



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Optimización de la extracción de antioxidantes
contenidos en hojas de guayusa**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

INGENIERO QUÍMICO

Autor: Pacheco Castillo, Germán Oswaldo

Director: Meneses Chamba, Miguel Ángel

LOJA

2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de integración curricular

Loja, 12 de enero de 2023

Máster en Ciencias y Tecnologías Químicas

Natali Elizabeth Solano Cueva

Director de la carrera de Ingeniería Química

Ciudad. –

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Optimización de la extracción de antioxidantes contenidos en hojas de guayusa, realizado por Germán Oswaldo Pacheco Castillo ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: PhD. Meneses Chamba, Miguel Ángel.

C.I.: 1103885636

Correo electrónico: mameneses@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Germán Oswaldo Pacheco Castillo, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente: Ser autor del Trabajo de Integración Curricular denominado: Optimización de la extracción de antioxidantes contenidos en hojas de guayusa, de la carrera de Ingeniería Química, específicamente de los contenidos comprendidos en: Guayusa: generalidades, usos y composición química, métodos de extracción, secado de extractos y análisis químicos, siendo Ph.D Miguel Ángel Meneses Chamba, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para

su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Germán Oswaldo Pacheco Castillo

C.I.: 1103938211

Correo electrónico: gopacheco1@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Quiero dedicar el presente trabajo a mi familia, padres y hermanos por brindarme el respaldo, amor incondicional y la oportunidad de poder desarrollarme en mi proceso de formación profesional, les doy las gracias por nunca dejarme solo y confiar en mí durante todo el proceso.

Agradecimiento

Quiero agradecer primeramente a Dios por haberme dado la sabiduría, constancia y resiliencia para poder culminar mis estudios universitarios.

A mi familia, padres, hermanos y hermanas por estar a mi lado en cada momento de mi vida y nunca dejar de confiar en mí en los buenos y malos momentos. A la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus docentes por la formación dada en cada momento de mi etapa preprofesional, a mi director de tesis PhD Miguel Ángel Meneses por brindarme sus conocimientos y enseñanzas a lo largo de mis años de estudio en la carrera universitaria, y en especial en el presente trabajo de fin de titulación.

Por último, a mis compañeros que me brindaron su apoyo con sus conocimientos y amistad durante esta etapa de mi vida.

Índice de contenido

Aprobación del director del trabajo de integración curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenido.....	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
Guayusa: generalidades, usos y composición química.....	5
1.1. Generalidades.....	5
1.2. Usos históricos de la guayusa	6
1.3. Composición química	7
1.4. Métodos de extracción	8
1.4.1. <i>Obtención de extractos</i>	8
1.4.2. <i>Extracción sólido-líquido</i>	9
1.4.3. <i>Extracción de antioxidantes por maceración dinámica</i>	10
1.4.4. <i>Extracción de antioxidantes por ultrasonido</i>	10
1.4.5. <i>Extracción de antioxidantes por líquido presurizado (PLE)</i>	11
1.5. Características principales de cada método de extracción.....	12
1.6. Análisis químico de los extractos	13
1.6.1. <i>Antioxidantes</i>	13
1.6.2. <i>Determinación de fenoles totales</i>	14
1.6.3. <i>Método DPPH</i>	15
Capítulo dos	16
Materiales y métodos	16
2.1. Origen y tratamiento del material vegetal	16
2.2. Maceración dinámica	16
2.3. Maceración asistida por ultrasonido	18

2.4. Extracción por líquido presurizado.....	19
2.5. Análisis químicos a los extractos	20
2.5.1. <i>Cálculo del rendimiento</i>	20
2.5.2. <i>Determinación de fenoles totales</i>	20
2.5.2.1. Desarrollo de la curva de calibración.....	20
2.5.2.2. Preparación de reactivos	21
2.5.2.3. Lectura de muestras	21
2.5.3. <i>Determinación de la actividad antioxidante</i>	22
2.5.3.1. Preparación de estándares	22
2.5.3.2. Método DPPH	22
2.5.3.3. Lectura de muestras de DPPH	23
2.6. Análisis estadístico	23
Capítulo tres.....	24
Análisis y Discusión de Resultados	24
3.1. Rendimiento de la extracción	24
3.2. Determinación de cantidad de la actividad antioxidante	26
3.3. Determinación de cantidad de fenoles totales	28
Conclusiones	30
Recomendaciones.....	31
Referencias	32
Apéndice.....	37
Apéndice A. Rendimiento porcentaje peso-peso para cada método y solvente empleado	37
Apéndice B. Diagrama para la elaboración de la curva de calibración y lectura de muestras para Fenoles totales	38
Apéndice C. Diagrama para la elaboración de la curva de calibración y lectura de muestras para DPPH.....	42
Apéndice D. ANOVA factorial multinivel para fenoles totales: método de extracción (MExtr) vs solvente (Solv) empleado.....	47
Apéndice E. Tablas resumen de la absorbancia medida en cada método empleado para fenoles totales y DPPH	52
Apéndice F. ANOVA Simple para el rendimiento de la extracción, fenoles totales y actividad antioxidante.....	54

Índice de tablas

Tabla 1 Composición química de la Guayusa.....	7
Tabla 2 Métodos de extracción (sólido-líquido) y (líquido-líquido).....	9
Tabla 3 Propiedades, características, ventajas y desventajas de los métodos de extracción aplicados.....	12
Tabla 4 Rendimiento de extracción según el solvente y método empleado.....	24
Tabla 5 Concentración calculada para la actividad antioxidante en cada método empleado.....	26
Tabla 6 Concentración de fenoles totales calculada para cada método empleado	28
Tabla A1 Cuadro resumen de los resultados obtenidos para el porcentaje de rendimiento para cada método de extracción	37
Tabla E1 Absorbancia medida para antioxidantes en cada método empleado (parte 1)	52
Tabla E2 Absorbancia medida para antioxidantes en cada método empleado (parte 2)	52
Tabla E3 Absorbancia medida para fenoles en cada método empleado	53

Índice de figuras

Figura 1 Árbol de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes).....	6
Figura 2 Pasos para una maceración dinámica	10
Figura 3 Pasos para una extracción asistida por ultrasonido.....	11
Figura 4 Pasos para una extracción por líquido presurizado.....	12
Figura 5 Proceso de formación de un complejo.....	14
Figura 6 Muestra de guayusa triturada.....	16
Figura 7 Equipo de baño maría (maceración dinámica).....	17
Figura 8 Equipo de baño maría asistido por ultrasonido.....	18
Figura 9 Planta de extracción supercrítica	19

Figura B1 Curva de calibración para fenoles totales.....	40
Figura C1 Curva de calibración para antioxidantes.....	44

Resumen

La determinación de la actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales de las hojas de guayusa fue realizada mediante extracción por medio de maceración dinámica, maceración asistida por ultrasonido y líquido presurizado. A los extractos se le midió su actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH y el contenido de fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se evaluaron dos tipos de solventes: etanol absoluto (99%) y etanol-agua (50% v/v). Los mejores resultados se obtuvieron con etanol-agua 50 % v/v como solvente en los métodos de maceración dinámica y asistida por ultrasonido, a un tiempo de tres y una hora respectivamente, a una temperatura de 45°C. Se obtuvo por lo tanto como resultado un porcentaje de rendimiento de la extracción de 26,73% p/p, un contenido de fenoles totales de 303,014 mg AG/g ext y una actividad antioxidante de 3983,733 μ M Eq Trolox/g ext. En conclusión, las condiciones utilizadas en este método en concreto favorecen a la extracción debido a la facilidad de transferencia de masa producida por la fragmentación del material vegetal generada en el método.

Palabras claves: Ilex guayusa Loes, fenoles totales, actividad antioxidante, ultrasonido.

Abstract

The determination of the antioxidant activity and the amount of total phenols of the guayusa leaves were carried out by dynamic maceration, ultrasound-assisted maceration, and pressurized liquid method. The antioxidant activity of these extracts was measured by the DPPH assay while the total phenol content was measured by the Folin-Ciocalteu assay. Two types of solvents were evaluated: absolute ethanol (99%) and ethanol-water (50% v/v). The best results were obtained with 50% v/v ethanol-water as solvent with a dynamic and an ultrasound-assisted maceration method, at a time of three and one hour respectively, at a temperature of 45°C. Therefore, an extraction yield percentage of 26.73 % w/w was obtained, a total phenol content of 303.014 mg AG/g ext and an antioxidant activity of 3983.733 μM Eq Trolox/g ext were measured. In conclusion, the conditions used in this particular method favor the extraction process due to the ease of mass transfer produced by the fragmentation of plant material generated in the method.

Keywords: Ilex guayusa Loes, total phenols, antioxidant activity, ultrasound.

Introducción

El presente estudio consiste en la optimización de la extracción de antioxidantes a partir de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). Se desarrolla en tres capítulos, el primero consiste en una revisión bibliográfica sobre las generalidades, usos y composición química de la misma, además de la descripción de cada método de extracción y del análisis empelado, en el segundo capítulo se desarrolla la metodología y procedimiento desarrollado en cada método de extracción aplicado en la investigación, además de la metodología utilizada para la preparación y lectura de las muestras, y por último, el análisis y discusión de los resultados. Se exponen finalmente las conclusiones y recomendaciones.

Enfocándonos en el material vegetal a estudiar se tiene que la guayusa como tal, además del interés científico que genera, representa una de las plantas más utilizadas por distintas nacionalidades Amazónicas (Ecuador) como bebidas en forma de infusión. Pese a la importancia de esta a lo largo de los años existen muy pocas fuentes de estudios fitoquímicos de la misma, y la literatura por lo tanto es escasa, por lo cual es necesario una investigación que evalúe su actividad biológica (antioxidante).

Actualmente, los datos que se pueden recopilar bibliográficamente corresponden a el contenido de cafeína, presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos en la misma. Por lo tanto, no se puede explicar claramente todas las propiedades infundidas por tradición popular.

En la actualidad el estudio de antioxidantes ha incrementado especialmente en su interés e importancia, la existencia de distintas publicaciones lo demuestran. Se enfocan principalmente en el consumo frecuente de estos, en especial de los considerados flavonoides, importantes por su capacidad de captar radicales libres los cuales son precursores del estrés oxidativo. La determinación de esta capacidad

antioxidante se la puede realizar mediante distintos métodos espectrofotométricos que comprenden: la capacidad de atrapamiento del catión-radial (ABTS), o del radical DPPH.

Por otro lado, un estudio adicional de cuantificación de fenoles totales contribuye a calcular la capacidad antioxidante de la misma. Los alimentos con esta capacidad poseen además de su acción fisiológica, componentes nutritivos beneficiosos para la salud humana.

La obtención primeramente de los extractos se la realizó por tres métodos, se inició con una maceración dinámica, seguido de una maceración asistida con ultrasonido, y finalizando con una extracción por líquido presurizado, utilizando como solvente etanol, y una mezcla etanol-agua al 50 % v/v. A los extractos obtenidos se le determinó la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales para cumplir con los objetivos trazados en el estudio, como lo es el obtener los distintos extractos, en distintas condiciones de extracción de antioxidantes contenidos en la hoja de guayusa. Los resultados obtenidos muestran como varían el contenido de fenoles totales y su actividad antioxidante para los extractos obtenidos para cada solvente y método empleado, y la eficiencia de cada uno respecto al otro.

Capítulo uno

Guayusa: generalidades, usos y composición química.

1.1. Generalidades

La planta del género *Ilex guayusa* está presente en regiones tropicales y subtropicales en el continente americano, pertenece a la familia de las Aquifoliaceae la cual contiene alrededor de 600 especies. Su estructura es la de un árbol perenne nativo en las zonas amazónica con ramas extendidas y flexibles, con una flor de color blanco verdoso y pétalos obtusos y, cuyo fruto es una baya de casi 1 centímetro de ancho, de coloración verde (Jorgensen, León-Yáñez, & Garden, 1999).

Gracias a la existencia de estudio relacionados a este tema varios documentos han registrado la presencia de guayusa en altitudes que van desde los 200 hasta 2600 metros (Loizeau and Barrera 1999), bajo condiciones climáticas tropicales o subtropicales, a una temperatura entre 18 – 26 °C, siendo su temperatura óptima 20°C, en suelos arenoso-arcilloso con un pH ácido entre 4,34 y 5,0 (Rocha, 2018).

Aunque existe la idea de que esta es una planta silvestre, con los estudios recientes nos lleva a afirmar que en la actualidad la mayoría de presencia de esta especie está asociada a zonas de cultivo (plantaciones) o lugares abandonados ya que a pesar de que la especie presente semillas su reproducción es de carácter asexual, es decir mediante la plantación de un tallo de la planta “madre” (Crespo, 2013). En estado domesticado (cultivo), esta alcanza alturas en promedio de 10 metros con una multitud de tallos que miden entre 2 a 15 cm a la altura del pecho, a diferencia de las silvestres que alcanzan los 25 metros de altura como se puede observar en la *Figura 1*.

Figura 1

Árbol de guayusa (Ilex guayusa Loes)



Nota. Tomado de *Ilex guayusa* Loes [Fotografía], por: <https://hablemosdeflores.com/guayusa/>. (CC-0)

1.2. Usos históricos de la guayusa

De los cuatro géneros existentes de la familia *Aquifoliaceae*, del género en particular (*Ilex*) es el que presenta una mayor importancia en este estudio, distintas especies de esta familia son utilizadas en aplicaciones médicas, ornamentales, bebidas energéticas, entre otros (Radice & Vidari, 2010).

Por lo que, según Wassén (1972) históricamente los datos que se han recolectados sugieren que la guayusa se ha utilizado y comercializado como planta medicinal en la región comprendida entre los Andes-Amazonas. La guayusa ha sido usada tradicionalmente en las poblaciones amazónicas como bebida para tener energía y estar alegre durante todo el día (Crespo, 2013). Mientras que su aporte medicinal

consiste en la utilización del mismo para tratar enfermedades como la diarrea, gastritis, y, además, ser purgante para el sistema digestivo, remedio contra la infertilidad, relajante y curación de heridas. A parte del valor medicinal mencionado, esta es utilizada como un tónico estomacal, diurético, y ocasionalmente como licor al ser mezclado con otros elementos (Shaman Amazónico, 2016).

1.3. Composición química

La composición química de las hojas de la planta revela que estas poseen principalmente alcaloides en los que se destaca la teobromina y la cafeína. Además de esteroides, terpenos, fenoles, azúcares reductores, siendo el contenido de antioxidantes y cafeína, similar al encontrado en el té verde (Rocha, 2018).

Según Wise & Negrin, 2019, la composición química del vegetal presenta importantes metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y metilxantinas. Mientras que adicional esto se han detectado terpenoides, aminoácidos y carbohidratos que conforman el total de compuestos bioactivos (Radice et al, 2016).

Tabla 1

Composición química de la Guayusa

Compuestos fenólicos	
Contenido de fenoles totales	106,62 ± 4,41 mg/g; 33,44 ± 0,48 mg/g 54,0 ± 3,8 mg/g; Determinado en extracto ^a
Derivados del Cafeoil	Detectado ^a
Caffeic acid glucoside	Detectado ^a
Ácido Coumaroylquinic	Detectado ^a
Flavonoides	
Quercetina rutinósido	Detectado ^a
Carotenoides	
Carotenoides totales	468,71 ± 110,49 µg/g. 44,00 ± 8,88 µg/g

Carotenos	
α -Caroteno	62,52 \pm 15,59 μ g/g; 7,76 \pm 1,34 μ g/g
β -Caroteno	115,59 \pm 27,46 μ g/g; 4,06 \pm 1,06 μ g/g b
Metilxantinas	
Cafeína	19,08 \pm 0,31 mg/g. 2,9 -3,2%; 1,73% \pm 0,04 b
Carbohidratos	
Fructosa	14033,8 μ g/g ^c
Glucosa	13206,6 μ g/g ^c
Sacarosa	0,6 μ g/g ^c
Maltosa	39,3 μ g/g ^c
Xilosa	0,0 μ g/g ^c

Nota. ^a Wise (2018). ^b García-Ruiz et al. (2017). ^c Villacís-Chiriboga et al., 2018.

1.4. Métodos de extracción

1.4.1. Obtención de extractos

La extracción se define como la separación de los principios activos de un tejido animal o vegetal de sus componentes inactivos utilizando solventes adecuados para el proceso.

Para elegir el método adecuado la separación de compuestos de una mezcla, se debe tomar en cuenta el estado de los componentes de la misma (sólido o líquido), y la solubilidad de los componentes (Conde, 2012).

Tabla 2*Métodos de extracción sólido-líquido y líquido-líquido*

Método de extracción	Sólido-líquido	Líquido-líquido
Clásica	Maceración	Extracción centrífuga directa
	Soxhlet	Decantación (gravedad)
	Twisselmann	Columna (agitadores, vibradores)
Actual	Fluidos supercríticos (planta de fluidos supercríticos)	Destilación molecular
	Maceración asistida por ultrasonido	
	Maceración asistida por microondas	

1.4.2. Extracción sólido-líquido

El método consiste en que al poner en contacto un material sólido con un solvente líquido, los componentes solubles en el sólido serán transferidos al solvente, en este momento se da la transferencia de masa entre los compuestos bioactivos solubles en el solvente empleado. La proporción en la cual esta transferencia depende de la cantidad de concentración de estos compuestos en el solvente hasta alcanzar un punto de equilibrio, es decir la concentración de compuestos bioactivos entre el sólido y el solvente serán los mismo (Cussler, 2009).

Dado que la transferencia de masa de los compuestos solubles depende además de la solubilidad del solvente utilizado, se debe proporcionar una fuente de calor con el fin de mejorar el proceso, mientras que si este está en equilibrio con el material vegetal debe ser sustituido por uno fresco que cambie la gradiente de concentración.

El procedimiento de extracción utilizado corresponde a un proceso de maceración en el cual el material vegetal (troceado o en polvo) entra en contacto con el

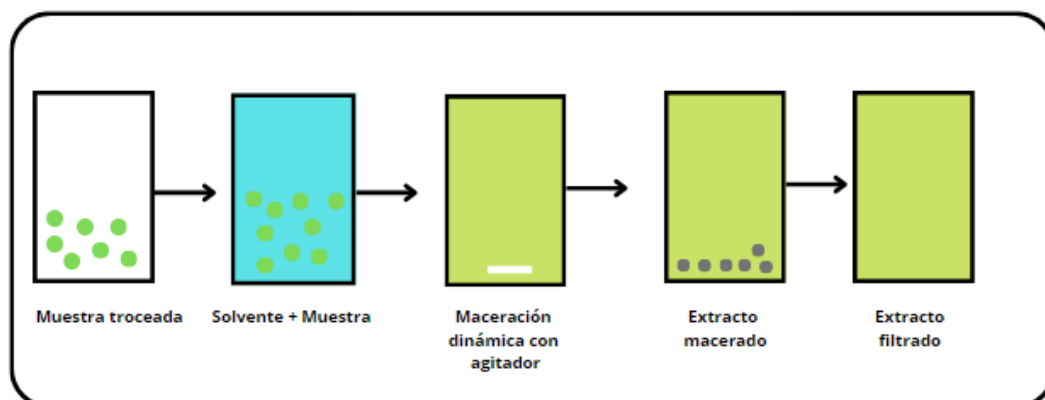
solvente a una temperatura determinada pudiendo ser esta la ambiental o superior durante un tiempo estimado con la ayuda de agitación, hasta que el vegetal haya sido disuelto completamente. El resultado obtenido se filtra al vacío y los líquidos combinados se clarifican para luego dejarlos reposar.

1.4.3. Extracción de antioxidantes por maceración dinámica

El método consiste en realizar una molienda del material vegetal a tratar, logrando partículas pequeñas aumentando así el área de superficie. Se coloca en un recipiente con tapa y se agrega un solvente, el líquido se filtra, y el residuo se presiona para recuperar la mayor cantidad de extracto, estos movimientos facilitan la extracción porque aumenta la difusión para lograr el mayor rendimiento (Azmir, et. Al, 2013).

Figura 2

Pasos para una maceración dinámica



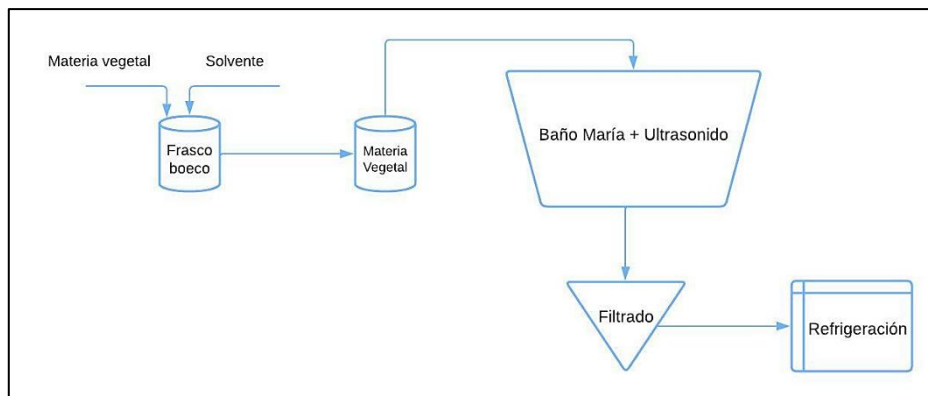
1.4.4. Extracción de antioxidantes por ultrasonido

Se basa en la partición del analito entre la matriz sólida y el disolvente de extracción con la ayuda de ultrasonidos de alta frecuencia en un baño ultrasónico. El primer fenómeno mencionado es la fragmentación, caracterizada por la reducción del tamaño de las partículas, lo que facilita la transferencia de masa provocada por colisiones (Wong-Paz, et. al, 2017). En este procedimiento las ondas sonoras con una frecuencia superior a (>20 kHz) las cuales son superiores al rango de frecuencia audible del ser

humano, estas se propagan a través del medio líquido (solvente) causando ciclos de expansión y compresión (Freitas de Oliveira, et. al, 2016). La eficiencia de este proceso según Tomaz, et. al, (2019) está dada por varios factores como la relación muestra – solvente, tamaño de partícula, composición del solvente, tiempo y temperatura.

Figura 3

Pasos para una extracción asistida por ultrasonido



1.4.5. Extracción de antioxidantes por líquido presurizado (PLE)

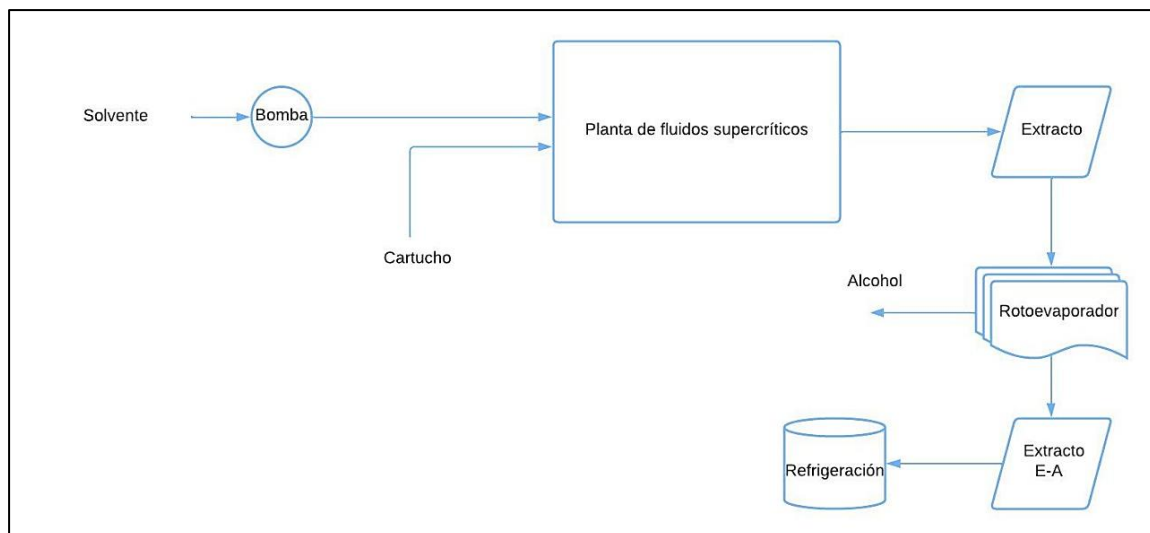
La extracción de líquido presurizado (PLE) es una técnica que utiliza temperatura y presión elevadas asegurándose de lograr una extracción exhaustiva de matrices sólidas, lo que reduce el consumo de solventes y mejora rendimiento de la muestra en comparación con los procedimientos tradicionales.

La técnica consiste en realizar el transporte de analitos desde la matriz fuertemente influenciado por la polaridad del solvente y sus propiedades físicas, que se correlacionan a los distintos parámetros utilizados en el proceso de extracción como la desorción, difusión, solvatación y otros mecanismos de transporte son controlados por temperatura y presión (Ehlers, 2006), se combina temperaturas elevadas (100 °C a 200 °C) y altas presiones (100 a 140 bar) para lograr una extracción rápida y eficiente de los analitos de las muestras sólidas. Los cambios de temperatura, como por ejemplo su aumento ayuda a incrementar la energía cinética, logrando interrumpir las interacciones

entre el soluto y la matriz que son causadas por las fuerzas de van der Waals, disminuyendo así la viscosidad de los solventes en la fase líquida permitiendo una mejor interacción entre la matriz y el solvente. Por último, los cambios de presión aceleran la extracción, y la presión alta facilita la extracción de los compuestos contenidos en los poros de la matriz (Tomaz, et. al, 2019).

Figura 4

Pasos para una extracción por líquido presurizado



1.5. Características principales de cada método de extracción

Tabla 3

Propiedades, características, ventajas y desventajas de los métodos de extracción aplicados

Propiedad	Tecnología de Extracción		Método convencional
	Por líquido presurizado	Asistida por ultrasonido	Agitación magnética
Fuerza impulsadora	Presión en conjunto con el fluido supercrítico	Cavitación acústica	Contacto con el solvente
Tiempo de extracción	10-60 minutos	10-60 minutos	1-4 horas

Ventajas	Rápido, seguro, alta selectividad y tamaño de extracto reducido, no necesita una filtración posterior.	Fácil manejo, seguro y uso medio de cantidad de solvente	Fácil de utilizar, barato, uso convencional.
Desventajas	Requiere la optimización y control de muchos parámetros para un resultado satisfactorio	Los analitos pueden ser degradados debido a las altas frecuencias, requiere filtración	Degradación de analitos termolábiles y expulsión de vapores.

1.6. Análisis químico de los extractos

1.6.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos presentes en una variedad de alimentos en especial vegetales y frutos, estos conforman su estructura, y les provee beneficios, su función radica en procesos de óxido-reducción, estos producen una reducción de la velocidad de oxidación y la previenen a través de la eliminación de radicales libres, empleándose como aceptores de los mismos o donadores de hidrógenos, logrando inhibir así la degradación (Valko, et al, 2007).

Se ha propuesto por lo tanto dos mecanismos de acción para los antioxidantes, el primero es un mecanismo en cadena en el cual este dona un electrón al radical libre en un sistema de autodefensa, mientras que el segundo involucra la eliminación de los iniciadores de las especies reactivas del oxígeno (ROS) provenientes de los radicales libres del oxígeno molecular mediante la neutralización rápida del catalizador de la reacción en cadena (Lobo et al., 2010).

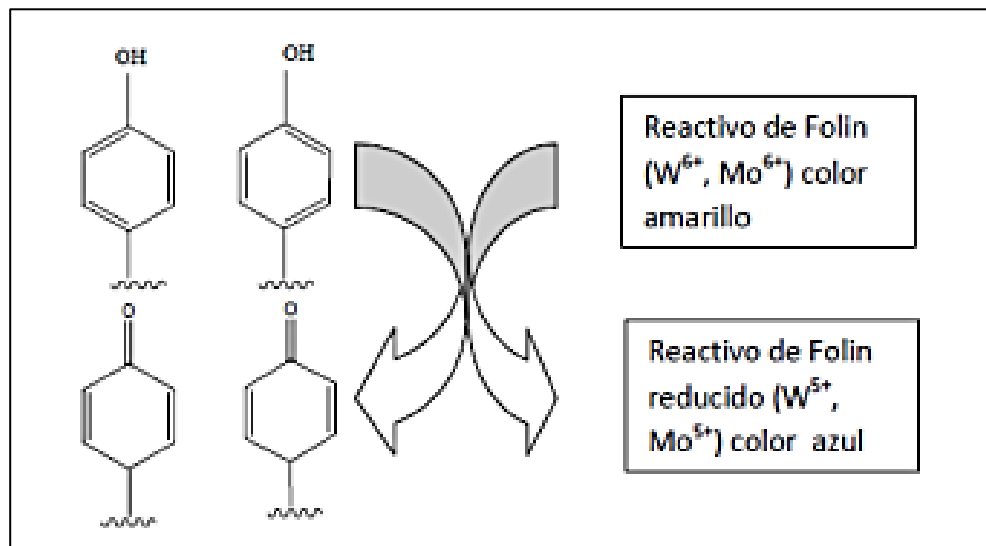
Su importancia radica en su efecto en la salud, distintos estudios han demostrado que un bajo consumo de antioxidantes está directamente asociado a la tendencia al desarrollo de enfermedades de tipo degenerativo, como el procedimiento de envejecer (Hamilton, 2007).

1.6.2. Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales presentes se la realiza a partir del ensayo Folin-Ciocalteu, este se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos en productos vegetales. Se basa en que el compuesto fenólico presente en la muestra mediante una reacción de tipo redox reacciona con el reactivo (compuesto por una mezcla de wolframio sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico) en un pH básico como se observa en la *Figura 3*, la reacción produce un color azul el cual es susceptible a ser determinado por espectrofotometría a 765 nm, y que se puede cuantificar en base a una recta patrón de ácido gálico (Pandey, K. & Rizvi, S, 2009).

Figura 5

Proceso de formación de un complejo



Nota. Tomado de: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. (García, E, et al., 2015).

El ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo se reduce por lo grupos fenólicos dando lugar a un complejo de color azul, el cual su intensidad será evaluada para determinar el contenido de polifenoles de la muestra.

1.6.3. Método DPPH

La capacidad de un compuesto como depurador de radicales libres puede ser registrada espectrofotométricamente mediante el método de DPPH. Su fundamento consiste en la reducción del radical estable DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) a la forma DPPH-H por acción de una sustancia antioxidante.

La reacción es medida a 515 nm y luego por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación del radical libre DPPH. Como en otros ensayos basados en la transferencia de electrones, la actividad captadora está fuertemente influenciada por el pH y las propiedades disolventes. El ensayo de DPPH es un método comúnmente usado para evaluar la actividad de la eliminación de compuestos antioxidante, debido a que el radical es una molécula estable. Los resultados son altamente reproducibles y comparables con otros métodos de detección de antioxidante como ABTS (Tahirovic et al., 2014).

Capítulo dos

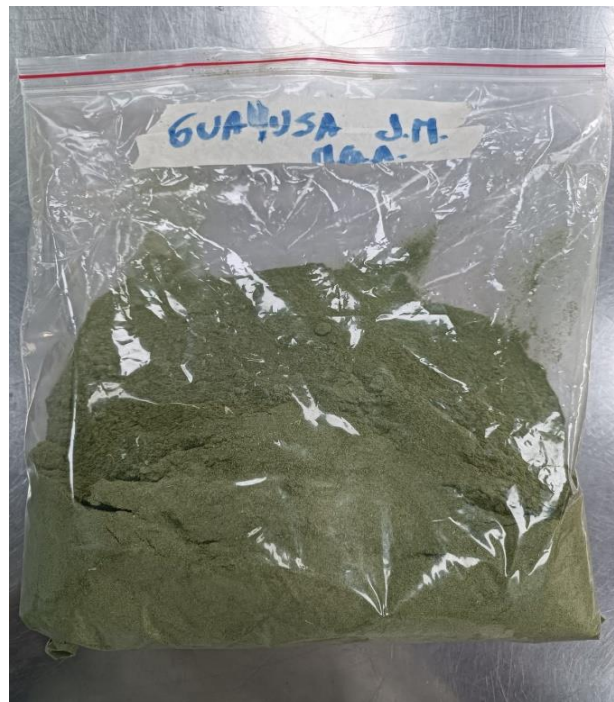
Materiales y métodos

2.1. Origen y tratamiento del material vegetal

Se utilizaron hojas de Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) recolectadas en la Amazonía ecuatoriana, estas fueron secadas hasta obtener un contenido de humedad menor al 10%. Estas fueron trituradas hasta conseguir un tamaño menor a 250 micrómetros para ser utilizado en los distintos procesos (Figura 6).

Figura 6

Muestra de guayusa triturada



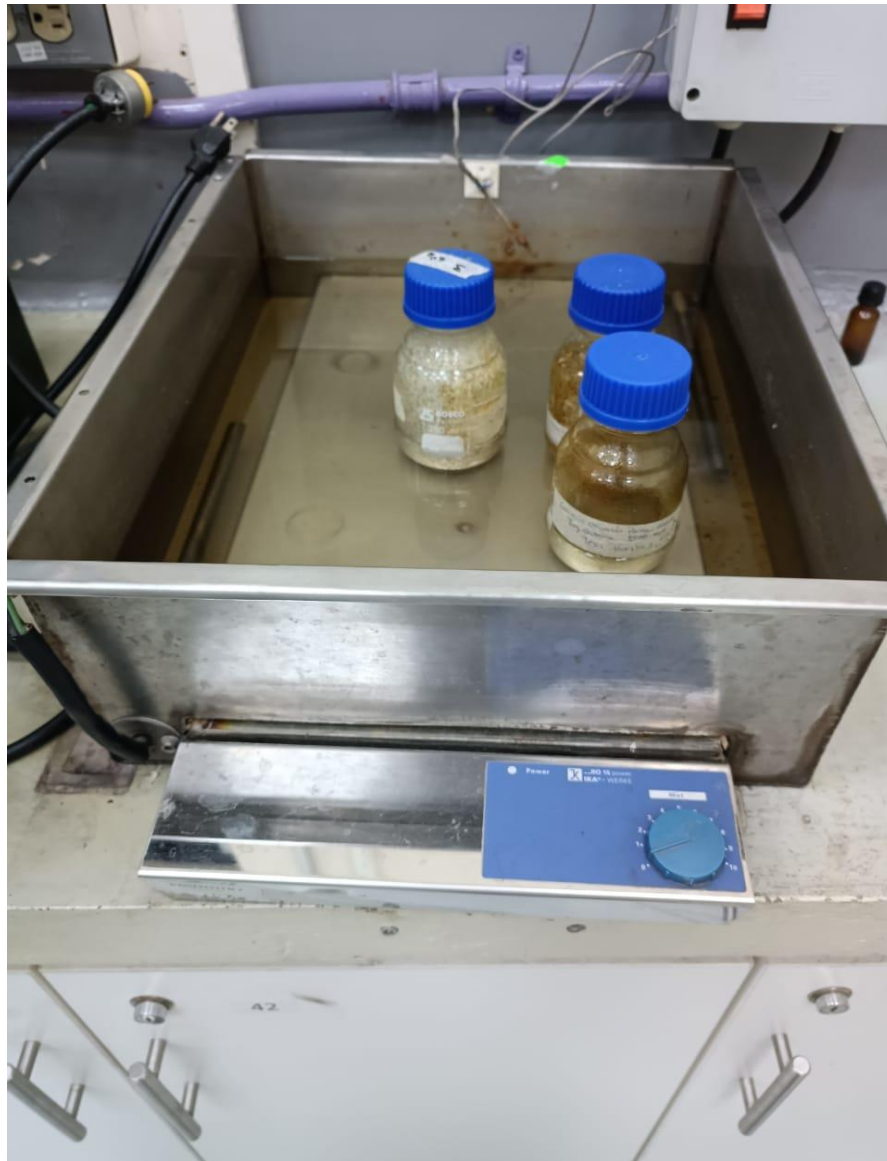
2.2. Maceración dinámica

Se realizó un proceso de maceración dinámica con la ayuda de un agitador en un frasco boeco en una relación 1:20 sólido-solvente, para lo cual se pesaron 10 gramos de muestra en 200 mL de solvente (etanol absoluto y etanol-agua) (Figura 7). El tiempo de extracción a baño maría consistió en 3 horas a una temperatura de 45°C. Luego se filtró el sólido contenido, con este se procedió a realizar una nueva extracción con la misma cantidad de solvente, pero esta vez en 30 minutos, así

mismo se filtró al vacío nuevamente el resultado obtenido con la ayuda de un papel filtro, el producto sólido resultante esta vez fue desechado. El proceso descrito es realizado por triplicado.

Figura 7

Equipo de baño maría (maceración dinámica)



Posteriormente los extractos obtenidos fueron almacenados en refrigeración, hasta alcanzar la etapa de secado de la misma y consecuentes ensayos.

2.3. Maceración asistida por ultrasonido

Se realizó una extracción por maceración asistida con ultrasonido en un equipo de baño maría con ultrasonido, primeramente, en un frasco boeco se agregó el material vegetal y el solvente, para lo cual se pesaron 10 gramos de muestra en 200 mL de solvente ya sea etanol absoluto o etanol-agua 50% v/v. Se coloca por lo tanto el material vegetal sólido en el equipo para baño maría con ultrasonido marca Fisher Scientific, modelo FS60D durante una hora con los siguientes parámetros: relación 1:20 m/v sólido-solvente, una temperatura de 45 °C y que opera con una frecuencia de 60 kHz (Figura 8).

Figura 8

Equipo de baño maría asistido por ultrasonido



Cuando se termina el tiempo fijado se procede a la filtración al vacío del sólido contenido en el interior del frasco con la ayuda de un papel filtro, el producto sólido resultante es desechado. El proceso descrito es realizado por triplicado. Luego los extractos obtenidos del solvente etanol-agua 50% v/v son congelados, y

lío-filizados en un equipo marca Labconco, modelo 7754047, para los consiguientes ensayos químicos.

2.4. Extracción por líquido presurizado

El proceso utiliza como solventes de extracción el etanol absoluto y una mezcla etanol-agua (50% v/v), en una planta de extracción supercrítica (Figura 9). Los solventes entran por la acción de una bomba marca Alliance, modelo Waters 2695 a razón de 2 mL/min hacia la parte del horno marca Memmert en el cual se encuentra la muestra de guayusa empacada, este contiene la muestra vegetal. El proceso se realizó bajo las siguientes condiciones: una relación 1:20 (masa/volumen) sólido-solvente, a una $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$. El proceso de extracción dura 3 horas a una presión de 120 bar; terminado este, se procede a filtrar al vacío el extracto obtenido, para los extractos de etanol puro se rotaevapora el alcohol en su totalidad, mientras que para los extractos en etanol-agua se liofiliza la muestra luego de ser congelada.

Figura 9

Planta de extracción supercrítica



2.5. Análisis químicos a los extractos

2.5.1. Cálculo del rendimiento

El cálculo del rendimiento en peso de los distintos métodos aplicados se lo realiza partiendo del pesado de cada extracto obtenido para los distintos solventes para luego ser comparado con el peso de la muestra original usado en cada extracción. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto (g)}}{\text{peso de la muestra (g)}} * 100 \quad \text{Ec.1}$$

2.5.2. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se aplicó el método de Folin-Ciocalteu mediante el proceso descrito por Thaipong, et al. (2006), este expresa los resultados logrados en unidades de miligramos equivalentes de ácido gálico sobre gramos de extracto. El método consiste en los siguientes pasos:

2.5.2.1. Desarrollo de la curva de calibración. La curva de calibración se la realiza mediante la elaboración de estándares de ácido gálico en el metanol a partir de una una solución madre (SM), para esto se pesan 20 mg de ácido gálico aforado a 10 mL con metanol, obteniendo una solución de 2 mg/mL. Conociendo la concentración de la SM se procede a calcular los volúmenes para los estándares (St) mediante la siguiente fórmula:

$$C_{SM} * V_{SM} = C_{St} * V_{St} \quad \text{Ec.2}$$

En donde se multiplica la concentración por el volumen para la solución madre (SM) y el estándar a obtener (St) obteniendo la concentración para cada estándar. El método posee una curva de calibración lineal en un rango de 0 a 0,1 mg/mL, según Thaipong et al. (2006), por lo que el volumen de cada alícuota debe cumplir este requerimiento. A cada estándar se le adiciona 2400 µL de agua destilada y 150 µL de Folin-Ciocalteu [0,25 N], se lo agita durante cinco minutos y se lo deja reaccionar 3

minutos. Se le agrega 0,3 mL de carbonato de sodio. Los estándares reaccionan en la oscuridad durante 2 horas y luego son llevados a un espectrofotómetro marca Jenway modelo 7305 en donde estos son vertidos en una celda espectrofotométrica para la medición de absorbancia a 725 nm, se anotan los valores obtenidos, luego se procede a construir la curva de calibración con los resultados, el eje x representa la concentración calculada anteriormente frente a la absorbancia (eje y), para validar una correcta calibración se debe obtener un coeficiente de correlación igual o superior a 0,99.

2.5.2.2. Preparación de reactivos. Se prepararon dos soluciones, la primera es la de Folin-Ciocalteu [0,25 N], para esta se utilizó la ecuación (Ec.2), despejando el volumen necesario para preparar 10 mL con una concentración [2N], con el cálculo del mismo se obtuvo un valor de 1,25 mL, la cual se aforará con agua destilada hasta el volumen mencionado anteriormente.

La segunda es una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_2) 1N, la cual se la realiza pesando 1,325 g de ácido de un peso molecular de 106 g/mol y equivalente químico 53 g/mol, finalmente se afora a 25 mL con agua destilada.

2.5.2.3. Lectura de muestras. Una vez finalizados los pasos anteriores, se procede a la lectura de las soluciones de los extractos obtenidos. Se toma una alícuota de 150 microlitros (μL) de cada muestra, se le agrega 2400 μL de agua destilada, y 150 μL de Folin-Ciocalteu 0,25 N, preparados en el paso anterior. Luego se agitan durante cinco minutos y se dejan reaccionar tres minutos, se agregan 300 μL de carbonato de sodio 1N, y se dejan reaccionar las mismas durante 2 horas en la oscuridad y temperatura ambiente. Finalmente, se leen las muestras a 725 nm en un espectrofotómetro marca Jenway modelo 7305.

2.5.3. Determinación de la actividad antioxidante

2.5.3.1. Preparación de estándares. Se siguió como referencia el procedimiento descrito por Thaipong, et al. 2006, para esto se realiza la preparación de la solución madre de Trolox, se pesan 12,5 mg de este y se afora a 50 mL con metanol, para conocer la concentración de la solución preparada se relaciona la cantidad pesada, el volumen obtenido y el peso molecular del compuesto, por último, se toma en cuenta la pureza del reactivo para ajustar una concentración final de la solución madre de 1029,73 μmol . A partir de este resultado se procede a calcular el volumen para cada estándar.

Para el cálculo del volumen se utiliza la ecuación (Ec.2) en el cual se determina la concentración para cada estándar, en donde se toma en cuenta un rango de 25-800 μmol de Trolox según Thaipong et al. (2006).

Una vez preparados los estándares se construye la curva de calibración, concentración (eje x) frente a la absorbancia (eje y), en donde se debe obtener una curva con un coeficiente de correlación superior a 0,99.

2.5.3.2. Método DPPH. El método permite medir la habilidad de los antioxidantes contenidos en la muestra para capturar al radical DPPH, los resultados obtenidos se expresan como micromoles equivalentes de Trolox sobre gramos de extracto (μM eq-Trolox/ g extracto).

Para la realización de la solución de trabajo (ST) se pesa 24 mg de DPPH y se afora a 100 mL con metanol. Luego se toma 10 mL y se le adiciona 45 mL de metanol aproximadamente, se mide la absorbancia a longitud de onda de 515 nm ajustándola hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$ con la adición de metanol o solución madre dependiendo de lo requerido.

2.5.3.3. Lectura de muestras de DPPH. Se procede a la lectura de las soluciones de los extractos obtenidos. Se toma una alícuota de 150 microlitros (μL) de cada muestra, se le agrega 2850 μL de la solución de trabajo preparada en los puntos anteriores, posteriormente se deja reaccionar la misma 24 horas en la oscuridad y temperatura ambiente. Finalmente, se leen las muestras a 515 nm en un espectrofotómetro UV visible marca Jenway modelo 7305.

2.6. Análisis estadístico

Los extractos obtenidos fueron en total 18, considerando como factores los métodos de extracción (3) y los solventes de extracción (2), teniendo un diseño experimental 3×2 con dos repeticiones. Los extractos fueron evaluados en rendimiento de extracción, la actividad antioxidante mediante una prueba de DPPH, y, por el contenido de fenoles totales mediante un ensayo Folin-Ciocalteu.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA, para determinar si los factores de estudio tienen efecto sobre las variables de respuesta.

Capítulo tres

Análisis y Discusión de Resultados

3.1. Rendimiento de la extracción

En la tabla 4,- se muestran los resultados de los porcentajes de rendimiento para cada método de extracción utilizado en comparación con el tipo de solvente empleado, En el Anexo 1, se muestra el cálculo realizado para la obtención de los rendimientos.

Tabla 4

Rendimiento de extracción según el solvente y método empleado

Método de extracción	Rendimiento [% p/p]	
	Etanol absoluto	Etanol-H ₂ O
Maceración dinámica	18,278 ± 1,37 ^{a,A}	24,354 ± 0,99 ^{a,B}
Maceración asistida por ultrasonido	17,518 ± 2,77 ^{a,A}	25,101 ± 1,43 ^{a,B}
Líquido presurizado	3,102 ± 0,07 ^{b,A}	2,526 ± 0,067 ^{b,B}

Cada valor representa la media y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. Las medias que no tienen una misma letra minúscula en la columna para el solvente de extracción son significativamente diferentes. Las medias que no tienen una misma letra mayúscula entre filas para un mismo método de extracción son significativamente diferentes.

Entre los diferentes porcentajes de rendimiento peso-peso (% p/p) se toma en cuenta el método de extracción frente al solvente utilizado en las distintas muestras. Observando los valores obtenidos en la tabla 4 se tiene que la utilización de un solvente etanol-agua al 50% v/v es el más adecuado al momento de obtener un mayor rendimiento de la muestra, esto ya que cada valor de rendimiento en su columna en particular es mayor en comparación con la de etanol absoluto para el mismo método. La selección del solvente a utilizar va a depender la solubilidad del componente a extraer, el tiempo de extracción (su cantidad de componentes aumenta con el volumen de

solvente), o hasta que el material y el solvente se encuentren en equilibrio (Handa et al., 2008).

El ANOVA presentado en el Apéndice 4 muestra que todos los factores estudiados en las condiciones probadas tuvieron efecto significativo ($P < 0,05$), esto muestra que tanto el método de extracción como el solvente tienen efecto significativo en el rendimiento de extracción. De los resultados expuestos acerca del solvente se determinó que etanol-agua (50% v/v) presentó mayor rendimiento de extracción, de acuerdo a los valores mostrados en el Apéndice 6 se tiene que la maceración dinámica y la asistida por ultrasonido presentan resultados técnicamente iguales por lo que en este caso la maceración asistida por ultrasonido resultaría más eficiente debido a requerir un menor tiempo de extracción. El alto rendimiento del proceso se debe a que la implosión de burbujas de cavitación cerca de la superficie sólida formando macroturbulencias, estas generan fenómenos físicos como erosión, fragmentación o esfuerzo cortante que causan daños a la estructura de la misma, además causan efectos como microchorros, micromezclado y macroturbulencias que suelen estar presentes de manera secuencial, y combinándose durante el proceso de extracción mejorando la transferencia de masa desde la matriz sólida al solvente líquido, lo que permite obtener mayores rendimientos de extracción (Tiwari, 2015).

Mientras que por el contrario el éxito del proceso de extracción con líquido presurizado se pudo ver afectado por factores como la temperatura, altas temperaturas disminuyen la viscosidad del disolvente ayudando a penetrar de mejor manera la matriz, tiempo de extracción (largos tiempos conducen a una degradación de compuestos) naturaleza de la matriz, y características específicas de los compuestos. (Osorio y Meireles, 2013)

3.2. Determinación de la actividad antioxidante

Tabla 5

Concentración calculada para cada método empleado

Método de extracción	Etanol absoluto Cc [uM EqTrolox/g ext]	Etanol-agua Cc [uM EqTrolox/g ext]
Maceración Dinámica	1699,2 ± 484,69 ^{a,A}	3527,733 ± 462,17 ^{a,B}
M. asistida Ultrasonido	1390,533 ± 165,02 ^{a,A}	3983,733 ± 636,0 ^{a,B}
Líqu. presurizado	1347,2 ± 71,02 ^{a,A}	2063,867 ± 133,42 ^{a,B}

Cada valor representa la media y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. Las medias que no tienen una misma letra minúscula en la columna para el solvente de extracción son significativamente diferentes. Las medias que no tienen una misma letra mayúscula entre filas para un mismo método de extracción son significativamente diferentes.

El ANOVA presentado en el Apéndice 4 muestra que los factores estudiados en las condiciones probadas tuvieron efecto significativo ($P < 0,05$) sobre la capacidad antioxidante en la tabla 5 se observa que el solvente etanol-agua 50% v/v nos proporciona una mayor actividad antioxidante, esta realizada por medio de una maceración asistida por ultrasonido. El Apéndice 6 proporciona información que permite comprobar dicha afirmación ya que una media de 202,43 uM EqTrolox/g ext es superior a los otros métodos y solventes aplicados.

Distintos estudios como el presentado por Pardau et al. (2017) determinaron que la capacidad antioxidante del té de guayusa está alrededor de 1728-2019 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extracto, mientras que Villacís-Chiriboga et al. 2018 concluyó que el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante son directamente proporcionales. Esto bajo un proceso en el cual se preparó extracciones con agua, se añadió agua a los matraces y se dejó que alcanzara los 90°C, en un baño de agua, a una concentración de 1 g de muestra/100 mL de H₂O. Se tomó muestras cada intervalo de tiempo de 2, 10, 30 y 60

minutos para evaluar el efecto del tiempo de preparación sobre la actividad antioxidante. Además, valores obtenidos por Cadena – Carrera, et al (2019) para la técnica de Soxhlet a una temperatura de 60 °C al utilizar 150 mL etanol en 5g de muestra seca reflejan una capacidad antioxidante cercana a $116,69 \pm 5,72 \mu\text{M Eq Trolox/ g}$, notándose una vez más que la técnica empleada, polaridad y temperatura fueron factores que tuvieron un efecto directo y positivo en el TEAC. Por lo tanto, estos resultados son comparables con los obtenidos en este estudio con valores de concentración más bajos informados por el extracto etanólico, mientras que aumentan cuando su solvente es etanol-agua.

Respecto a la diferencia entre los métodos de extracción, el Apéndice 4 se observa que este de por sí es un factor con un efecto a tomar en cuenta en la respuesta del proceso ($P < 0,05$), pero al estar en conjunto con el solvente empleado este pierde su importancia pasando a un segundo plano. Distintos estudios aplicados para evaluar la actividad antioxidante frente al método empleado como el de Viganò et al 2016, en donde se analizó dos métodos de extracción (PLE, maceración) usando como solventes etanol puro y mezclas agua-etanol 70 y 85% v/v, dando una actividad antioxidante con valores de 3,28 TEAC/ g cáscara seca por DPPH, ha presentado mejores resultados con la extracción PLE con un solvente agua-etanol (70%) a 80 °C. El mismo comportamiento se observó en el estudio realizado por Machado, et al 2015, en donde extractos de residuos de moras azules fueron obtenidos con extracción PLE, maceración en con agua, mezcla agua-etanol (50%) y etanol absoluto a temperaturas de 80 y 100 °C. Encontrando una mayor actividad antioxidante de $76,03 \mu\text{mol TEAC/g}$ en la extracción con alta presión con una mezcla agua-etanol 50% v/v y 100 °C de temperatura. Se observa por lo tanto que una mayor actividad antioxidante es lograda a condiciones de altas temperaturas en el proceso de PLE, por lo que, aunque distintos estudios muestran que la extracción por PLE debería dar mejores resultados, esto no fue así ya que el proceso no fue realizado a unas condiciones de temperatura que nos hubieran permitido optimizar los resultados obtenidos.

3.3. Determinación de cantidad de fenoles totales

Tabla 6

Contenido de fenoles totales

Método de extracción	Etanol absoluto Cc [mg AG/g ext]	Etanol-agua Cc [mg AG/g ext]
Maceración Dinámica	108,502 ± 11,96 ^{a,A}	203,149 ± 12,07 ^{a,B}
M. asistida Ultrasonido	101,844 ± 5,48 ^{a,A}	303,014 ± 23,33 ^{a,B}
Líqu. presurizado	132,704 ± 25,87 ^{a,A}	229,599 ± 10,61 ^{a,B}

Cada valor representa la media y la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

Las medias que no tienen una misma letra minúscula en la columna para el solvente de extracción son significativamente diferentes.

Las medias que no tienen una misma letra mayúscula entre filas para un mismo método de extracción son significativamente diferentes.

Los valores obtenidos para el ensayo de contenido de fenoles totales permiten establecer el potencial antioxidante de los mismos (Loizzo, et al. 2012).

Los resultados obtenidos en la Tabla 6 muestran que el tratamiento de maceración asistida por ultrasonido con etanol-agua 50% v/v como solvente presentó los valores más altos de fenoles totales en promedio un 303,014 mg Eq AG/g de extracto, mientras que el contenido de fenoles cuando se empleó etanol absoluto como solvente fue siempre menor, esto se puede observar en el Apéndice 6 en donde se tiene que al usar etanol absoluto como solvente se obtuvo un valor medio de contenido de fenoles de 114,35 mg Eq AG/g de extracto. En el Apéndice 6 además se muestra que el tipo de solvente empleado es el factor de mayor relevancia al momento de realizar el proceso de extracción. Los resultados obtenidos además se han comparado con los estudios realizados por Rodríguez, et al, 2022 para la cuantificación de fenoles totales para un método de extracción por maceración con etanol 96% por 30 días, y cuantificado

por el método de Folin-Ciocalteu, en donde se ha mostrado un valor de $357,64 \pm 0,60$ mg AG/g de muestra.

Los diferentes estudios como los redactados por Burneo, 2009 para la determinar el contenido de fenoles y antioxidantes de diferentes especies vegetales reflejan que el rendimiento de la extracción de fenoles es favorecido por la polaridad del solvente utilizado, esto debido a los resultados dados para un proceso de extracto con maceración dinámica a temperatura ambiente durante cinco horas con metanol como solvente. El valor determinado para la especie *Ilex Guayusa* Loes es de $116,8 \pm 0,05$ mg Eq AG/g de extracto, en este caso la alta polaridad del solvente permite tener en su extracto una gran cantidad de fenoles comparado con un proceso similar, pero con etanol absoluto como solvente (Tabla 6). Por lo tanto, esto influye en la cantidad de fenoles a extraer, debido a que los compuestos fenólicos son más solubles en compuestos polares y menos en compuestos orgánicos no polares (Pérez-Nájera et al., 2013).

Los compuestos fenólicos, al ser ácidos débiles van a actuar como donadores de átomos de hidrógeno al ser capaces de reaccionar con el oxígeno molecular, esto produce una oxidación de los mismos actuando como antioxidantes, según García-Ruiz et al. (2017), la guayusa reportó glucósidos flavonoles como quercetina-3-O-hexosa, kaempferol-3-O-hexosa y quercetina 3-O-rutinósido, debido a esto se tiene que a mayor cantidad de fenoles presentes mayor será la capacidad antioxidantes del vegetal, esto se puede además complementar con los resultados presentes en las Tablas 5 y 6 en donde se observa que la cantidad de fenoles totales es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra.

Por último, El ANOVA presentado en el Apéndice 4 muestra que el factor referente al solvente empleado tiene un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el contenido de fenoles totales mientras que sobre el método de extracción no se puede concluir que exista una diferencia significativa ya que $P < 0.2530$)

Conclusiones

El mejor tipo de solvente utilizado en los distintos métodos de extracción en el presente estudio fue el etanol-agua 50% v/v, esto en comparación con etanol absoluto.

Las condiciones que permiten tener mejores resultados en el proceso de extracción de antioxidantes y fenoles totales en las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) fueron maceración asistida por ultrasonido con un tiempo de maceración de 1 hora y con solvente etanol-agua 50% v/v, sin embargo, no se observa una diferencia significativa entre esta y la maceración dinámica ya que el método de extracción no representa un factor relevante al momento de elegir sino el tipo de solvente utilizado.

Las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) poseen un contenido de fenoles totales de 303,014 mg Eq AG/g de extracto, además de tener una capacidad antioxidante medida por el método de DPPH en promedio de 3983,733 uM EqTrolox/g ext.

Recomendaciones

Para un mayor entendimiento de la actividad antioxidante presente en cada muestra analizada se recomienda su determinación mediante la utilización de otros métodos adicionales al de DPPH, como pueden ser ABTS o FRAP, estos son utilizados generalmente para muestras biológicas y además ofrecen información adicional, ya que pueden existir compuestos antioxidantes que reaccionan o no con determinadas especies oxidantes.

Se recomienda aplicar un ensayo cromatográfico para la evaluación del contenido de fenoles en las distintas muestras analizadas esto con el propósito de evaluar no solo la presencia y cantidad de fenoles existentes sino también que tipo de polifenoles contiene la especie.

Para mejorar el proceso de extracción especialmente en la maceración dinámica y asistida por ultrasonido se recomienda realizar una doble maceración, esto ayuda a extraer la mayor cantidad de extracto posible mejorando el rendimiento del proceso, y la extracción de fenoles y antioxidantes de la muestra vegetal.

Referencias

- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A. (2013). *Techniques for extracción of bioactive compounds from plant materials: A review*. Journal of Food Engineering, 117(2013), 246-436. Recuperado el 21 de abril de 2022 de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bendicho, C. et al., (2012). *Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry*. 31.
- Burneo, Z. L. (2009). *Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador
- Cadena-Carrera, S., Parolo, D., Cruz, A., Bella Cruz, R., Müller, J., Haiko Hense. (2019) *Biological activity of extracts from guayusa leaves (Ilex guayusa Loes.) obtained by supercritical CO2 and ethanol as cosolvent*, The Journal of Supercritical Fluids, Volume 152, ISSN 0896-8446. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>.
- Conde, E. (2012) *Revalorización de residuos Agroindustriales y forestales para la Obtención de antioxidantes naturales Con aplicaciones en la industria Alimentaria, cosmética y/o farmacéutica*, Universidad de Vigo.
- Crespo Coello, P. (2013). *La Guayusa: Trayectoria y Sentido* (P. d. I. d. Experiencias, Trans.) Programa de Manejo Forestal Sostenible en la Región Andina: IICA - Ministerio de Asuntos Exteriores de Finlandia.
- Cussler, E. L. (2009). *Diffusion: mass transfer in fluid systems*: Cambridge university press.
- García, E., Fernández, I., Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. España
- García-Ruiz A, Baenas N., Benítez-González A., Stinco C., Meléndez-Martínez A, et al. (2017). *Guayusa (Ilex guayusa L.) new tea: phenolic and carotenoid composition*

and antioxidant capacity. J Sci Food Agric .2017;97:3929–36.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8255>.

Ehlers, A.P. Loibner. (2006). *Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: a review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction.* Environ. Pollut. 141. 494–512.

Freitas de Oliveira C., Giordani D., Lutckemier R., Gurak P.D., Cladera-Olivera F., Ferreira Marczak L.D. (2016). *Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound.* LWT – Food Sci. Technol.71:110–115.

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.*

Jorgensen, P. M., León-Yáñez, S., & Garden, M.B. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador:* Missouri Botanical Garden Press.

Martínez, R., Torres, P., Meneses, M., Figueroa, J., Pérez, J. y Viuda, M. (2012). *Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate.* Food Chemistry. 135. 1520-1526

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health.* Pharmacognosy Reviews, 4(8), 118.
doi:10.4103/0973-7847.70902

Loizeau, P. A. and G. Barriera. (1999). *Aquifoliaceae.* Pages 225–227 in P. M. Jørgensen and S. León-Yáñez, eds., *Catalogue of the vascular plants of Ecuador.* Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden, Vol. 75. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri.

Loizzo, M., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F. (2012). *Food Compos. Anal.* 25 (2), 179–184.

Mark, B., Lee KL, Harrell, Jr F. (2016) *Understanding the role of p values and hypothesis tests in clinical research.* JAMA Cardiol.

- Radice, M., & Vidari, G. (2010). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial*. Universidad degli Studi di Pavia. Italia.
- Radice et al. (2016). *Ilex guayusa: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities*. Mol2Net, 1-6. doi:10.3390/MOL2NET-02-M
- Rocha, M. (2018). *Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa (Ilex guayusa)*. Licenciatura. Univ. Central del Ecuador, recuperado el 21 de abril de 22 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14259/1/T-UCE-0004-A60-2018.pdf>
- Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K. (2012). *Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results*. Food Chemistry; 130: 1036–1043.
- Orrego A., Carlos E., (2004). *Apuntes del Curso Procesamiento de Alimentos: línea de profundización*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura – Sede Manizales.
- Osorio T., y Meireles A. (2013). Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. Food and Public Health, 3(6), 289-303. <http://doi.org/10.5923/j.fph.20130306.05>
- Pandey, K. B. y Rizvi, S. I. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative Medicine Cellular Longevity. vol.2, nº5, p.270.
- Pardau, M. D., A. S. P. Pereira, Z. Apostolides, J. C. Serema, and M. J. Bester. (2017). *Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations: A comparison to Camellia sinensis teas*. Food Funct. 8 (12):10. doi:10.1039/c7fo01067b.
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). *Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (Citrus limetta Risso) y determinación de su actividad antioxidante*. BIOtecnia, 15(3), 18-22.

- Rodríguez, O. E., Castañeda, J. C., Hernández, M. J., Cárdenas, C., Pombo, L. M., & Borrego, P. (2022) *High polarity extracts obtained from Ilex guayusa Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity*. *Vitae*, 29(1).
<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n1a347297>
- Shaman Amazónico. (2016). Aplicaciones médicas tradicionales de la guayusa en la amazonía ecuatoriana. En: Villacís, J. (Ed.). Ecuador.
- Tahirovic, I., Kozljak, M., Toromanovic, J., Copra-Janicijevic, A., Klepo, L., Topcagic, A Demirovic, H. (2014). *Total phenolic content and antioxidant capacity in infusions of various herbal teas*. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, vol. 42, p. 51–55.
- Thaipong, K, Boonprakob, U., Crosby, K., & Hawkins, B. (2006) *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (6-7), 669-775.
- Tiwari, B.K. *Ultrasound: A clean, green extraction technology*. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 71, 100–109.
- Tomaz, I., Huzani, N., Preiner, D., Stupi, D., Andabaka, Z. E. (2019). *Methods of extracting polyphenols from grapes: extractions of grape polyphenols*. Elsevier Inc, 10, 151-167. Recuperado el 21 de abril de 2022 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00010-4>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. Doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Viganó, J. y Martínez, J. (2015). Trends for the Application of Passion Fruit Industrial ByProducts: A Review on the Chemical Composition and Extraction Techniques of Phytochemicals. *Food and Public Health*, 5(5), 164-173.
<http://doi.org/10.5923/j.fph.20150505.03>

- Villacís-Chiriboga, J., A. García-Ruiz, N. Baenas, D. A. Moreno, A. J. Meléndez-Martínez, C. M. Stinco, L. Jerves-Andrade, F. León-Tamariz, J. Ortiz-Ulloa, and J. Ruales. (2018). Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *J. Sci. Food Agric.* 98 (5):1927–34. doi:10.1002/jsfa.8675.
- Wassén, S. H. (1972). *A medicine-man's implements and plants in a Tiahuanacoid tomb in Highland Bolivia*. *Etnologiska Studier*, 32, 3-114, Göteborg.
- Wise, G., & Negrin, A. (2019). *A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-13. doi:10.1080/10408398.2019.1643286
- Wise, G., and D. E. Santander. (2018). Novel food notification for authorisation of a traditional food from a third country under regulation (EU) 2015/2283: Dried leaves of guayusa (*Ilex guayusa* Loes.). Tena, Ecuador: Ikiam EP. doi: 10.13140/RG.2.2.18400.53762.
- Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D., Aguilar-Zarate, P., Ascacio-Valdés, J., Cruz, K., Reyes-Luna, C. & Aguilar, C. (2017). *Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies*. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* (pp. 229-252). London, United Kingdom: Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-811521-3.00005.

Apéndice

Apéndice A. Rendimiento porcentaje peso-peso para cada método y solvente empleado

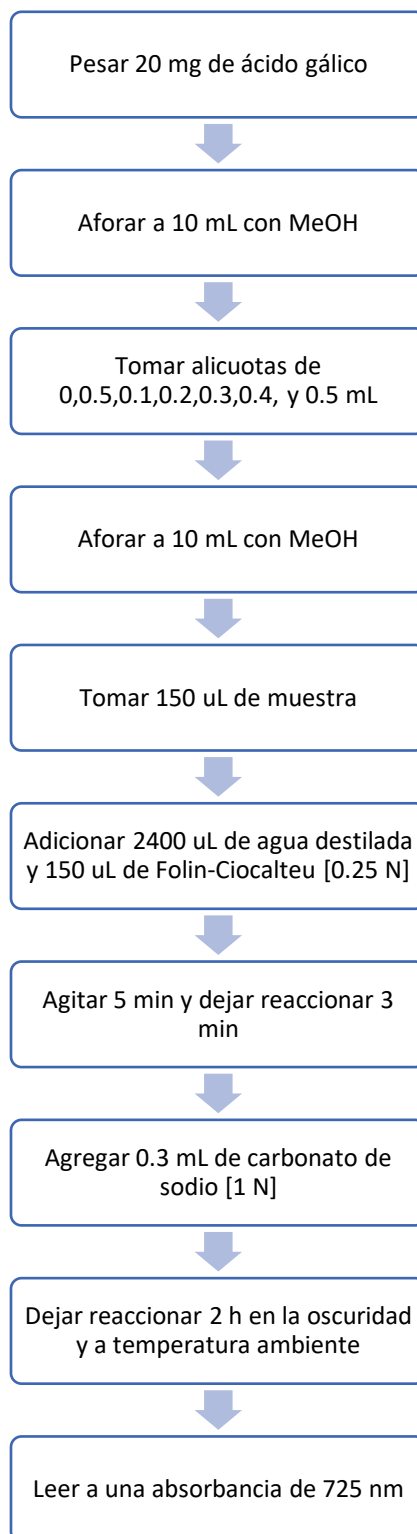
Tabla A1

Cuadro resumen de los resultados obtenidos para el porcentaje de rendimiento para cada método de extracción

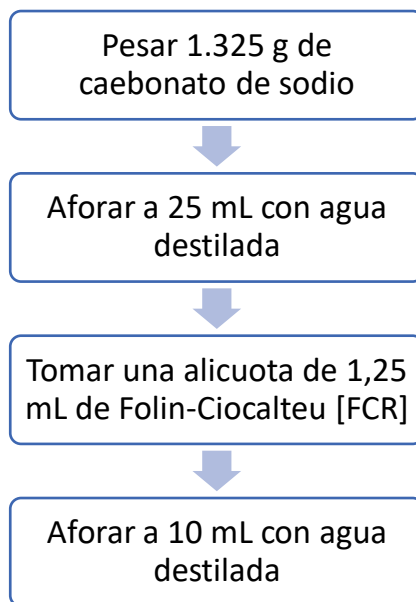
Método de extracción	Rendimiento [%]					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Etanol abs.	Etanol-H ₂ O	Etanol abs.	Etanol-H ₂ O	Etanol abs.	Etanol-H ₂ O
Maceración dinámica	19,438	23,298	18,631	24,477	16,766	25,286
Maceración asistida por ultrasonido	20,673	24,065	16,392	26,727	15,488	24,511
Líquido presurizado	3,097	2,599	3,18	2,467	3,029	2,511

Apéndice B. Diagrama para la elaboración de la curva de calibración y lectura de muestras para Fenoles totales.

Preparación y lectura de estándares.



Preparación de reactivos para la determinación de fenoles totales

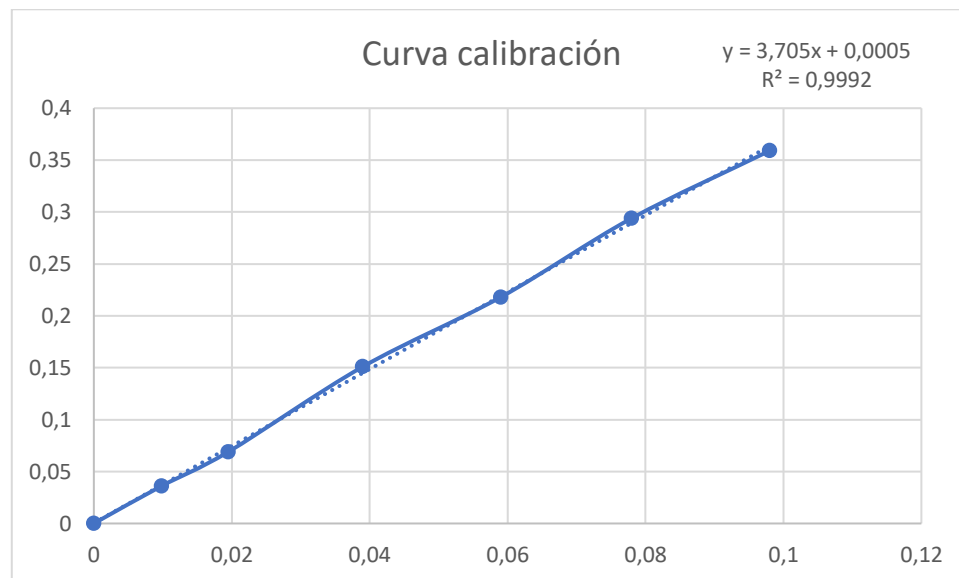


Curva de calibración para Fenoles totales.

Concentración [mg/mL]	Señal [nm]
0	0
0,0098	0,036
0,0195	0,069
0,039	0,151
0,059	0,218
0,078	0,294
0,098	0,359

Figura B1

Curva de calibración para fenoles totales



Cálculo para la determinación de la concentración

La concentración se expresará en miligramos de ácido gálico (mg AG/gr Ex) sobre gramos de extracto, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

- Determinación de la ecuación de la recta de la curva de calibración de la forma:

$$y = mx + b$$

En donde:

y: absorbancia medida [nm]

x: concentración

m: pendiente de la recta

b: intersección con el eje

- Se despeja x y reemplaza valores:

$$x = \frac{y - 0,0005}{3,705}$$

- Ejemplo de resolución:

Muestra 1:

$$x = \frac{0,212 - 0,0005}{3,705} = 0,0571 \frac{mgAG}{mL sol}$$

$$x = 0,0571 \frac{mgAG}{mL sol} * \frac{1 mL sol}{0,5 mg ext} = 0,1142 \frac{mgAG}{mg ext} * \frac{1000 mg ext}{1 g ext} = 114,2 \frac{mgAG}{g ext}$$

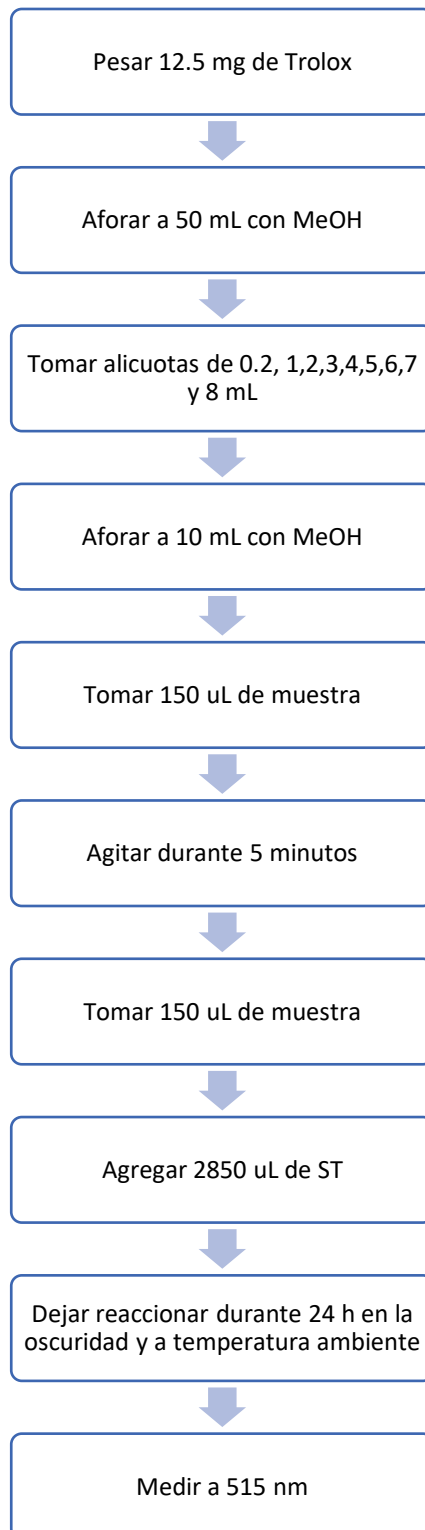
Muestra 2:

$$x = \frac{0,217 - 0,0005}{3,705} = 0,0584 \frac{mgAG}{mL sol}$$

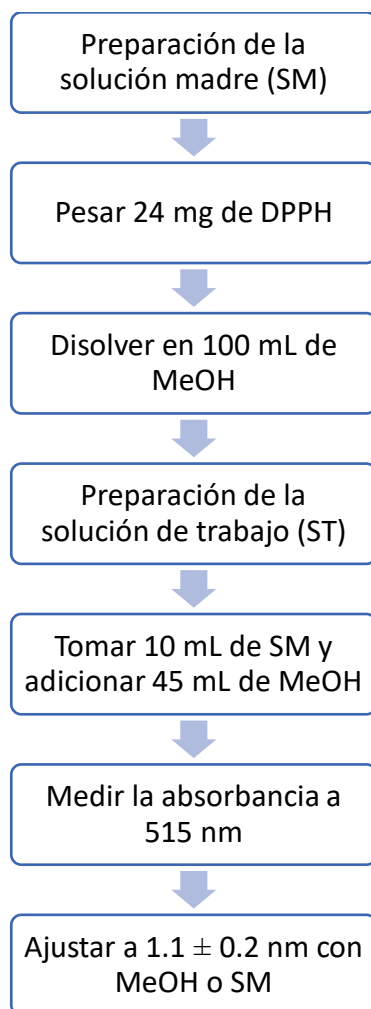
$$x = 0,0584 \frac{mgAG}{mL sol} * \frac{1 mL sol}{0,5 mg ext} = 0,1169 \frac{mgAG}{mg ext} * \frac{1000 mg ext}{1 g ext} = 116,86 \frac{mgAG}{g ext}$$

Apéndice C. Diagrama para la elaboración de la curva de calibración y lectura de muestras para DPPH

Preparación y lectura de estándares.



Preparación de las soluciones de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante



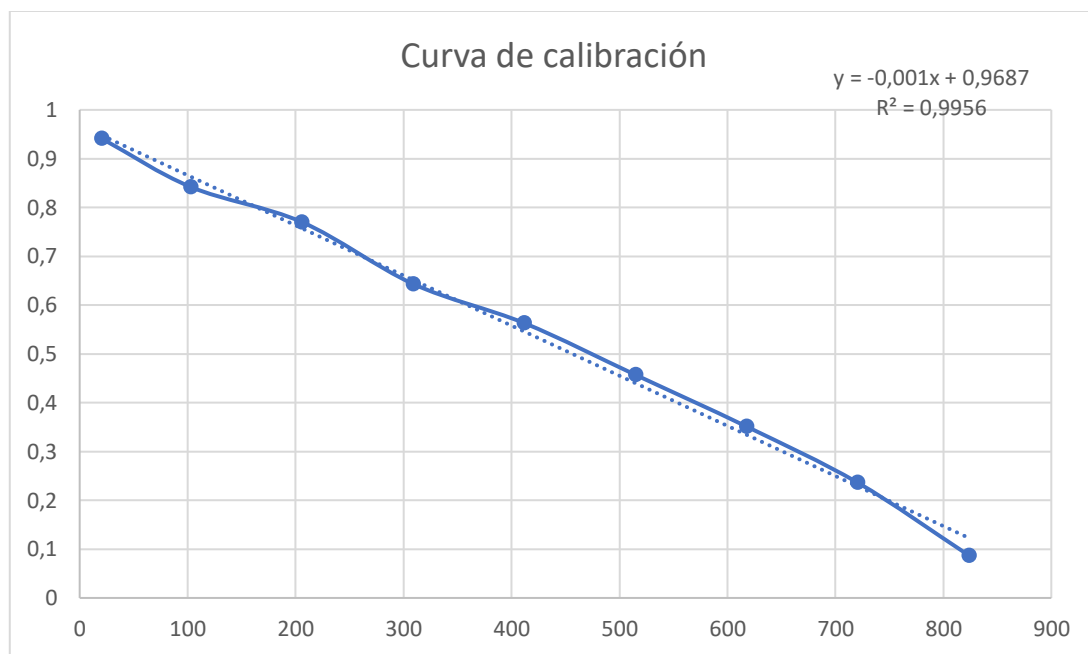
Curva de calibración para el método DPPH

Concentración [mg/mL]	Señal [nm]
20,59	0,941
102,97	0,842
205,95	0,77
308,92	0,643
411,89	0,563
514,87	0,457

617,84	0,351
720,81	0,236
823,79	0,087

Figura C1

Curva de calibración para antioxidantes



Cálculo para la determinación de la concentración

La concentración se expresará en micro moles equivalentes de Trolox sobre gramos de extracto, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

- Determinación de la ecuación de la recta de la curva de calibración de la forma:

$$y = mx + b$$

En donde:

y: absorbancia medida [nm]

x: concentración

m: pendiente de la recta

b: intersección con el eje

- Se despeja x y reemplaza valores:

$$x = \frac{0,9703 - y}{0,001}$$

- Ejemplo de resolución:

Muestra 1:

$$x = \frac{0,9703 - 0,592}{0,001} = 378,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{mL sol}}$$

$$\begin{aligned} x &= 378,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{L sol}} * \frac{1 \text{ L sol}}{1000 \text{ mL sol}} * \frac{1 \text{ mL sol}}{0,25 \text{ mg ext}} * \frac{1000 \text{ mg ext}}{1 \text{ g ext}} \\ &= 1513,2 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{g ext}} \end{aligned}$$

Muestra 2:

$$x = \frac{0,9703 - 0,637}{0,001} = 333,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{mL sol}}$$

$$\begin{aligned} x &= 333,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{L sol}} * \frac{1 \text{ L sol}}{1000 \text{ mL sol}} * \frac{1 \text{ mL sol}}{0,25 \text{ mg ext}} * \frac{1000 \text{ mg ext}}{1 \text{ g ext}} \\ &= 1333,2 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{g ext}} \end{aligned}$$

Muestra 3:

$$x = \frac{0,9703 - 0,405}{0,001} = 565,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{mL sol}}$$

$$\begin{aligned}x &= 565,3 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{L sol}} * \frac{1 \text{ L sol}}{1000 \text{ mL sol}} * \frac{1 \text{ mL sol}}{0,25 \text{ mg ext}} * \frac{1000 \text{ mg ext}}{1 \text{ g ext}} \\ &= 2261,2 \frac{\text{uMEq. Trolox}}{\text{g ext}}\end{aligned}$$

Apéndice D. ANOVA factorial multinivel para fenoles totales: método de extracción (MExtr)vs solvente (Solv) empleado

Rendimiento de extracción:

Atributos de Diseño Factorial Multinivel

Clase de diseño: Factorial Multinivel

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 1

Número de ejecuciones: 18

Grados de libertad para el error: 11

Aleatorizar: No

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
MExtr	-1,0	1,0	3	
Solvente	-1,0	1,0	2	

Análisis de Varianza para Rendimiento extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:MExtr	1026,99	1	1026,99	247,15	0,0000
B:Solvente	85,5737	1	85,5737	20,59	0,0008
AA	341,837	1	341,837	82,27	0,0000
AB	33,1835	1	33,1835	7,99	0,0165
bloques	2,84161	2	1,4208	0,34	0,7177

Error total	45,7081	11	4,15528		
Total (corr.)	1536,13	17			

R-cuadrada = 97,0245 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 95,4015 porciento

PRESS = 112,783

R-cuadrado (predicho) = 92,658 porciento

Error estándar del est. = 2,03845

Error absoluto medio = 1,29591

Estadístico Durbin-Watson = 2,53515 (P=0,6509)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,29581

Fenoles totales:

Atributos de Diseño Factorial Multinivel

Clase de diseño: Factorial Multinivel

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 1

Número de ejecuciones: 18

Grados de libertad para el error: 11

Aleatorizar: No

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
MExtr	-1,0	1,0	3	

Solv	-1,0	1,0	2	
-------------	------	-----	---	--

Análisis de Varianza para Fenoles

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: MExtr	1924,27	1	1924,27	1,46	0,2530
B: Solv	77111,5	1	77111,5	58,31	0,0000
AA	4607,88	1	4607,88	3,48	0,0888
AB	3,79463	1	3,79463	0,00	0,9582
bloques	46,9369	2	23,4684	0,02	0,9824
Error total	14546,0	11	1322,36		
Total (corr.)	98240,4	17			

R-cuadrada = 85,1935 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77,1172 porciento

PRESS = 36709,3

R-cuadrado (predicho) = 62,6331 porciento

Error estándar del est. = 36,3643

Error absoluto medio = 23,8542

Estadístico Durbin-Watson = 3,2842 (P=0,9823)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,660492

Actividad antioxidante:

Atributos de Diseño Factorial Multinivel

Clase de diseño: Factorial Multinivel

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 1

Número de ejecuciones: 18

Grados de libertad para el error: 11

Aleatorizar: No

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
MExtr	-1,0	1,0	3	
Solv	-1,0	1,0	2	

Análisis de Varianza para Antioxidantes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:MExtr	2,47303E6	1	2,47303E6	8,81	0,0128
B:Solvente	1,32014E7	1	1,32014E7	47,03	0,0000
AA	1,11366E6	1	1,11366E6	3,97	0,0718
AB	927186,	1	927186,	3,30	0,0965
bloques	462354,	2	231177,	0,82	0,4642
Error total	3,08778E6	11	280707,		
Total (corr.)	2,12654E7	17			

R-cuadrada = 85,4798 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77,5597 por ciento

PRESS = 7,89093E6

R-cuadrado (predicho) = 62,8931 por ciento

Error estándar del est. = 529,818

Error absoluto medio = 340,975

Estadístico Durbin-Watson = 2,86539 (P=0,8593)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,45058

**Apéndice E. Tablas resumen de la absorbancia medida en cada método
empleado para fenoles totales y DPPH**

Tabla E1

Absorbancia medida para antioxidantes en cada método empleado (parte 1)

Método de extracción	Absorbancia [nm]					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Etanol abs. 250 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm	Etanol abs. 250 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm	Etanol abs. 250 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm
Maceración dinámica	0,592	-----	0,637	-----	0,405	-----
Maceración asistida por ultrasonido	0,671	-----	0,589	-----	0,613	-----
Líquido presurizado	0,632	0,490	0,649	0,426	0,614	0,442

Tabla E2

Absorbancia medida para antioxidantes en cada método empleado (parte 2)

Método de extracción	Absorbancia [nm]		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
	Etanol-H ₂ O 125 ppm	Etanol-H ₂ O 125 ppm	Etanol-H ₂ O 125 ppm
Maceración dinámica	0,590	0,478	0,524
Maceración asistida por ultrasonido	0,512	0,384	0,523

Tabla E3

Absorbancia medida para fenoles totales en cada método empleado

Método de extracción	Absorbancia [nm]					
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Etanol abs. 500 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm	Etanol abs. 500 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm	Etanol abs. 500 ppm	Etanol-H ₂ O 250 ppm
Maceración dinámica	0,212	0,199	0,217	0,177	0,175	0,192
Maceración asistida por ultrasonido	0,177	0,257	0,195	0,302	0,197	0,286
Líquido presurizado	0,296	0,206	0,238	0,212	0,205	0,223

**Apéndice F. ANOVA Simple para el rendimiento de la extracción, fenoles totales
y actividad antioxidante.**

Rendimiento de la extracción

ANOVA Simple - Rendimiento extracción por MExtr.

Tabla ANOVA para Rendimiento extracción por Solvente

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	85,5737	1	85,5737	0,94	0,3457
Intra grupos	1450,56	16	90,66		
Total (Corr.)	1536,13	17			

**Tabla de Medias para Rendimiento extracción por Solvente con intervalos de
confianza del 95,0%**

Solvente	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
-1	9	12,966	3,17385	8,20839	17,7236
1	9	17,3268	3,17385	12,5692	22,0844
Total	18	15,1464			

**Tabla de Medias para Rendimiento extracción por MExtr con intervalos de
confianza del 95,0%**

MExtr	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
-1	6	21,316	1,36344	19,2611	23,3709
0	6	21,3093	1,36344	19,2544	23,3643
1	6	2,81383	1,36344	0,758905	4,86876

Total	18	15,1464			
--------------	----	---------	--	--	--

Comparaciones en parejas

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento extracción por Solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
-1	9	12,966	X
1	9	17,3268	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 1		-4,36078	9,51523

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento extracción por MExtr

Método: 95,0 porcentaje LSD

MExtr	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	6	2,81383	X
0	6	21,3093	X
-1	6	21,316	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0		0,00666667	4,10986
-1 - 1	*	18,5022	4,10986
0 - 1	*	18,4955	4,10986

* indica una diferencia significativa.

Fenoles totales

ANOVA Simple – Fenoles totales

Tabla ANOVA para Fenoles por Solvente

<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	77111,5	1	77111,5	58,39	0,0000
Intra grupos	21128,9	16	1320,55		
Total (Corr.)	98240,4	17			

Tabla de Medias para Rendimiento extracción por Solvente con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Solv</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
-1	9	114,35	12,1131	96,1924	132,508
1	9	245,254	12,1131	227,096	263,412
Total	18	179,802			

Tabla de Medias para Fenoles por MExtr con intervalos de confianza del 95,0%

<i>MExtr</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
-1	6	155,825	31,9215	107,714	203,936
0	6	202,429	31,9215	154,318	250,54
1	6	181,152	31,9215	133,041	229,263
Total	18	179,802			

Comparaciones en parejas

Pruebas de Múltiple Rangos para Fenoles por Solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

Solv	Casos	Media	Grupos Homogéneos
-1	9	114,35	X
1	9	245,254	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 – 1	*	-130,904	36,3153

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Fenoles por MExtr

Método: 95,0 porcentaje LSD

MExtr	Casos	Media	Grupos Homogéneos
-1	6	155,825	X
1	6	181,152	X
0	6	202,429	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 – 0		-46,6038	96,2219
-1 – 1		-25,3263	96,2219
0 – 1		21,2775	96,2219

* indica una diferencia significativa.

Actividad antioxidante

ANOVA Simple – Actividad antioxidantes

Tabla ANOVA para Antioxidantes por Solvente

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,32014E7	1	1,32014E7	26,19	0,0001
Intra grupos	8,064E6	16	504000,		
Total (Corr.)	2,12654E7	17			

Tabla de Medias para Antioxidantes por Solvente con intervalos de confianza del 95,0%

Solvente	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
-1	9	1478,99	236,643	1124,26	1833,72
1	9	3191,78	236,643	2837,05	3546,51
Total	18	2335,38			

Tabla de Medias para Antioxidantes por MExtr con intervalos de confianza del 95,0%

MExtr	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
-1	6	2613,47	443,205	1945,48	3281,45
0	6	2687,15	443,205	2019,17	3355,13
1	6	1705,53	443,205	1037,55	2373,52
Total	18	2335,38			

Comparaciones en parejas

Pruebas de Múltiple Rangos para Antioxidantes por Solvente

Método: 95,0 porcentaje LSD

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
-1	9	1478,99	X
1	9	3191,78	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 1	*	-1712,79	709,458

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Antioxidantes por MExtr

Método: 95,0 porcentaje LSD

MExtr	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	6	1705,53	X

-1	6	2613,47	X
0	6	2687,15	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0		-73,6833	1335,97
-1 - 1		907,933	1335,97
0 - 1		981,617	1335,97

* indica una diferencia significativa.