservación de la bebida de guayusa (*Ilex guayusa*) identificando la estabilidad de fenoles totales y actividad antioxidante encontrada en el trabajo.

Cuantificar la actividad antioxidante utilizando otros métodos en muestras de la misma variedad, edad y sitio de recolección para identificar diferencias en cuanto a su capacidad para atrapar radicales libres.

Complementar la investigación con otros análisis químicos como el contenido de vitaminas, saponinas y aminoácidos para su posterior comercialización.

Elaborar un plan de negocios para la industrialización de la hoja de guayusa en diferentes presentaciones para el mercado regional, nacional y extranjero.

## BIBLIOGRAFIA

**ABC TESTING, INC**, Advanced Botanica IConsulting &Testing, Inc [en línea] [citado 20-8-2011] disponible en internet: <http://es.scribd.com/doc/59140095/Guayusa-Antioxidants-ABC-Labs>.

**AnselmeF, K Collomp, B Mercier. S Ahmaidi, C Prefaut.** Caffeine increases maximal anaerobic power and blood lactate concentration. *Eur J Appl Physiol* (1992).

**Armatu A, Colceru-Mihul S.** Evaluation of antioxidant and free scavenging potentialof some Lamiaceae species growing in Romania, *Romanian Biotechnological Letters*, University of Bucharest , Romania,2010.

**Armstrong,** Caffeine, body fluid-electrolyte balance, and exercise performance. *Int J Sports Nutr Exerc*, 2002.

**Aznar, Silvia:**“Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales”, Universita Politècnica de Catalunya (UPC), 2011.

**Bagchi, D.;** Free radicals and grape seed proanthocyanid in extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 2000.

**Barry D. Smith,** Uma Gupta, Bhupendra S. Gupta. Caffeine and activation theory: effects on health and behavior. CRC Press; 1ª Edición, 2006.

**Bastos, D. ; Ishimoto, E. Y.; Marques, M. O.; Ferri, A. F.; Torres, E. A.** Essential oil and antioxidant activity of green maté and maté-tea (*Ilex paraguariensis*), infusions. *J. Food Com*, 2006.

**Bastos, Sofia.** Results and Conclusions of the Workshop: Sustainable Cultivation of Medicinal Plants, Aromatics and Species for Alternative Development in the Department of Putumayo, Editorial de la UPV, Colombia, 2002.

**Benavides, Olga Lucia.** Guía para la extracción de cafeína en diferentes productos, universidad de Nariño, 1ª edición. 2005

**Benzie, Iris,Y.T. Szeto.** Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. FoodChem.* Vol. 47, 1999.

**Borille A. M.** Reissmann C. B.; Freitas R. J. S. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.). B.CEPPA, Curitiba, v. 23, 2005.

**Brand- Williams W, Cuvelier, Berset C.** use of free radical method to evaluate antioxidant activity lebensm- wiss . u –technol, 1995.

**Brewster, RQ** y otros; Curso de química orgánica experimental; Ed. Alhambra, 1978

**Burneo, Lorena;** Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador: *adiantum poiretti* (culantrillo), *neonelsonia acuminata* (zanahoria blanca), *siparun aeggersii* (monte de oso), *ilex guayusa* (guayusa), universidad técnica particular de Loja instituto de química aplicada Loja – Ecuador 2009

**Cao, Guohua; Sofic Emin.** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure- Activity Relationships. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 22 ,1997.

**Carvajal L., Luz, Turbay., Sandra, Rojano., Benjamin.** Algunas especies de *depassiflora* y su capacidad antioxidante. Universidad de Antioquia (Colombia), Rev Cubana Plant Med v.16 no.4. Ciudad de la Habana, oct.-dic., 2011.

**Celis, Natalia.** Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extractos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *phyla (lippia) dulcis*, especies de la familia Verbanaceae, scientiatechnica. Universidad tecnológica de Pereira, Colombia, 2007.

**Climent, María.** Experimentación en química: química orgánica, ingeniería química, editorial de la UPV camino de VERA, 2005.

**Correa Q., J. Y H.Y. Bernal.** Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello, Tomo I “A”. Ministerio de Educación y Ciencia de España, Junta del Acuerdo de Cartagena (JUNAC) y Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB). Editora Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia, 1989.

**Cubides, A. Y Gonzales, E.,** “Farmacognosia”, Editorial UNAD (universidad nacional abierta y a distancia), Bogotá, D.C., Colombia, p. 7-15, 185-192 año 2002

**Dadé., Martin, Floravanti., Daniel, Schinella., Guillermo, Tournier.,** Horacio. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra Valle y (Argentina), Universidad Nacional de la Plata, Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2009.

**Doherty M, PM Smith,** Effects of caffeine ingestion on exercise performance a meta-analysis. Int J Sports NutrExMetab. In the Press, 2004.

**Dominguez, Alejandro.** Cromatografía de gases. Washington, Edición Eva, Editorial 2ª, 1982.

**Endara, L., Soria, S y Pozo, F.,** Medicina Tradicional Andina y plantas curativas, Herbolario de plantas curativas y Medicinales misterio de salud pública, programa de apoyo al sector salud en el Ecuador, Quito - Ecuador, pp 20,362-365 2008

**Estrella, J.; R. Manosalvas; Y M. Ribadeneira.** Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Fundación Ecuatoriana de Estudios Ecológicos (Eco Ciencia), INIAP, MAE y Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador. 116 pp. 2005.

**Fernandez, Mercedes.** Operación unitaria para separar un sólido desde un Fluido o un fluido desde otro, Editorial Politécnica de València, 1ª edición, 2008.

**Freitas, V.; Glories, Y.; Laguerre, M.** Incidente of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 1998.

**Fundacion Runa.** [En línea] [citado 15-8-2011] disponible en internet: <http://www.runa.org/home.aspx>

**Galvez, Lena, Kwon Young-IN, Emmanovil Apostolidis Y Kalidos Shetty.** Phenolic compounds antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresource Technology, 2010.

**García Barriga, H.** Flora Medicinal de Colombia. Editores Tercer Mundo. Bogotá, Colombia. 2ª ed, Tomo 2: 1-537, 1992.

**García, Javier.** "Antioxidant activity in decaffeinated beverages: instant coffee and black tea" Universidad de Burgos, España, 2011.

**Gary, D Christian.** Extracción con solventes para química analítica 2ª edición, universidad de Washington editorial Alimusa, México, 1988

**Góngora, José L –Alfaro.,** La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Unidad Biomédica, Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Itzaes No. 490 x calle 59, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México. 2005

**Gracia, Manuel Alejandro.** Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales, 2007.

**Guil, L.** Gas chromatography butter wort, Londres; heiderlberg,1958 p.330.

**Gutiérrez, Bello, José.** Calidad de vida, alimentos y salud humana: fundamentos científicos. Madrid, Editorial Díaz de Santos, los Países del Convenio Andrés Bello, Tomo I "A". Ministerio de Educación y Ciencia de España, Junta del Acuerdo de Cartagena (JUNAC) y Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB). 1ª Edición, Editora Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia, 2005.

**Innerhofer, Susanne.** Karl-Georg Bernhardt. Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian.2011

**Jørgensen, P.M. Y S. León-Yáñez.** Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden 75: 1-1181, 1999.

**Keeneth.R;** Análisis instrumental España Person Educación.2001, p.240.

**Keulemans.A.** Gas chromatography.reinholdpubl.corp. Nueva York ,1957.p. 25

**Kuskoski, Marta.** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.Ciênc.Tecnol.Aliment., Campinas, 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.

**Lampe,** Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. Am J ClinNutr. 70:475S 490S, 1999.

**Legarda, Lucio.** Diseño de experimentos agropecuarios, San Juan de pasto, unigraf, 2001 pág. 38-39.

**Martinez, Gonzalez.** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición hospitalaria. Nutr. Hosp.XVII,271-278,2002.

**Maughan RJ, J Griffin ,** Caffeine ingestion and fluid balance: a review. Journal of Human Nutrition and Dietetics 16, 1-10, 2003.

**Mazuchowski, J Z; Rucker, N G.** Diagnóstico y alternativas para yerba mate (*Ilex paraguariensis*).Curitiba, 1993.

**Mesa, ana., Gaviria, Carlos., Cardona, Felipe.,** actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del genero *Calophyllum*, Universidad de Antioquia(Colombia),Rev Cubana PlantMed v.15 n.2. Habana,abril-jun.,2010.

**Melgarejo, Martha.** El verdadero poder de las bebidas energéticas", Artículo gentileza de la Revista Énfasis Alimentación N° 6 Diciembre 2004

**Montoya, Luciano; Musalem, Miguel; Serrano, Enrique; Velázquez, Alejandro.** Rotación óptima de cultivos y de uso de recursos en el sistema agroforestal de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), Brasil, 2001.

**Naveda, Gabriela,** Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (ruta graveolens), con alto contenido de polifenoles. Escuela Politécnica Nacional Quito (Ecuador),2010.

**Oszmianski, J.; Romeyer, F.; SAPIS, J.; J. Macheix.** Grape seed fenolics: extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 37, N°1, 7-12. 1986.

**Paladino Silvia Cristina,**. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisviniferal*.) Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Sede Mendoza: Facultad de Ciencias Agrarias – UNCuyo

**Palomino, O.** Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). 2001.

**Pardo, Ricardo; Alvarez Yolanda; Barr, Diego.,** Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso unidad de Farmacología. IMIM-Hospital del Mar, Barcelona y Universidad Autónoma de Barcelona 2007

**Pasto, Daniel,** Johnson. Determinación de estructuras orgánicas. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1ª Edición, 1981.

**Pokomy, J; Yanishlieva, N.** Antioxidants in food: practical applications. CRC Press, Wood head Publishing limited. Cambridge,2001.

**Primo Yúfera Eduardo,** Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona, Editorial Reverté, S.A., 1991.

**Proestos, C. Chorionopoulos; G. J. E. Nychas and M. Komaitis.**RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity.J. Agric. FoodChem. Vol. 2005.

**Quimica Tecnica LTDA,** Hoja de datos de seguridad cloruro de metilo,2006.

**Radice, Mateo.; Vidari, Giovanni.** Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial, Università degli Studi di Pavia (Italia). 2008.

**Reginatto, M.L. Athayde, G. Gosmann, and E.P. Schenkel**, Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other *Ilex* Species, *Universida de Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil*, 1999.

**Renase**, Remedios Naturales Selváticos, certificado de análisis de guayusa [en línea] [citado 20- 8 -2011] disponible en internet:[http://es.scribd.com/doc/61478231/Componentes-Quimicos-Guayusa-19 Oct 09](http://es.scribd.com/doc/61478231/Componentes-Quimicos-Guayusa-19-Oct-09)

**Ribas, Ibarz Alberto**. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Madrid, Editorial Mundi-Prensa Libros, 2005.

**Robbins, R**. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887, 2003.

**Rojas Barquera, Narváez. C, Restrepo. P**. Evaluación del contenido de vitamina c, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*psidium guajaval.*) de las variedades pera, regional roja y regional blanca Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria. Bogotá. D. C., Colombia. 2008

**Samman, S., Sandstro" M, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S. S**. Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001.

**Sanz Berzosa Isidora**. Prácticas de química orgánica Experimentación y desarrollo: experimentación y desarrollo. Valencia, Ediatorial Politècnica de València, 1ª edición, 2002.

**Shimoi, Kayoco; Masuda Schuichi**. Radio protective effects of antioxidative plant flavonoids in mice, fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, 1996.

**Siddhuraju, P.; K. Becker**. Antioxidant properties of various solvent ex-tracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringaoleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2003.

**Sies**, Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (2): 291 5,(1997).

**Simic, MG**. Free radical mechanism of autoxidation process, *J chem. Educ*, 1981.

**Slinkard, K. Singleton,V**. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Vticulture*, 28, 49-55, 1977.

**Vasallo. A**, De Stefani, E., Cendan, M., Zavala, D., Chen, V., Carzoglio, J. and Deneo-Pellegrini, H. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. J. Natl. Cancer Inst, 1985.

**Wiles JD, SR Bird, J HopkinsK;M Riley Me.** Effect of caffeinated coffee on running speed, respiratory factors, blood lactate and perceived exertion during 1500-m treadmill running.Br J SportsMed 26, 116-120, 1992.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

Absorbancia para fenoles totales

TRATAMIENTOS	ABS 765nm			Promedio	Desviación	C.v (%)
	ABS 1	ABS 2	ABS 3			
Cocción 100°C	0,205	0,210	0,207	0,207	0,003	1,214
Infusión 80°C	0,159	0,157	0,162	0,159	0,002	1,441
Infusión 60°C	0,112	0,114	0,116	0,114	0,002	1,754
Cocción 100°C	0,203	0,209	0,205	0,206	0,003	1,485
Infusión 80°C	0,155	0,157	0,159	0,157	0,002	1,274
Infusión 60°C	0,114	0,112	0,113	0,113	0,001	0,885
Cocción 100°C	0,208	0,209	0,207	0,208	0,001	0,481
Infusión 80°C	0,160	0,158	0,157	0,158	0,002	0,965
Infusión 60°C	0,111	0,112	0,113	0,112	0,001	0,893

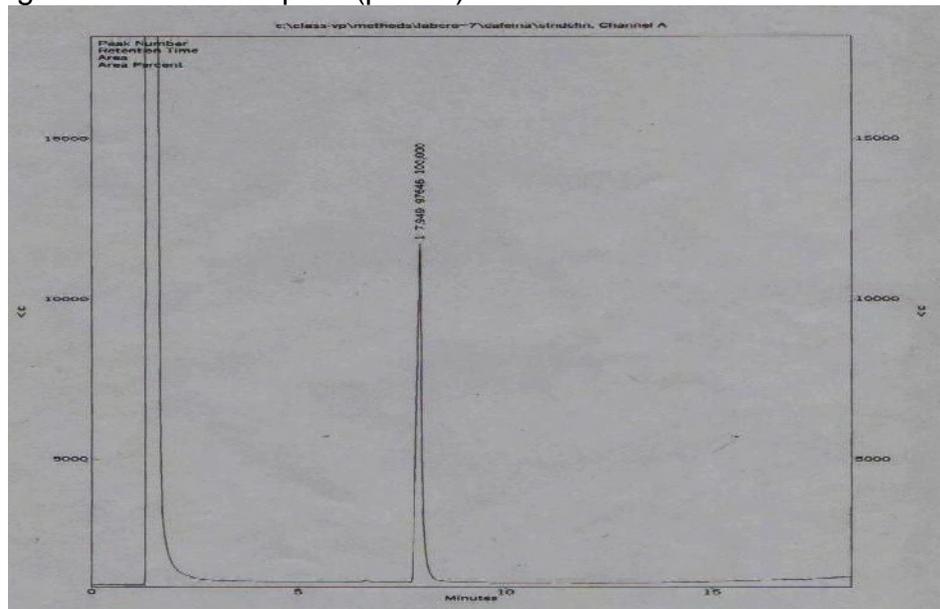
## ANEXO B

Absorbancias para actividad antioxidante

TRATAMIENTO	ABS 517nm			promedio	desviación	C.V(%)
	ABS 1	ABS 2	ABS 3			
Cocción 92°C	0,067	0,068	0,065	0,067	0,002	2,291
Infusión 80°C	0,107	0,108	0,108	0,108	0,001	0,536
Infusión 60°C	0,148	0,148	0,152	0,149	0,002	1,546
Cocción 92°C	0,069	0,066	0,068	0,068	0,002	2,257
Infusión 80°C	0,110	0,108	0,108	0,109	0,001	1,063
Infusión 60°C	0,148	0,149	0,152	0,150	0,002	1,391
Cocción 92°C	0,066	0,068	0,065	0,066	0,002	2,303
Infusión 80°C	0,106	0,105	0,107	0,106	0,001	0,943
Infusión 60°C	0,143	0,145	0,142	0,143	0,002	1,066

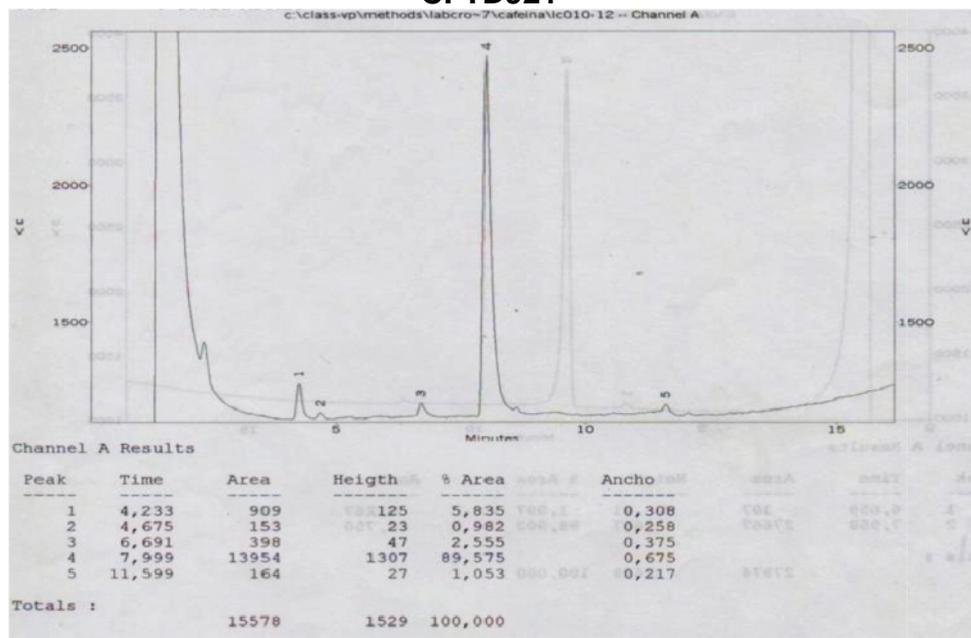
## ANEXO C

Cromatograma de cafeína pura (patrón)



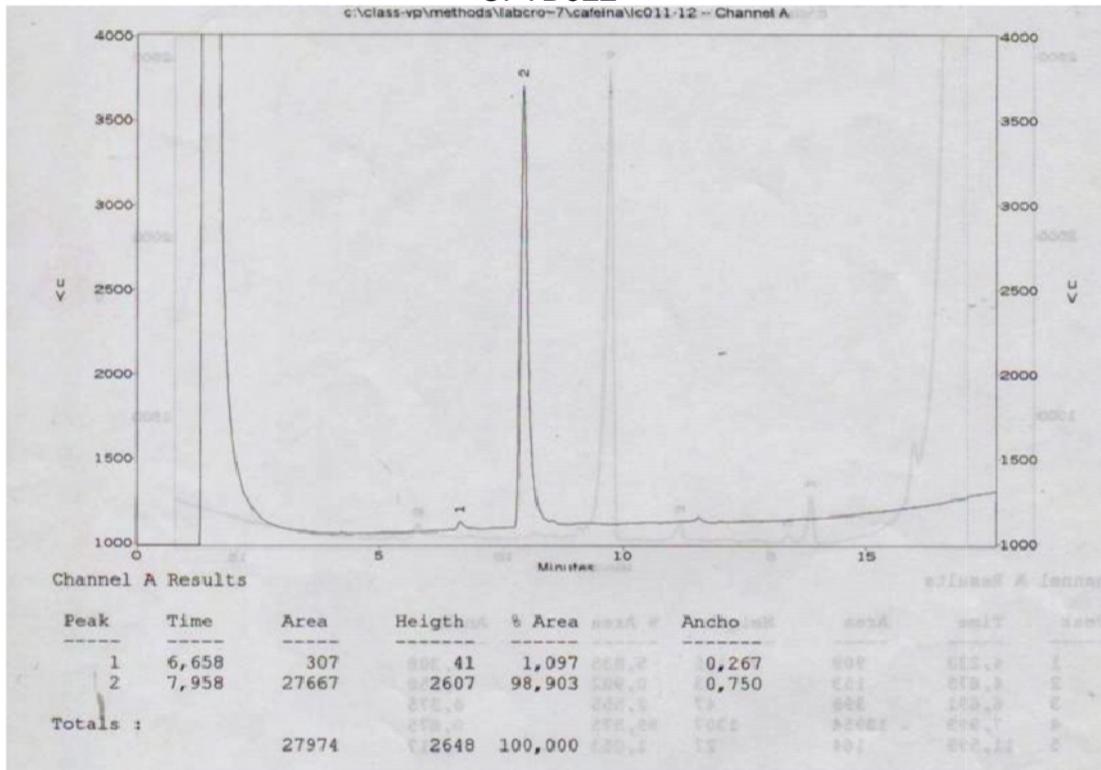
Cromatogramas de cafeína

### CFTD921<sup>a</sup>

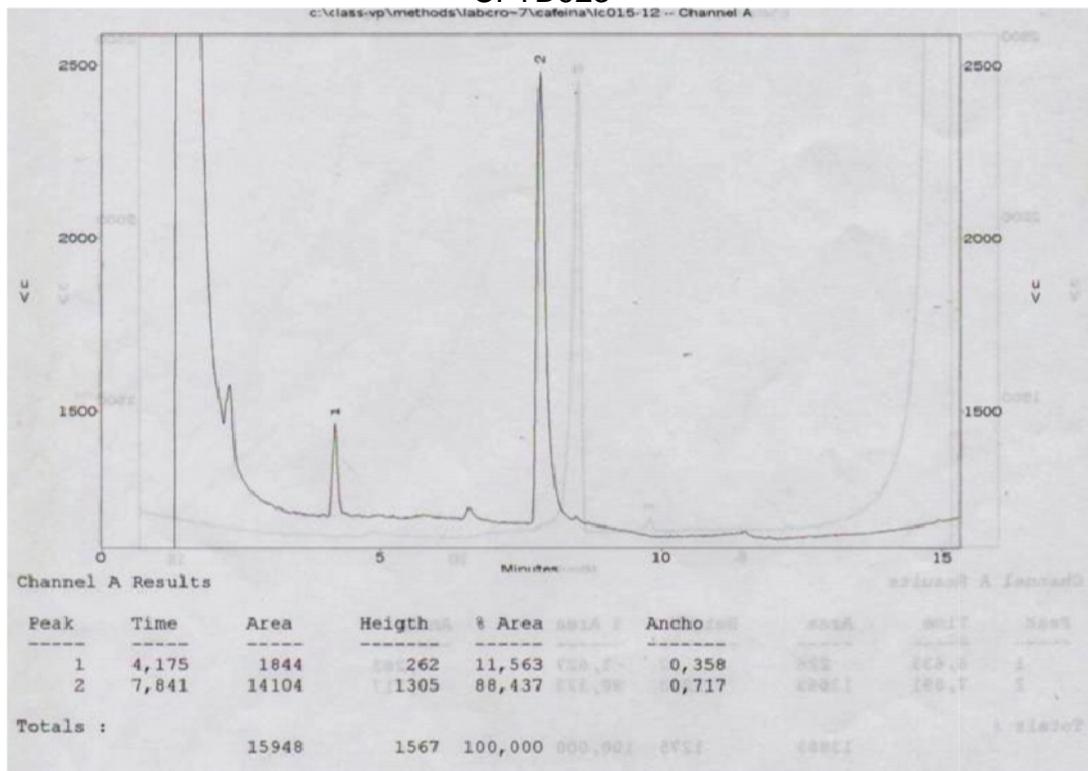


CFTD92: Cafeína Total Decocción a 92°C, <sup>a</sup>= replicas

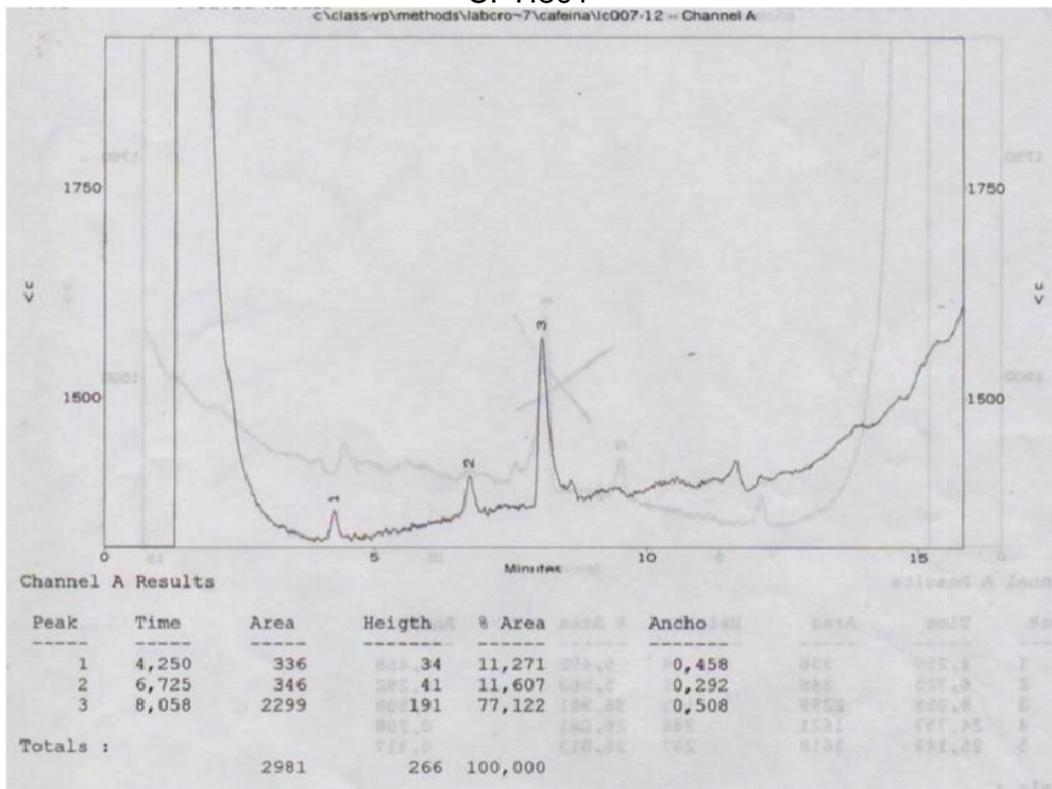
CFTD922<sup>a</sup>



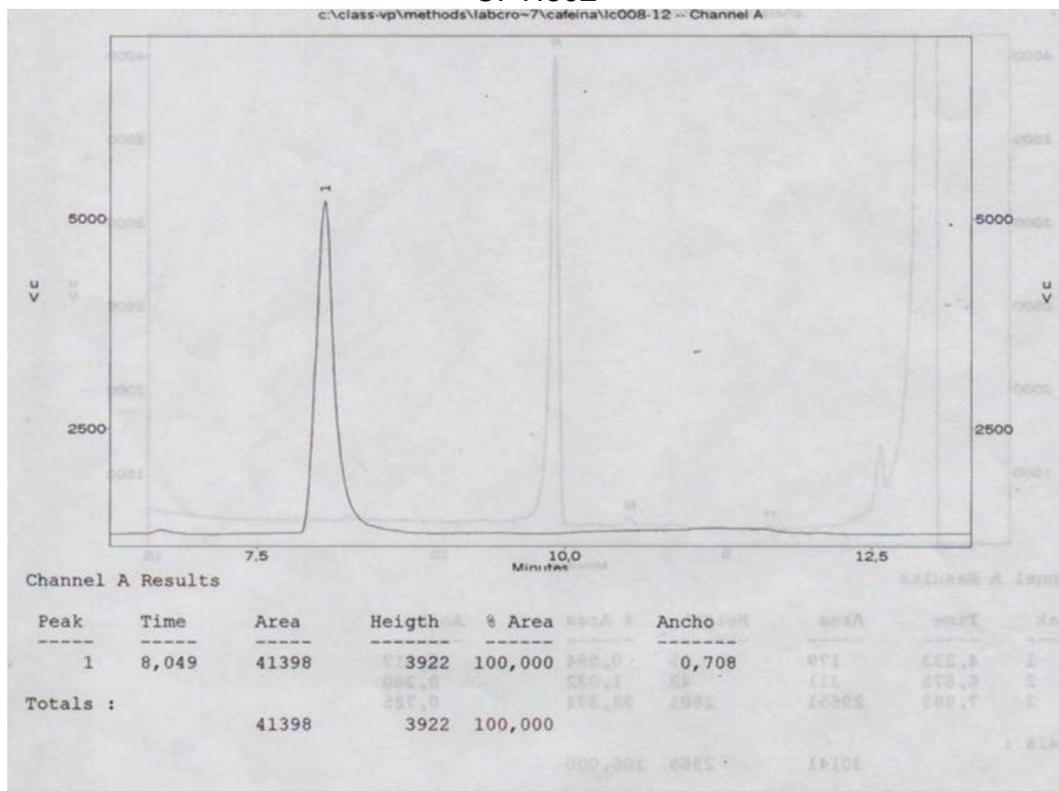
CFTD923<sup>a</sup>



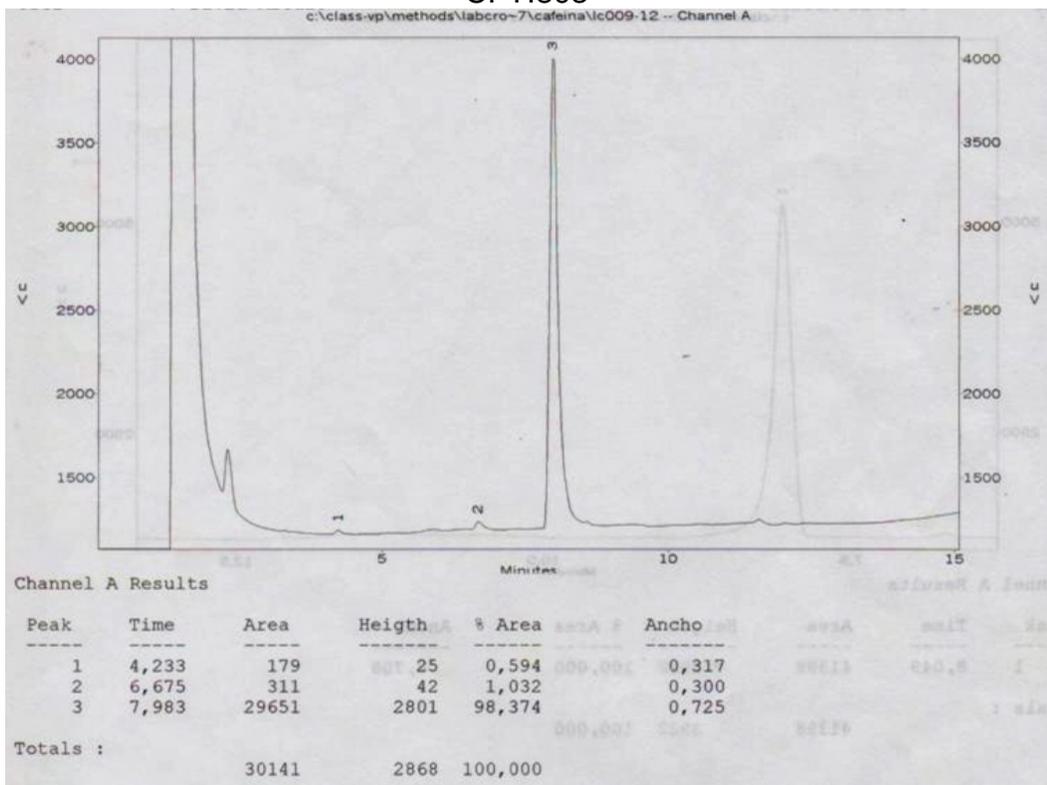
CFTI801<sup>a</sup>



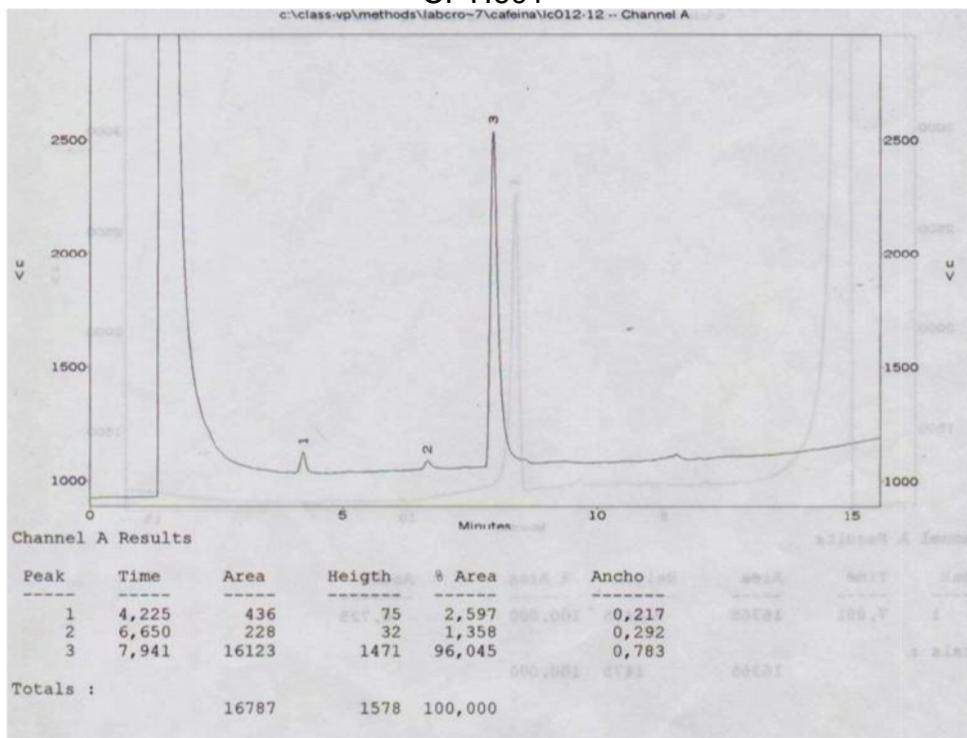
CFTI802<sup>a</sup>



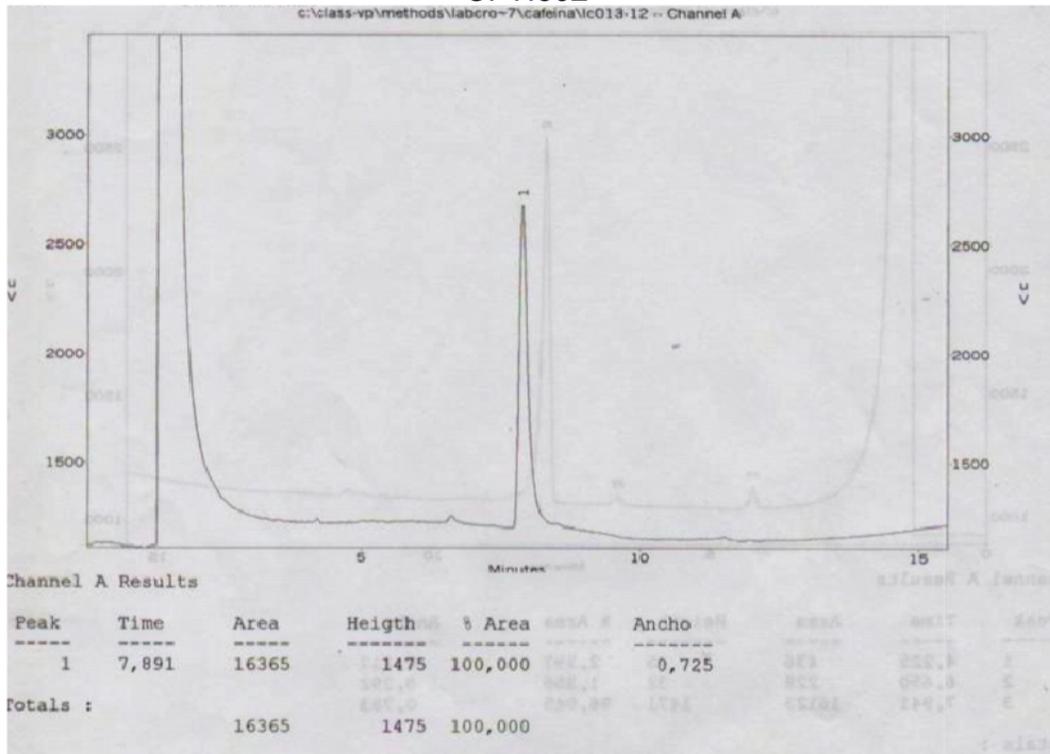
CFTI803<sup>a</sup>



CFTI601<sup>a</sup>



CFTI602<sup>a</sup>



CFTI603<sup>a</sup>

