



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa*  
Loes.)**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Godoy Alvarez, Sharon Nathaly

DIRECTOR: Meneses Chamba, Miguel Angel, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2016



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-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>*

*Septiembre 2016*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor

Miguel Angel Meneses Chamba

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) realizado por: Sharon Nathaly Godoy Alvarez, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2016

f) \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Sharon Nathaly Godoy Alvarez declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.), de la Titulación de Ingeniería en alimentos, siendo Miguel Ángel Meneses Chamba director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “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”.

f) \_\_\_\_\_

Sharon Nathaly Godoy Alvarez

C.I: 1103325823

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar el presente trabajo a mí querido esposo Pedro José y a mi hijo Pedro Matías por ser mi fuente de inspiración y motivación. A mis padres por brindarme la oportunidad de mi estudio universitario y su ayuda desinteresada. Y a mi familia por confiar en mí, estando a mi lado durante todo este proceso.

**Sharon Godoy**

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero Agradecer a Dios por haberme dado la sabiduría y paciencia para poder culminar esta etapa de mi vida. A mi director de Tesis Miguel Meneses por ayudarme y brindarme su apoyo y conocimientos que me ayudaron tanto en mis años de estudio como en el presente trabajo de fin de titulación. A mi esposo, padres y hermanos ya que sin ellos esto logro no hubiera sido posible.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. CAPÍTULO I.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1 Guayusa ( <i>Ilex guayusa</i> Loes.).....	6
1.1.1 Usos de la guayusa. ....	7
1.1.2 Composición química. ....	7
1.2 Antioxidantes.....	8
1.2.1 Determinación del contenido de fenoles totales.....	8
1.2.2 Método ABTS. ....	8
1.2.3 Método DPPH.....	9
1.3 Obtención de los extractos. ....	9
1.3.1 Extracción sólido-líquido. ....	9
1.3.2 Otros métodos de extracción. ....	11
1.4 Atomización. ....	12
1.4.1 Proceso de secado. ....	12
1.4.2 Parámetros para la atomización .....	14
2. CAPÍTULO II.....	6
OBJETIVOS .....	6
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3. CAPÍTULO III.....	18

MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Recolección del material vegetal.....	19
3.2 Tratamiento Post cosecha.....	19
3.3 Determinación de la humedad de la planta.....	20
3.4 Obtención de los extractos.....	21
3.4.1 Extracción sólido-líquido.....	21
3.4.2 Atomización de los extractos.....	22
3.5 Contenido de fenoles totales.....	23
3.5.1 Curva de calibración para el contenido de fenoles totales.....	23
3.5.2 Procedimiento para lectura de muestras de fenoles totales.....	24
3.6 Determinación de la actividad antioxidante.....	24
3.6.1 Método ABTS.....	24
3.6.2 Método DPPH.....	25
3.7 Análisis Estadístico.....	26
4. CAPÍTULO III.....	27
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
4.1 Humedad.....	28
4.2 Rendimiento.....	28
4.3 Cuantificación de Fenoles totales.....	29
4.4 Método ABTS.....	32
4.5 Método DPPH.....	34
4.6 Atomización.....	36
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41
ANEXOS.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Ilex guayusa</i> Loes. ....	6
<b>Figura 2.</b> Pasos de la maceración .....	11
<b>Figura 3.</b> Atomización del extracto. ....	13
<b>Figura 4.</b> Principio de funcionamiento de aire de secado. ....	13
<b>Figura 5.</b> Principios de funcionamiento de la alimentación y dispersión de las muestras. ....	14
<b>Figura 6.</b> Lugar de recolección de las hojas de guayusa .....	19
<b>Figura 7.</b> Tratamiento de hojas de guayusa deshidratadas .....	20
<b>Figura 8.</b> Hojas de Guayusa Frescas .....	20
<b>Figura 9.</b> Determinación de la Humedad .....	21
<b>Figura 10.</b> Obtención de los extractos. ....	22
<b>Figura 11.</b> Atomizador .....	23
<b>Figura 12.</b> Resultados de los extractos secados por atomización y del extracto macerado (inicial) .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de funcionamiento del atomizador Büchi. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento de las hojas de guayusa. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Contenido de fenoles totales en las hojas de guayusa. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Capacidad Antioxidante por el método ABTS en las hojas de guayusa. ....	33
<b>Tabla 5.</b> Capacidad Antioxidante por el método DPPH en las hojas de guayusa.....	35
<b>Tabla 6.</b> Rendimientos del Secado por Atomización en las hojas de guayusa.....	36
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en los extractos Atomizados.....	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Metodología de la atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa..	46
<b>Anexo 2.</b> Diagrama para lectura de muestras de Fenoles totales y curva de calibración.	47
<b>Anexo 3.</b> Diagrama para lectura de muestras para ABTS y curva de calibración. ....	50
<b>Anexo 4.</b> Diagrama para lectura de muestras para DPPH y curva de calibración. ....	51
<b>Anexo 5.</b> Análisis Estadístico para Rendimiento de los extractos.....	54
<b>Anexo 6.</b> Análisis Estadístico para Fenoles Totales. ....	59
<b>Anexo 7.</b> Análisis Estadístico para ABTS. ....	64
<b>Anexo 8.</b> Análisis Estadístico para DPPH. ....	69
<b>Anexo 9.</b> Análisis Estadístico de Rendimiento por Atomización. ....	74
<b>Anexo 10.</b> Análisis Estadístico para Fenoles Totales, ABTS y DPPH de los extractos atomizados. ....	75
<b>Anexo 11.</b> Análisis Estadístico Extracto Atomizado vs. Tratamiento inicial.....	77

## RESUMEN

Los antioxidantes de las hojas de guayusa fueron extraídos mediante maceración dinámica, hasta obtener extractos. Los extractos fueron sometidos a un proceso de atomización. La actividad antioxidante fue evaluada mediante los ensayos de ABTS, DPPH y el contenido de fenoles totales. Se evaluaron dos tipos de solventes: etanol y hexano. Además de las hojas de guayusa con diferentes porcentajes de humedad:  $68.52 \pm 0.55\%$  (hojas frescas) y  $8.91 \pm 0.06\%$  (hojas deshidratadas). Los tiempos de maceración fueron de: 3, 6, 12 y 24 horas. Siendo el etanol a un tiempo de 12 horas de maceración con hojas frescas las mejores condiciones de extracción. El porcentaje de rendimiento fue de  $5.16 \pm 0.62\%$ ; contenido de fenoles totales con un valor de  $39.37 \pm 7.71$  mg Ac. Galico/100g planta y una actividad antioxidante de  $6.07 \pm 0.64$  mg ET/100g planta para el método de ABTS y  $14.71 \pm 5.41$  mg ET/100g planta para el método de DPPH. Luego de la atomización se comprobó que el contenido de fenoles totales disminuyó 4 veces aproximadamente. Sin embargo, la capacidad antioxidante aumentó 2 veces aproximadamente.

**PALABRAS CLAVES:** *Ilex guayusa* Loes, fenoles totales, actividad antioxidante, atomización.

## ABSTRACT

The antioxidants of guayusa leaves were extracted by dynamic maceration, to obtain extracts. The extracts were subjected to an atomization process. The antioxidant activity was evaluated by testing ABTS, DPPH and total phenol content. Two types of solvents were evaluated: ethanol and hexane. Besides guayusa leaves with different percentages of moisture:  $68.52 \pm 0.55\%$  (fresh leaves) and  $8.91 \pm 0.06\%$  (dried leaves). Maceration times were: 3, 6, 12 and 24 hours. The ethanol with a time of 12-hour maceration with the fresh leaves were the best extraction conditions. The percent yield was  $5.16 \pm 0.62\%$ ; total phenol content with a value of  $39.37 \pm 7.71$  mg Ac. Gallic / 100g plant and an antioxidant activity  $6.07 \pm 0.64$  mg ET / 100g plant for ABTS method and  $14.71 \pm 5.41$  mg ET / 100g plant for DPPH method. After atomization was found that the content of total phenols decreased approximately 4 times. However, the antioxidant capacity increased about 2 times.

**KEYWORDS:** *Ilex guayusa* Loes, total phenols, antioxidant activity, spray dry.

## INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la atomización de los antioxidantes de guayusa (*Ilex guayusa* Loes). De la provincia de Zamora. Se desarrolla en 6 capítulos, el primer capítulo titulado Revisión Bibliográfica trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer los objetivos para el siguiente trabajo, en el capítulo 3 se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación, en el capítulo 4 se exponen y se analizan los resultados, en el capítulo 5 se detallan las conclusiones y en el capítulo 6 las recomendaciones.

El estudio de los antioxidantes ha incrementado el interés, debido a que publicaciones demuestran que el consumo frecuente de antioxidantes, especialmente los flavonoides, tienen capacidad de captar los radicales libres causantes del estrés oxidativo. Los métodos espectrofotométricos más usados para determinar la capacidad antioxidante incluyen: capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS, del radical DPPH y Fenoles totales. Estos alimentos que contienen sustancias con acción fisiológica, aparte de los componentes nutritivos, que proveen beneficios para la salud son los denominados alimentos funcionales (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002).

Al interés comercial se unen también el científico y el antropológico, sobre todo cuando se trata de recuperar una de las plantas sagradas de las nacionalidades indígenas que habitan en la región amazónica ecuatoriana conocida con el nombre vernáculo de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) y que es usada tradicionalmente por los Achuar y mestizos en forma de infusión. Es fundamental aclarar que el conocimiento fitoquímico de la guayusa es limitado y la literatura es escasa, por la cual es necesaria una investigación científica con el fin de evaluar su actividad biológica y los posibles usos comerciales. Actualmente, los pocos datos fitoquímicos de esta planta solo revelan datos de su contenido en cafeína, así como la presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos. Por lo tanto, aún no se pueden explicar todas las propiedades curativas que la tradición popular le atribuye (Radice & Vidari, 2010).

La atomización se empleó para obtener extractos de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) evaluando su actividad antioxidante, así como, de su contenido de fenoles totales, para que de esta manera pueda ser añadido como producto inocuo en otros alimentos en forma sólida. Se

obtuvo extractos acuosos luego de realizar una maceración dinámica con dos tipos de solventes: etanol y hexano; de los cuales se cuantificó la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales.

Para lo cual se inició con la recolección del material vegetal, al cual luego de un tratamiento post cosecha se redujo el contenido de humedad a la mitad de las hojas recolectadas. Mediante maceración dinámica se realizaron los extractos con etanol y hexano. A los extractos obtenidos se determinaron la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales. Posteriormente se atomizaron los extractos de los cuales se realizaron la cuantificación de la actividad antioxidante como el contenido de fenoles totales. Para comprobar como variaban los resultados de los extractos macerados frente al proceso de atomización.

**1. CAPÍTULO I  
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.)

El género *Ilex guayusa* Loes presente en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, se calcula que posee más de 500 especies (Shemluck, 1979). En el Ecuador, de acuerdo a los registros del Herbario de Loja, la guayusa está presente en las provincias de Sucumbios, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe; sin embargo, también registran individuos en las provincias de Pichincha y Tungurahua (Radice & Vidari, 2010). *Ilex guayusa* Loes. pertenece a la familia Aquifoliaceae y es reconocida con el nombre castellano de guayusa en la mayoría de localidades de Ecuador. Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, donde es silvestre, pero también está presente en ciertos lugares subtropicales de la región andina en estado cultivado. En general, los individuos de esta especie alcanzan un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, poseen un diámetro a la altura del pecho de 50-80 cm, tienen una copa irregular y presentan un follaje denso. Las ramas son extendidas y flexibles. Las hojas son coriáceas. El fruto es una baya globosa de casi 1 cm de ancho y verde. La flor posee una corola blanco verdosa con pétalos obtusos, estambres en igual número que los pétalos y anteras oblongas (Jørgensen, León-Yáñez, & Garden, 1999).

En la Figura 1. Se muestra el árbol de guayusa.



**Figura 1.** *Ilex guayusa* Loes.

**Fuente:** La autora.

### **1.1.1 Usos de la guayusa.**

De los cuatro géneros de la familia Aquifoliceae, el género *Ilex* es el de mayor importancia económica, ya que un gran número de especies se emplean como plantas ornamentales y medicinales (Radice & Vidari, 2010).

La forma más común de preparación de los recursos entre los Achuar consiste en preparar infusiones mediante ebullición de las partes de las plantas en una gran cantidad de agua hasta que ésta se reduzca considerablemente y que adquiera un teñido por los fitoquímicos de las plantas. En algunos casos se añade azúcar de caña a las decocciones para preparar jarabes medicinales (Giovannini, 2015). Se la utiliza para la gastritis, diarrea, sustituto del café, estimulante, relajante e incrementa la fertilidad de la mujer. La guayusa tiene una larga tradición de ser un afrodisiaco (Patiño, 1968; Shemluck, 1979).

### **1.1.2 Composición química.**

Los datos fitoquímicos de la guayusa revelan su contenido de cafeína, así como la presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos (Radice & Vidari, 2010). Las hojas contienen cafeína en cantidades variables, superiores a las del café y té. Los compuestos identificados contienen en su estructura un gran número de grupos hidroxilos, flavonoides, alcaloides y triterpenos (Usca & Ramiro, 2013). Contiene además teobromina y cantidades menores de teofilina y otras xantinas, esteroides, terpenoides, taninos, catequinas, compuestos reductores, saponinas y quinonas. Los resultados no detallan la cantidad en sus estudios solo expresan su presencia (Adas, Elizabeth, Arias Arias, & Manzano Santana, 2013).

Estudios anteriores demuestran la capacidad antioxidante secundaria (interruptora) de extractos de la guayusa a través de los métodos DPPH y el método ABTS (Burneo, 2009). Según Ruiz y Roque en un estudio realizado mediante una extracción en metanol y solución hidroalcohólica en hojas de guayusa encontraron compuestos fenólicos (Ruiz & Roque, 2009).

## **1.2 Antioxidantes.**

Un antioxidante se define como aquella molécula que protege a un blanco biológico contra el daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las funciones que puede desempeñar son de prevención (evitar formación de especies reactivas de oxígeno como hidroperóxidos o  $H_2O_2$ ), intersección (desactivación de radicales mediante el secuestro de iones metálicos o captura de radicales libres) o de reparación (remediar daño una vez sucedido) (Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001).

### **1.2.1 Determinación del contenido de fenoles totales.**

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales (Swain & Hillis, 1959). Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por la que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Huang, Ou, & Prior, 2005).

### **1.2.2 Método ABTS.**

El método ABTS también denominado TEAC (Capacidad del Antioxidante Equivalente a Trolox) por sus siglas en inglés, evalúa la capacidad de depuración del radical monocatión preformado ABTS (el oxidante). El radical ABTS es generado por oxidación con persulfato a partir del ácido 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS). El ABTS y el persulfato de potasio reaccionan estequiométricamente en una relación 1:0.5. La proporción de la decoloración como porcentaje de inhibición del ABTS, es determinada en función de la concentración o del tiempo y se la calcula relacionándola con la actividad del estándar (TROLOX). Bajo las mismas condiciones. El método ABTS es lo suficientemente versátil para ser aplicado tanto a compuesto soluble en agua y antioxidantes solubles en lípidos, compuestos puros y extractos de alimentos (Arnao, Cano, & Acosta, 2001; Litescu, Eremia, & Radu, 2010).

### **1.2.3 Método DPPH**

La capacidad de un compuesto como depurador de radicales libres puede ser registrada espectrofotométricamente mediante el método de DPPH. Este método se basa 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 válido para evaluar la actividad de eliminación de compuestos antioxidantes, debido a que el radical es una molécula estable. Los resultados son altamente reproducibles y comparables con otros métodos de detección de antioxidantes como ABTS. (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Litescu et al., 2010).

### **1.3 Obtención de los extractos.**

Extracción, como es utilizado el término en la industria farmacéutica y de alimentos, implica la separación de principios activos de tejidos vegetales o animales a partir de los componentes inactivos o inertes usando solventes selectivos. Los productos obtenidos a partir de plantas son mezclas impuras, semisólidas o polvos. Los extractos incluyen clases de preparaciones conocidas como decocciones, infusiones, extractos fluidos o en polvo, y tinturas (Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008).

#### **1.3.1 Extracción sólido-líquido.**

El principio de la extracción sólido-líquido es cuando un material sólido entra en contacto con un solvente líquido, los componentes solubles en el material sólido son transferidos al solvente. Por lo tanto, la extracción se da por la transferencia de masa de los compuestos bioactivos solubles en el solvente. Esto tiene lugar en un gradiente de concentración. La proporción de transferencia de masa disminuye mientras la concentración de compuestos bioactivos aumenta en el solvente, hasta que se alcanza el equilibrio, es decir, la concentración de compuestos en

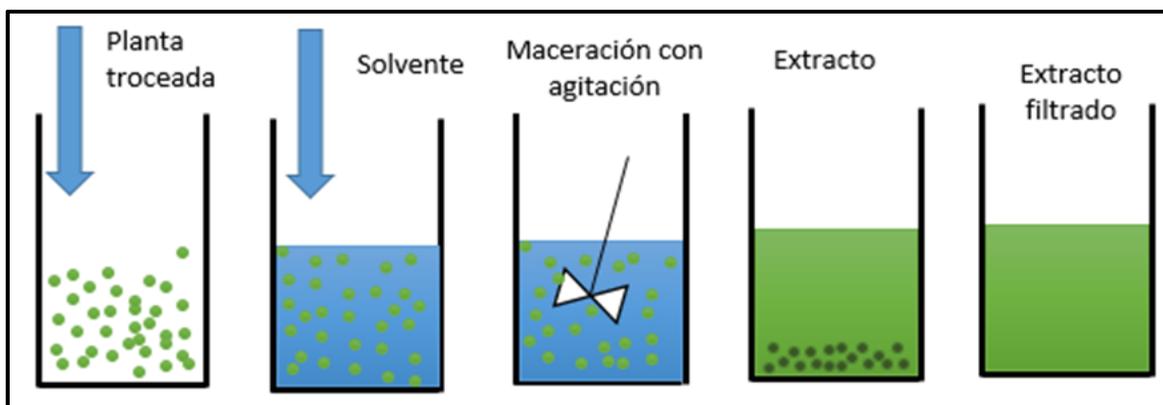
la planta y en el solvente son los mismos. Por lo tanto, ya no habrá una transferencia de masa desde el material vegetal (Cussler, 2009; Dean, 2010).

Dado que la transferencia de masa de los compuestos solubles también depende de la solubilidad en el solvente, proporcionar una fuente de calor puede mejorar la transferencia de masa. Por otra parte, si el solvente que está en equilibrio con el material vegetal se sustituye con solvente fresco, se cambia el gradiente de concentración (Dean, 2010).

Los procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración son: la maceración y la maceración dinámica (Sharapin, 2000).

El proceso clásico de maceración consiste en dejar la planta en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional. Este proceso, también conocido como maceración simple o estática, es sumamente lento. Para abreviar el tiempo de operación, la planta y el solvente deben mantenerse en movimiento constante. Este procedimiento es conocido como maceración dinámica. Tanto la maceración simple como la maceración dinámica pueden ser ejecutadas a una temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas. En este último caso el procedimiento es conocido como digestión (Sharapin, 2000).

Por ejemplo, el material vegetal, ya sea en su totalidad, troceada o en polvo se coloca en un frasco cerrado con el solvente y se dejan reposar a una temperatura ambiente durante un período de tiempo con agitación frecuente hasta que la materia soluble se ha disuelto. La mezcla luego se cuela, se presiona el orujo (el material sólido húmedo), y los líquidos combinados se clarifican por filtración o decantación después de reposar. En la figura 2. Se detalla el proceso de maceración. (Handa et al., 2008).



**Figura 2.** Pasos de la maceración

**Fuente:** Handa et al., (2008).

**Elaboración:** La autora

### 1.3.2 Otros métodos de extracción.

Los procesos que agotan completamente el material vegetal son: la percolación, la re percolación y la extracción en contra corriente (Sharapin, 2000).

- La percolación.

La percolación consiste en hacer pasar el solvente a través del material vegetal, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva del material vegetal con el solvente siempre renovado (Sharapin, 2000).

- La re percolación.

La re percolación consiste en hacer recircular el mismo solvente a través del material vegetal, por intermedio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto con el solvente y aumenta la eficiencia del proceso. En la re percolación se utiliza una batería de percoladores y los extractos menos ricos en sustancias extraíbles son utilizados para extraer nuevas porciones de las plantas (Sharapin, 2000).

- Extracción en contracorriente.

En el proceso de extracción en contracorriente, el solvente fluye en sentido contrario a la dirección con que fluye el material vegetal. Existen tres variantes en este proceso: continuo absoluto, continuo relativo y discontinuo absoluto. Conceptualmente, en el proceso continuo

absoluto tanto el material vegetal como el solvente se encuentran en un único recipiente, aunque ambos se mueven en sentido contrario. En el continuo relativo, solamente el solvente está en movimiento, mientras el material vegetal permanece estático. En el proceso discontinuo absoluto el material vegetal, al igual que el solvente, se mueven, por lo general el material vegetal está colocada en un batería de percoladores. En el proceso continuo absoluto, el equipo más utilizado es el que dispone de un tornillo sinfín. La extracción en contracorriente se recomienda para procesar grandes cantidades de material vegetal (Sharapin, 2000).

#### **1.4 Atomización.**

El método de secado por atomización ha sido ampliamente aplicado en la obtención de extractos secos con características técnicas mejoradas y aumento de la concentración del componente con actividad biológica. Los extractos secos preparados adecuadamente, presentan numerosas ventajas sobre fluidos de la forma convencionales incluyendo una mayor estabilidad y concentración de compuestos bioactivos, facilidad de estandarización y la calidad del producto final aumenta (Runha, Cordeiro, Pereira, Vilegas, & Oliveira, 2001).

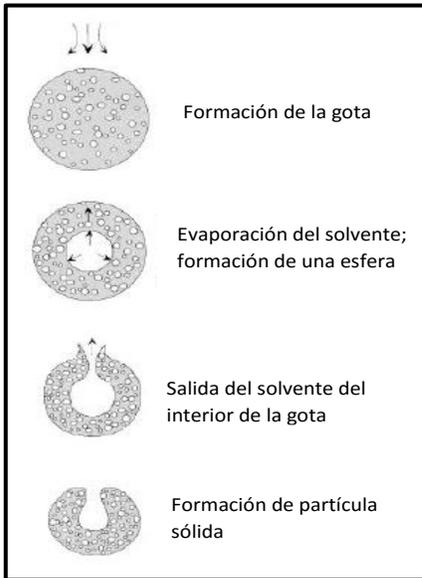
Las propiedades fisicoquímicas de los productos producidos mediante secado por pulverización están influenciadas por factores relacionados con el proceso, el material de entrada, formulación y equipo. El principal objetivo de la desecación es la eliminación de agua, responsable de proporcionar un medio de reacción adecuado para las reacciones químicas, los fenómenos físicos y el crecimiento microbiano (Oliveira & Petrovick, 2010).

##### **1.4.1 Proceso de secado.**

El proceso de secado por atomización consta de tres etapas básicas: en la primera fase, el líquido se dispersa en forma de gotitas, produciendo una gran área superficial; en la segunda fase, el contacto con una corriente de aire caliente se produce con transferencia de calor; en la tercera etapa tiene lugar la evaporación del disolvente y la formación de partícula sólida.

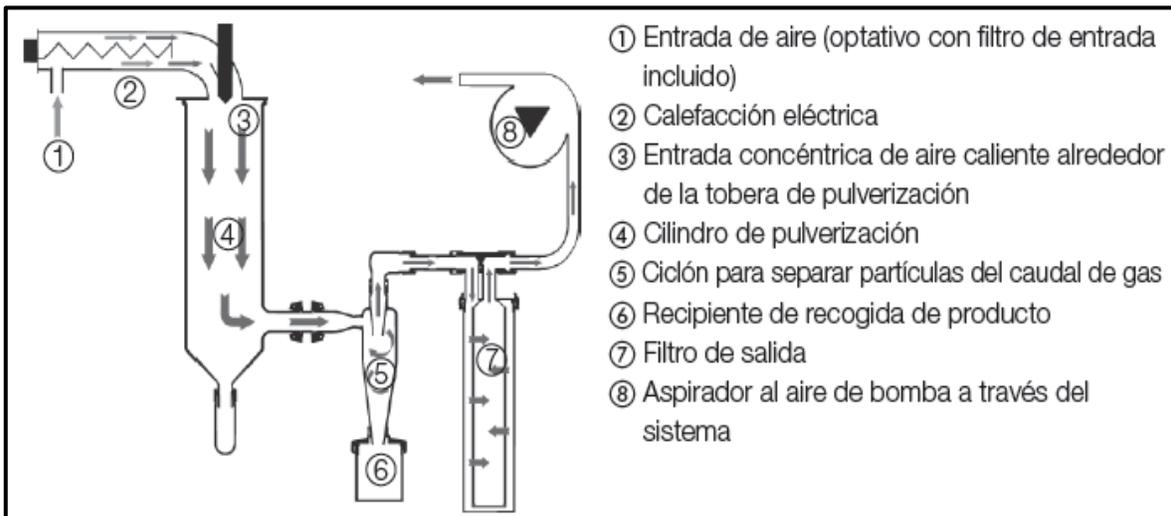
Con la transferencia de calor desde el aire caliente a la superficie de las gotitas el líquido se evapora rápidamente. Las partículas solidificadas por lo general tienen el mismo tamaño. La forma de la gotita que se originó en el último paso es transportada por una corriente de aire. La superficie de la gotita de la evaporación conduce a la formación de una capa exterior de

material seco. En la figura 3, se muestra gráficamente el proceso de secado por atomización (Oliveira & Petrovick, 2010).

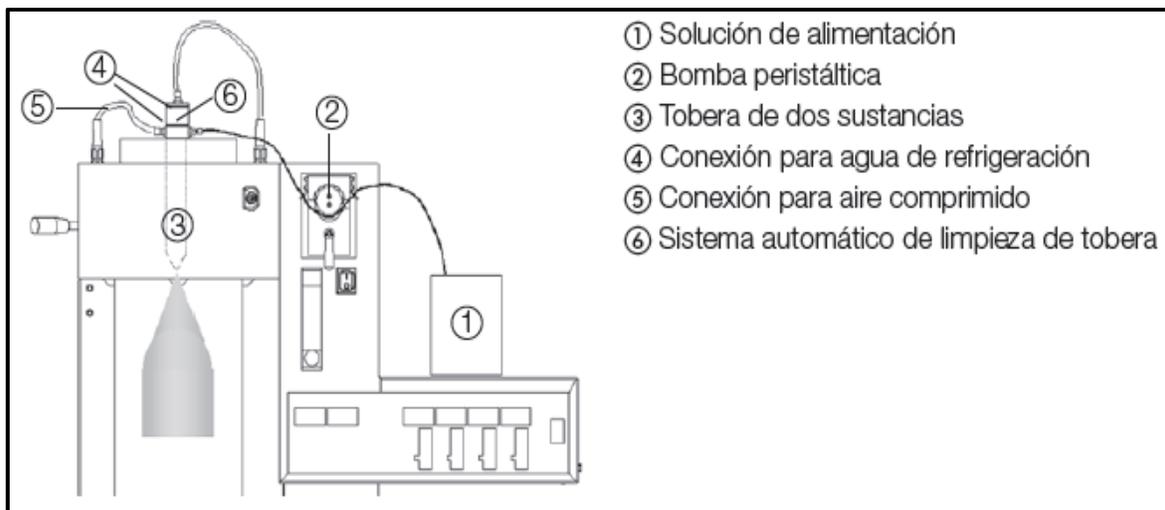


**Figura 3.** Atomización del extracto.  
Fuente: Oliveira & Petrovick, (2010).

En las figuras 4 y 5, se presenta un diagrama del atomizador mini spray drier de la marca Büchi Labortechnik. Respectivamente muestra el principio de funcionamiento y el sistema de alimentación y dispersión de las muestras (Büchi Labortechnik, 2002).



**Figura 4.** Principio de funcionamiento de aire de secado.  
Fuente: Büchi Labortechnik, (2002).



**Figura 5.** Principios de funcionamiento de la alimentación y dispersión de las muestras.  
**Fuente:** Büchi Labortechnik, (2002).

#### 1.4.2 Parámetros para la atomización

La calidad del producto atomizado se ve afectada por las condiciones operativas del proceso. Las variables, que se exponen en la tabla 1, deben ser controladas con el fin de obtener un rendimiento adecuado, contenido de humedad y, estabilidad química, lo que minimiza la adhesión de partículas en la cámara de secado y que mantenga las características tecnológicas. Las propiedades del producto se determinan generalmente por factores relacionados con las características del material de entrada y el procesamiento, es decir, el equipo y los parámetros de funcionamiento (Oliveira & Petrovick, 2010). En la tabla 1. Se muestra las variables que se pueden tomar en cuenta en el equipo utilizado para mejorar el funcionamiento (Büchi Labortechnik, 2002).

**Tabla 1.** Parámetros de funcionamiento del atomizador Büchi.

Parámetro / Dependencia	Velocidad del aspirador	Humedad del aire	Temperatura interna	Flujo de aire del atomizador	Alimentación	Solvente en ves de agua	Concentración
Temperatura de salida	menor temperatura basada en la energía interna	más energía almacenada en humedad	proporción directa	más aire frío por calentar	mas solvente por evaporar	menos calor de la energía del solvente	menos agua a evaporar
Tamaño de partícula	-	-	-	más energía por dispersión del fluido	más fluido por dispersarse	menor tensión superficial	mas producto restante
Humedad final del producto	menor presión parcial de agua evaporada	mayor presión parcial del aire de secado	menor humedad relativa del aire	-	más agua produce una mayor presión parcial	una alimentación sin agua produce un	menos agua evaporada, menor presión parcial
Rendimiento	mejor velocidad de separación en el ciclón	más humedad puede producir productos pegajosos	producto seco previene aglomeración	-	depende de la aplicación	comportamiento no higroscopico ayuda a un mejor secado	partículas grandes ayuda a una mayor separación

**Fuente:** Büchi Labortechnik, (2002).

El secado por atomización es un método en el que el resultado depende en gran medida de las propiedades del producto. Por lo tanto, los ajustes del instrumento, es decir, la temperatura de entrada, velocidad de alimentación, flujo de aire y la velocidad de aspiración están en un sistema combinado que influyen en los parámetros del producto:

- Temperatura de salida
- Humedad final del producto
- Tamaño de partícula
- Rendimiento

**2. CAPÍTULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo general**

- Facilitar la transformación industrial de ingredientes bioactivos inocuos, como los antioxidantes de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.).

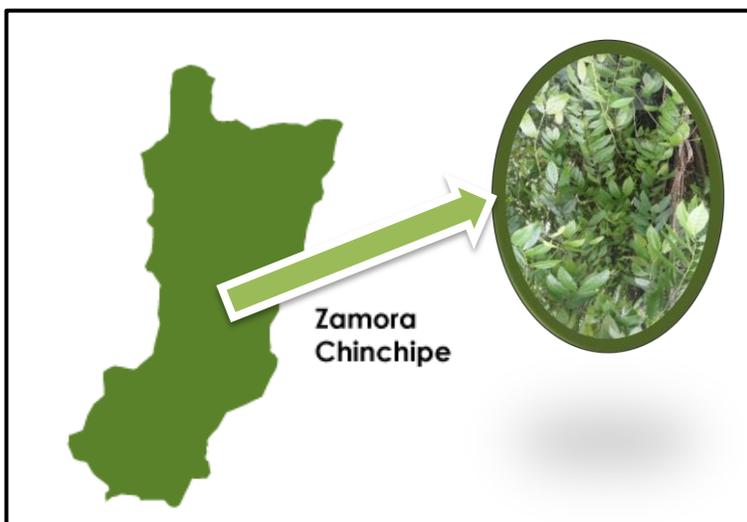
## **2.2 Objetivos específicos**

- Extraer con etanol y hexano compuestos bioactivos de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.).
- Atomizar los compuestos bioactivos de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.).
- Cuantificar la capacidad antioxidante en extractos de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.).
- Cuantificar el contenido de fenoles totales en extractos de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.).

**3. CAPÍTULO III  
MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Recolección del material vegetal.

Se trabajó con hojas de Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) (ver figura 6) recolectadas en la provincia de Zamora Chinchipe en la ciudad de Zamora con coordenadas 78° 54' 0,46" W; 4° 1' 47,31" S, y altitud 920 m.s.n.m. Recolectada por dos ocasiones las fechas: 30/11/2014 y 30/03/2015.



**Figura 6.** Lugar de recolección de las hojas de guayusa  
Elaboración: La autora.

### 3.2 Tratamiento Post cosecha.

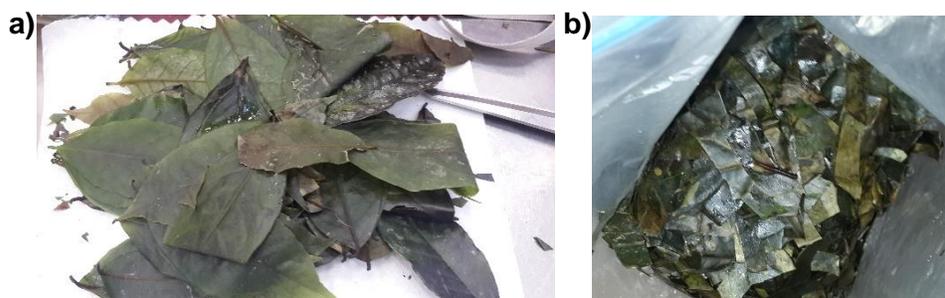
El secado del material vegetal se realizó a 37°C, durante 3 días en un secadero de convección forzada, hasta tener un porcentaje de humedad menor al 10%. En el caso de las hojas frescas se analizó de igual manera el porcentaje de humedad. En ambos casos tanto en hojas de guayusa deshidratadas como frescas se redujo el tamaño de las hojas. En el caso de las hojas deshidratadas se utilizó un triturador (ver figura 7) y para las hojas de guayusa fresca se redujo el tamaño de partícula mediante trituración manual (ver figura 8).



**Figura 7.** Tratamiento de hojas de guayusa deshidratadas

**a)** Hojas de guayusa en el secadero. **b)** hojas de guayusa después del secado durante 3 días a 37°C. **c)** Reducción de tamaño mediante trituración.

**Fuente:** La autora.



**Figura 8.** Hojas de Guayusa Frescas

**a)** Hojas de guayusa frescas. **b)** Reducción de tamaño mediante trituración manual.

**Fuente:** La autora.

### 3.3 Determinación de la humedad de la planta.

El análisis de humedad en la etapa de pre tratamiento se realizó mediante el método de la AOAC 934.06. Se pesó 1g de muestra en una cápsula previamente secada y se llevó a una estufa a 105°C ± 1°C. Las muestras se enfriaron por 30 minutos en un desecador y se las pesó continuamente cada 5 horas hasta alcanzar un peso constante (ver figura 9). Los resultados se obtuvieron por pérdida de peso y se expresaron como la media ± desviación estándar de dos réplicas experimentales.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{P_{inicial}} * 100 \quad \text{(Ec. 1)}$$



**Figura 9.** Determinación de la Humedad  
**Fuente:** La autora.

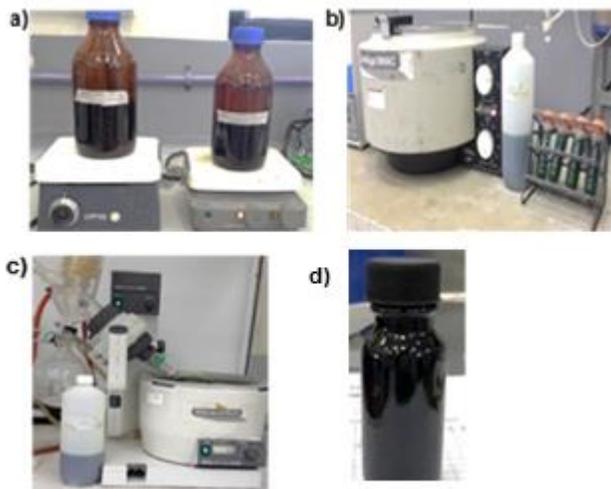
### 3.4 Obtención de los extractos.

#### 3.4.1 Extracción sólido-líquido.

Se realizó mediante maceración dinámica. En una relación hojas – solventes de 1:10, para lo cual a 100 gramos de muestra se le añadió 1000 ml de solvente sobre un plato agitador a 200 rpm. Se estudió dos tipos de solventes: etanol, y hexano. Se evaluó el efecto del tiempo de extracción: 3, 6, 12, y 24 horas a temperatura ambiente (24-26°C). Luego se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante 1 y la fase sólida pasó a una segunda extracción con 1000 ml de solvente, se colocó en el agitador a 200 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos adicionales, así mismo se centrifugó y se recogió el sobrenadante 2. Se mezclaron los sobrenadantes 1 y 2, y se llevó al rotaevaporador a 45 °C con presión reducida para eliminar el solvente a condiciones de vacío. Consecutivamente los extractos crudos fueron almacenados a -4°C (ver figura 10). Para los extractos que fueron atomizados no se eliminó completamente el solvente, se ajustó la concentración antes del secado.

Para escoger el mejor tratamiento para la atomización, fue en base al rendimiento en peso, el contenido en fenoles totales y en la capacidad antioxidante entre los tratamientos que fueron evaluados a diferentes tiempos de extracción, tipo de solvente y en base a la humedad en las hojas de Guayusa.

$$\%R = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$



**Figura 10.** Obtención de los extractos.

**a)** Extracción mediante maceración dinámica. **b)** Centrifugación de Extractos. **c)** Rotaevaporación de los extractos. **d)** Frasco de almacenamiento.

**Fuente:** La autora.

### 3.4.2 Atomización de los extractos.

Las pruebas se realizaron en un Miny Spray Dryer marca Büchi modelo B-290 (ver figura 11) para secado por pulverización de soluciones acuosas y orgánicas. Además de Inert Loop marca Büchi modelo B-295 como recuperador de solventes orgánicos que se adapta en el mismo equipo de atomización y que permite trabajar sin riesgo con los solventes. Las condiciones de trabajo fueron a una temperatura de 85°C y 90 °C, y un flujo de alimentación a 4.5 ml/min y 7.5 ml/min de potencia de bomba. El flujo de medio de secado se trabajó a 439 litros/hora, utilizando Nitrógeno. Para la atomización, los extractos tuvieron una concentración de 30 mg/ml. Cada ensayo se realizó por duplicado. Para evaluar el mejoramiento de atomización se compararon entre sí los resultados de rendimiento de recuperación, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.



**Figura 11. Atomizador**

**Fuente:** La autora.

### **3.5 Contenido de fenoles totales.**

El método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado por Swain y Hillis (1959) y modificado por Thaipong et al. (2006) se siguió para la determinación del contenido de polifenoles totales. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto en base húmeda (mg EAG/ g extracto BH).

#### **3.5.1 Curva de calibración para el contenido de fenoles totales.**

Para realizar la curva estándar de calibración de ácido gálico se pesaron 50 mg de ácido gálico y se aforó a 25 ml de metanol. Se tomaron alícuotas entre 0.50 a 500  $\mu$ L; se aforó a 10 ml con metanol. Para realizar la lectura se sigue el mismo procedimiento para lectura de muestras de fenoles totales. Además, se prepararon dos soluciones: Folin 0.25N para el cual se pesó 3.125 ml de folin a 25 ml con agua destilada; y para preparar el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1N se pesó 2.64 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se aforó a 25 ml con agua destilada.

### **3.5.2 Procedimiento para lectura de muestras de fenoles totales.**

Para la lectura de la curva, así mismo, como para las lecturas de las muestras se siguió el siguiente procedimiento. En el Anexo 1. Se muestra el diagrama de lectura de muestras para fenoles totales, y la curva de calibración. Se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de cada alícuota y de cada muestra. Se agregaron 2400  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 150  $\mu\text{L}$  de Folin 0.25N preparado anteriormente. Luego se mezclaron durante 5 minutos y se dejó reaccionar por 3 minutos. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1N. Finalmente se incubó por 2 horas protegido de la luz y luego se leyó a 725 nm en un espectrofotómetro UV visible.

### **3.6 Determinación de la actividad antioxidante**

Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos espectrofotométricos: el método ABTS y el método DPPH.

#### **3.6.1 Método ABTS**

La reducción colorimétrica basada en los descrito por Arnao et al. (2001) y ajustada por Thaipong et al. (2006) se realizó. Se utilizó como estándar para las curvas de calibración Trolox y se monitoreo las absorbancias a 734 nm mediante el empleo de un espectrofotómetro UV visible. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mg ET / g extracto).

##### **3.6.1.1 Solución de trabajo para ABTS.**

Para la elaboración de la solución de trabajo ABTS se pesaron 101,5 mg de ABTS y se aforó a 25 ml con agua destilada, por otro lado, se pesaron 17.57 mg de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y se aforó a 25 ml con agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y se dejaron reaccionar por 12 horas en la oscuridad. Posteriormente se tomó 1 ml de la solución de trabajo y se adicionaron 60 ml de Metanol. Se midió la absorbancia a 734 nm y se ajustó hasta obtener una lectura de  $1.1 \pm 0.02$ .

### **3.6.1.2 Curva Estándar de TROLOX para ABTS.**

Para realizar la curva estándar de Trolox para ABTS se pesaron 12.5 mg de Trolox y se aforó a 50 ml de metanol. Se tomaron alícuotas entre 0.4 a 14 mL; se aforó a 25 ml con metanol. Se siguió el procedimiento para lectura de muestras.

### **3.6.1.3 Procedimiento para lectura de muestras de ABTS.**

Para la lectura de la curva, así mismo, como para las lecturas de las muestras se siguió el siguiente procedimiento. En el Anexo 2. Se muestra el diagrama de lectura de muestras para ABTS y la curva de calibración. Se tomó 150  $\mu$ L de cada alícuota y de cada muestra. Se agregó 2850  $\mu$ L de solución de trabajo preparado anteriormente. Se dejó reaccionar por 2 horas protegido de la luz y luego se leyó a 734 nm en un espectrofotómetro UV visible.

## **3.6.2 Método DPPH**

La técnica de Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones de Thaipong et al. (2006) se realizó para medir la habilidad de los antioxidantes para capturar el radical DPPH. Se utilizó como estándar Trolox y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mg ET/g extracto).

### **3.6.2.1 Solución de trabajo para DPPH.**

Para la elaboración de la solución de trabajo DPPH se pesaron 24 mg de DPPH y se aforó a 100 ml con metanol. Posteriormente se tomó 10 ml y se adicionaron 45 ml de Metanol. Se midió la absorbancia a 515 nm y se ajustó hasta obtener una lectura de  $1.1 \pm 0.02$ .

### **3.6.2.2 Curva Estándar de TROLOX para DPPH.**

Para realizar la curva estándar de Trolox para DPPH se pesaron 12,5 mg de Trolox y se aforó a 50 ml de metanol. Se tomaron alícuotas entre 0.4 a 14 mL; se aforó a 25 ml con metanol. Se siguió el procedimiento para lectura de muestras.

### **3.6.2.3 Procedimiento para lectura de muestras de DPPH.**

Para la lectura de la curva, así mismo, como para las lecturas de las muestras se siguió el siguiente procedimiento. En el Anexo 3. Se muestra el diagrama de lectura de muestras para DPPH y la curva de calibración. Se tomaron 150  $\mu$ L de cada alícuota y de cada muestra. Se agregaron 2850  $\mu$ L de solución de trabajo preparado anteriormente. Se dejó reaccionar por 24 horas protegido de la luz y luego se leyó a 515 nm en un espectrofotómetro UV visible.

## **3.7 Análisis Estadístico.**

Los resultados obtenidos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar y fueron analizados estadísticamente a través del programa Minitab 16, mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test de rango múltiple (Tuckey), con nivel de confianza del 95%, para comprobar si hay diferencia significativa ( $<0.05$ ) entre los extractos para determinar el mejor tratamiento, en extracción entre los tipos de solventes, los tiempos de maceración y en el porcentaje de humedad de las hojas. Y en la atomización entre el flujo de  $N_2$  y en la alimentación. Ambos evaluados por actividad antioxidante, fenoles totales y rendimiento.

**4. CAPÍTULO III**  
**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

#### 4.1 Humedad.

El porcentaje de humedad de las hojas de guayusa frescas fue de  $68.52 \pm 0.55\%$ , mientras que la humedad en las hojas de guayusa deshidratadas fue de  $8.91 \pm 0.06\%$ .

Las condiciones usadas para el secado de plantas medicinales dependen mucho de la naturaleza de sus compuestos químicos. Después de la cosecha, la mayoría de las hierbas tienen un contenido de humedad de 60-80% (Handa et al., 2008).

El secado mediante corriente de aire caliente o frío es utilizado generalmente. En esta investigación se utilizó corrientes de aire caliente a  $37^{\circ}\text{C}$ . Si el contenido de humedad es alto en el material vegetal que será utilizado para la extracción se deberá incorporar correcciones de pesos en los cálculos (Handa et al., 2008). Por tal motivo los porcentajes de humedad realizados en este trabajo fueron utilizados en los cálculos respectivos.

#### 4.2 Rendimiento.

En la tabla 2. Se muestran los resultados de los porcentajes de rendimientos con etanol y hexano con sus desviaciones estándares, además de los tipos de solventes, se comparó tiempos de extracción y humedad. En el Anexo 4. Se muestra el análisis estadístico para Rendimientos.

Para el proceso de extracción se comprobó que entre los tratamientos hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Lo que nos indica que el mejor tipo de solvente fue el etanol.

**Tabla 2.** Rendimiento de las hojas de guayusa.

% RENDIMIENTO				
	Etanol		Hexano	
Tiempo de extracción	Hojas deshidratadas	Hojas frescas	Hojas deshidratadas	Hojas frescas
3 horas	$2.09 \pm 0.18$ <sup>a, A</sup>	$2.13 \pm 0.06$ <sup>a, B</sup>	$1.21 \pm 0.30$ <sup>a, A</sup>	$1.31 \pm 0.31$ <sup>a, A</sup>
6 horas	$3.73 \pm 0.20$ <sup>b, A</sup>	$2.25 \pm 0.55$ <sup>a, B</sup>	$1.38 \pm 0.22$ <sup>a, A</sup>	$0.82 \pm 0.37$ <sup>a, A</sup>
12 horas	$1.66 \pm 0.29$ <sup>a, A</sup>	$5.16 \pm 0.62$ <sup>b, B</sup>	$1.26 \pm 0.15$ <sup>a, A</sup>	$0.80 \pm 0.62$ <sup>a, A</sup>
24 horas	$2.06 \pm 0.35$ <sup>a, A</sup>	$5.56 \pm 0.48$ <sup>b, B</sup>	$1.68 \pm 0.17$ <sup>a, A</sup>	$0.84 \pm 0.40$ <sup>a, A</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra minúscula en una misma columna son significativamente diferentes.

Las medias que no comparten una letra mayúscula entre filas para un mismo solvente son significativamente diferentes.

Entre los diferentes porcentajes de humedad al igual que en los tiempos de maceración hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para los tratamientos con etanol. El mejor rendimiento se obtuvo en hojas frescas durante un tiempo de maceración de 12 - 24 horas. Para lo cual se seleccionó el tiempo de 12 horas con hojas frescas como el mejor tratamiento.

La selección del solvente depende de la solubilidad de los componentes deseados del material a extraerse y la cantidad de componentes aumenta con el volumen de solvente que se esté utilizando, así mismo, como el tiempo de extracción, o hasta que el material y el solvente se encuentren en equilibrio. (Handa et al., 2008). Teniendo en cuenta dicha afirmación cabe recalcar que a 24 horas de maceración se obtuvo mayor rendimiento.

Los antioxidantes son solubles en disolventes polares, generalmente mediante el uso de agua, metanol o etanol. También existen antioxidantes lipofílicos que son solubles en hexano. Pero para el siguiente proyecto no se evaluó dicha proporción. La extracción con metanol es un 20% más eficaz que con etanol y 73% más eficaz que solo agua. (Cerón, Higuita, & Cardona, 2010). Esto explica porque el etanol como solvente resultó tener mejor rendimiento que con el hexano.

#### **4.3 Cuantificación de Fenoles totales.**

Estudios anteriores como los redactados por Burneo (2009) demuestran que el rendimiento de la extracción de fenoles y el contenido de flavonoides es mayor dependiendo de la polaridad del solvente. El etanol es un solvente polar y el hexano es un solvente no polar. El tipo de solvente influye en la cantidad de fenoles extraídos, debido a que los compuestos fenólicos son flavonoides más polares y sus estructuras glicosídicas son más solubles en solventes polares y menos solubles en compuestos orgánicos no polares como hexano (Pérez-Nájera et al., 2013).

En la Tabla 3. se muestran los resultados de fenoles totales en las hojas de guayusa: deshidratadas y frescas, los dos tipos de solventes, y los tiempos de maceración.

**Tabla 3.** Contenido de fenoles totales en las hojas de guayusa.

FENOLES TOTALES								
Tiempo de extracción	EtOH				Hexano			
	Hojas deshidratadas		Hojas frescas		Hojas deshidratadas		Hojas frescas	
	mg Ac. Galico/g extracto	mg Ac. Galico/100 g planta	mg Ac. Galico/g extracto	mg Ac. Galico/100 g planta	mg Ac. Galico/g extracto	mg Ac. Galico/100 g planta	mg Ac. Galico/g extracto	mg Ac. Galico/100 g planta
<b>3 horas</b>	7.6 ± 2.65	26.62 ± 4.57 <sup>a,A</sup>	26.67 ± 5.20	35.19 ± 3.89 <sup>a,B</sup>	1.02 ± 0.19	3.49 ± 0.22 <sup>a,A</sup>	1.52 ± 0.50	1.89 ± 0.18 <sup>a,A</sup>
<b>6 horas</b>	3.7 ± 0.26	25.16 ± 1.33 <sup>a,A</sup>	16.59 ± 8.06	40.79 ± 15.46 <sup>a,B</sup>	0.59 ± 0.09	2.32 ± 0.04 <sup>a,A</sup>	0.36 ± 0.11	1.77 ± 0.30 <sup>a,A</sup>
<b>12 horas</b>	9.26 ± 0.04	33.19 ± 5.39 <sup>a,A</sup>	12.11 ± 3.87	39.37 ± 7.71 <sup>a,B</sup>	0.77 ± 0.57	2.62 ± 1.71 <sup>a,A</sup>	8.11 ± 0.68	4.37 ± 0.40 <sup>a,A</sup>
<b>24 horas</b>	8.83 ± 3.41	36.84 ± 1.77 <sup>a,A</sup>	23.35 ± 14.19	38.27 ± 5.02 <sup>a,B</sup>	0.72 ± 0.09	3.47 ± 0.07 <sup>a,A</sup>	8.63 ± 0.03	7.20 ± 3.20 <sup>a,A</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra minúscula en una misma columna son significativamente diferentes.

Las medias que no comparten una letra mayúscula entre filas para un mismo solvente son significativamente diferentes.

Las hojas frescas de guayusa tienen los valores más altos y presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) frente a las hojas deshidratadas. Tomando en cuenta el mejor tratamiento de rendimiento y ya que en el contenido de fenoles totales no presenta diferencia significativa en los tiempos de maceración, se selecciona el tiempo de 12 horas en hojas frescas como mejor tratamiento. En el Anexo 5 se muestra el análisis estadístico del contenido de fenoles totales.

Otros autores han realizado estudios sobre el contenido de fenoles totales, se obtuvieron los siguientes datos:

Burneo (2009), Realizó una maceración dinámica con metanol y obtuvo un valor de contenido de fenoles totales de 116.8 mg Ac. Galico/g extracto. Ruiz y Roque (2009), hicieron una extracción mediante maceración con etanol al 95%, metanol y con una solución hidroalcohólica. En dicha investigación no se cuantificó el contenido de fenoles totales, pero si se comprobó la presencia de compuestos fenólicos en dichos extractos. Carrión (2011), Realizó una maceración dinámica a temperatura ambiente con metanol y hexano como solventes. Sin embargo, solo menciona el contenido de fenoles totales con metanol, 17.34  $\mu\text{g}$  Ac. Galico/g Extracto. Los valores varían dependiendo del tipo de solvente utilizado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son menores, teniendo en cuenta el valor de 12 horas de maceración fue de  $39.37 \pm 7.71$  mg Ac. Galico/100 g planta, a los resultados expuestos por otros autores. Esto se debe a que el metanol extrae una mayor cantidad de fenoles que el etanol.

Los valores deberían ser comparados si el método, solvente y las condiciones analíticas son las mismas (Pérez-Jiménez et al., 2008). Los valores expuestos en otras investigaciones son mayores a las que obtuvimos en el presente trabajo. Como se menciona anteriormente la extracción de compuestos fenólicos aumenta con la polaridad del solvente en este caso se observa que con metanol el contenido de fenoles totales aumenta considerablemente.

#### 4.4 Método ABTS

Los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas de guayusa medida por el método ABTS se muestran en la tabla 4.

No existe diferencia significativa entre los diferentes porcentajes de humedad de las hojas con etanol y sus tiempos de maceración. Sin embargo, tomando en cuenta el mejor rendimiento, el tiempo de maceración de 12 horas en hojas frescas en etanol se selecciona como mejor tratamiento. En el Anexo 6 se muestra el análisis estadístico de la capacidad antioxidante por el método ABTS.

En estudios similares de la guayusa. Realizado por Burneo (2009), se midió la capacidad antioxidante y tuvo como resultado un valor de  $IC_{50}$  11.8 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Un menor valor de  $IC_{50}$  significa una mayor actividad antioxidante (Huang et al., 2005). En el presente trabajo el resultado es de  $6.07 \pm 0.64$  mg Trolox/100 g planta y  $3.71 \pm 0.86$  mg Trolox/g extracto. Las muestras revelan actividad antioxidante. Es complicado la comparación con este estudio por la manera de expresar sus resultados, sin embargo, ambos trabajos exponen la presencia de antioxidantes.

Por otro lado, otros autores han realizado investigaciones en plantas similares como *Ilex paraguariensis* o yerba mate, obteniendo un resultado de  $1.48 \pm 0.5 - 1.81 \pm 0.08$  ( $\mu\text{mol}$  Trolox/g extracto) (Bravo, Goya, & Lecumberri, 2007). Muchas investigaciones demuestran actividad antioxidante en extractos acuosos en *Ilex paraguariensis* (Schinella et al., 2009). Se obtienen valores diferentes de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS según el tipo de extracción que se ha utilizado. Se reportan datos de  $32.73 \pm 3.51$  % de inhibición según Dudonne (2009). También se presenta datos de  $IC_{50}$   $17.2 \pm 0.5$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) Según Schinella (2009). Estos datos son menores que para *Ilex guayusa* Loes. pero ya que provienen de la misma familia y por su escasa literatura fue necesaria su comparación.

**Tabla 4.** Capacidad Antioxidante por el método ABTS en las hojas de guayusa.

ABTS								
Tiempo de extracción	EtOH				Hexano			
	Hojas deshidratadas		Hojas frescas		Hojas deshidratadas		Hojas frescas	
	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta
<b>3 horas</b>	1.78 ± 0.45	6.34 ± 0.45 <sup>a,A</sup>	4.48 ± 0.07	5.95 ± 0.42 <sup>a,A</sup>	0.05 ± 0.02	0.18 ± 0.01 <sup>a,A</sup>	0.23 ± 0.03	0.30 ± 0.11 <sup>a,A</sup>
<b>6 horas</b>	0.85 ± 0.04	5.77 ± 0.41 <sup>a,A</sup>	3.00 ± 1.34	3.69 ± 1.24 <sup>a,A</sup>	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.01 <sup>a,A</sup>	0.08 ± 0.01	0.39 ± 0.10 <sup>a,A</sup>
<b>12 horas</b>	1.51 ± 0.08	5.44 ± 1.13 <sup>a,A</sup>	3.71 ± 0.86	6.07 ± 0.64 <sup>a,A</sup>	0.09 ± 0.06	0.30 ± 0.16 <sup>a,A</sup>	0.68 ± 0.58	0.36 ± 0.04 <sup>a,A</sup>
<b>24 horas</b>	1.70 ± 0.51	7.21 ± 0.31 <sup>a,A</sup>	8.16 ± 5.80	6.38 ± 0.00 <sup>a,A</sup>	0.05 ± 0.00	0.22 ± 0.04 <sup>a,A</sup>	0.67 ± 0.29	0.51 ± 0.03 <sup>a,A</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra minúscula en una misma columna son significativamente diferentes.

Las medias que no comparten una letra mayúscula entre filas para un mismo solvente son significativamente diferentes.

#### 4.5 Método DPPH

La capacidad antioxidante en los extractos de las hojas de guayusa medida por el método DPPH se muestran en la tabla 5. Así mismo como en el método de ABTS, se selecciona el tiempo de maceración de 12 horas con hojas frescas en etanol como mejor tratamiento. En el Anexo 7 se muestra el análisis estadístico para el método DPPH.

Varios autores en sus diferentes investigaciones reportan sus resultados de actividad antioxidante por el método DPPH en *Ilex guayusa* Loes. como Burneo, (2009), que reporta un  $IC_{50}$  14.9 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Y por otro lado Carrión (2011), con un  $IC_{50}$  20 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Ambas extracciones las realizaron con metanol. También realizaron extracciones con hexano el cual dio como resultado un  $IC_{50}$  330 ( $\mu\text{g/ml}$ ). En *Ilex paraguariensis*, que es de la misma familia de *Ilex guayusa*, se han hecho investigaciones mediante el método DPPH para evaluar su actividad antioxidante. Dando los siguientes resultados:  $71.75 \pm 1.22$  % de inhibición (Dudonne et al., 2009),  $IC_{50}$   $7.7 \pm 1.1$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Schinella et al., 2009). Los resultados expresan actividad antioxidante. Los valores en el presente estudio fueron de  $14.71 \pm 5.41$  mg ET/100 g planta y de  $9.14 \pm 4.43$  mg ET/g extracto en Base Húmeda.

Resulta un poco complicado comparar este trabajo con los mencionados anteriormente por la forma que se expresan los resultados. Sin embargo, si se presente capacidad antioxidante por este método para esta planta. Aunque por el tipo de solvente (etanol) se presenta un valor menor en contraste con los estudios expuestos.

**Tabla 5.** Capacidad Antioxidante por el método DPPH en las hojas de guayusa.

Tiempo de extracción	DPPH							
	EtOH				Hexano			
	Hojas deshidratadas		Hojas frescas		Hojas deshidratadas		Hojas frescas	
	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta	mg Trolox/g extracto	mg Trolox/100 g planta
<b>3 horas</b>	3.13 ± 1.27	10.95 ± 2.53 <sup>a,A</sup>	14.77 ± 4.10	19.41 ± 3.78 <sup>a,A</sup>	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.01 <sup>a,A</sup>	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.10 <sup>a,A</sup>
<b>6 horas</b>	1.47 ± 0.17	9.92 ± 0.06 <sup>a,A</sup>	3.83 ± 1.34	4.75 ± 1.12 <sup>a,A</sup>	0.05 ± 0.01	0.18 ± 0.01 <sup>a,A</sup>	0.06 ± 0.02	0.29 ± 0.04 <sup>a,A</sup>
<b>12 horas</b>	3.71 ± 1.15	12.94 ± 2.02 <sup>a,A</sup>	9.14 ± 4.43	14.71 ± 5.41 <sup>a,A</sup>	0.10 ± 0.08	0.33 ± 0.08 <sup>a,A</sup>	0.56 ± 0.46	0.31 ± 0.02 <sup>a,A</sup>
<b>24 horas</b>	3.53 ± 1.33	14.77 ± 0.57 <sup>a,A</sup>	13.82 ± 7.04	11.83 ± 2.90 <sup>a,A</sup>	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00 <sup>a,A</sup>	0.48 ± 0.26	0.35 ± 0.03 <sup>a,A</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra minúscula en una misma columna son significativamente diferentes.

Las medias que no comparten una letra mayúscula entre filas para un mismo solvente son significativamente diferentes.

#### 4.6 Atomización

Para esta investigación se utilizó el extracto etanólico con un tiempo de maceración de 24 horas en hojas deshidratadas.

Los porcentajes de rendimiento en la atomización no fueron altos para la proporción de muestra utilizada de 40 ml. la concentración de sólidos fue de 30 mg/ml. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (ver Anexo 8) entre los tratamientos. En la tabla 6 se presentan los datos de rendimientos de recuperación de todos los tratamientos realizados.

**Tabla 6.** Rendimientos del Secado por Atomización en las hojas de guayusa.

<b>Parámetros de atomización</b>	<b>% RENDIMIENTO</b>
15%* - 85°C*	19.17 ± 1.18 <sup>a</sup>
15%* - 90°C*	25.00 ± 2.36 <sup>a</sup>
25%* - 85°C*	20.83 ± 7.07 <sup>a</sup>
25%* - 90°C*	13.33 ± 3.54 <sup>a</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes.

\*% de potencia de bomba: 15% = 4,5 ml/min, 25% = 7,5 ml/min; °C = Temperatura de secado.

El bajo rendimiento de los extractos se debió a que posiblemente los pocos parámetros de atomización no fueron los más adecuados. Con los parámetros en estudio no se encontró un valor óptimo. Por otra parte, mucha cantidad de muestra se quedó adherida a la superficie y a las paredes del equipo los cuales también pueden explicar el bajo rendimiento. Para resolver éste problema se puede añadir auxiliares de secado como por ejemplo maltodextrina o silica coloidal que reducen las adherencias del material seco, ayuda a aumentar el rendimiento y no interfiere con los resultados (Runha et al., 2001).

Se realizó la cuantificación del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS y DPPH en los extractos atomizados. En la tabla 7 se muestran los datos obtenidos en fenoles totales y la capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH. No existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos para las condiciones dadas en la presente investigación (ver Anexo 9).

**Tabla 7.** Cuantificación del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en los extractos Atomizados.

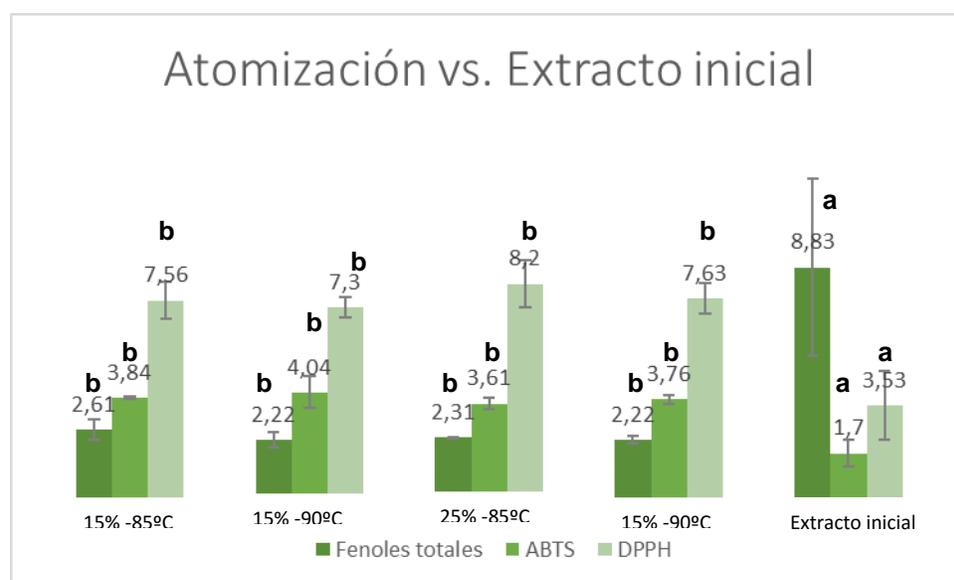
Parámetros de atomización	Fenoles Totales mg Ac. Gálico / g extracto	ABTS mg Trolox/ g extracto	DPPH mg Trolox/ g extracto
15%* - 85°C*	2.61 ± 0.38 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.56 ± 0.72 <sup>a</sup>
15%* - 90°C*	2.22 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.04 ± 0.61 <sup>a</sup>	7.30 ± 0.39 <sup>a</sup>
25%* - 85°C*	2.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.61 ± 0.23 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.90 <sup>a</sup>
25%* - 90°C*	2.22 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.16 <sup>a</sup>	7.63 ± 0.60 <sup>a</sup>

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes.

\*% de potencia de bomba: 15% = 4,5 ml/min, 25% = 7,5 ml/min; °C = Temperatura de secado.

En la figura 12 se muestra un gráfico que expone las diferencias del extracto macerado a 24 horas en etanol con hojas deshidratadas sin proceso de secado frente a los extractos atomizados.



**Figura 12. Resultados de los extractos secados por atomización y del extracto macerado (inicial)**

Cada valor es la media con la desviación estándar de dos replicas experimentales.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Se observó que, para el contenido de fenoles totales, y para la capacidad antioxidante mediante el método de ABTS y para el método DPPH existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el extracto macerado y los extractos atomizados. En el Anexo 10 se puede observar el análisis estadístico realizado para poder comprobar las diferencias entre el extracto macerado (inicial) con los extractos atomizados.

Se puede observar que el contenido de fenoles totales disminuyó 4 veces aproximadamente en la mayoría de tratamientos de  $8.83 \pm 3.41$  mg Ac. Galico/g extracto a  $2.22 \pm 0.15$  mg Ac. Galico/g extracto. A pesar que la temperatura fue baja los  $90^{\circ}\text{C}$  dio lugar a la degradación térmica de los fenoles totales (Camelo-Méndez, 2012).

En un estudio similar realizado en *Ilex paraguariensis* algunos compuestos fueron altamente afectados por la extracción o por las condiciones en el atomizador. Pero se afirmó que una pequeña cantidad de yerba mate puede inhibir el radical de oxidación DPPH en un 50% ya que obtuvieron como resultado un  $\text{IC}_{50}$  2.52 mg/ml (Berté, Beux, Spada, Salvador, & Hoffmann-Ribani, 2011). La capacidad antioxidante aumentó aproximadamente 2 veces. Para el método de ABTS fue de  $1.70 \pm 0.51$  mg Trolox/g extracto a  $4.04 \pm 0.61$  mg Trolox/g extracto. Para el método DPPH fue de  $3.53 \pm 1.33$  mg Trolox/g extracto a  $8.20 \pm 0.90$  mg Trolox/g extracto respectivamente. El proceso de atomización aumenta las características tecnológicas del producto, el cual aumenta su estabilidad (Berté et al., 2011; Runha et al., 2001) y lo podemos comprobar en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

- El mejor tipo de solvente para este estudio fue el etanol en comparación con hexano, por su diferente polaridad.
- Las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) frescas, con un tiempo de maceración de 12 horas se seleccionó como el mejor tratamiento, ya que presentaron mejores resultados de rendimiento, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.
- Las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) son una fuente de antioxidantes con  $39.37 \pm 7.71$  mg EAG/100 g planta en contenido de fenoles totales;  $6.07 \pm 0.64$  mg ET/100 g planta, y de  $14.71 \pm 5.41$  mg ET/100 g planta en capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH respectivamente.
- El proceso de Atomización disminuyó aproximadamente 4 veces el contenido de fenoles totales de  $8.83 \pm 3.41$  mg Ac. Galico/g extracto a  $2.22 \pm 0.15$  mg Ac. Galico/g extracto.
- El proceso de Atomización aumento 2 veces aproximadamente la capacidad antioxidante. Para el método de ABTS fue de  $1.70 \pm 0.51$  mg Trolox/g extracto a  $4.04 \pm 0.61$  mg Trolox/g extracto. Para el método DPPH fue de  $3.53 \pm 1.33$  mg Trolox/g extracto a  $8.20 \pm 0.90$  mg Trolox/g extracto respectivamente.

## RECOMENDACIONES.

- Para facilitar la comparación en literatura, se recomienda realizar el método DPPH y ABTS expresado como IC<sub>50</sub> (gramos de muestra necesaria para inhibir en 50% un gramo de radical).
- Para un mejor entendimiento del contenido fenólico realizar un ensayo cromatógrafo para evaluar qué tipo de polifenoles contiene esta planta y cuáles de ellos se degradan fácilmente por la temperatura.
- Realizar una mejor extracción realizando una doble maceración con diferentes solventes más compatibles con los antioxidantes. Como por ejemplo metanol y acetona mezclándolos con una proporción de agua.
- Para mejorar la atomización es necesario aumentar la concentración de sólidos totales, también probar otras condiciones. Como por ejemplo utilizar auxiliares de secado para aumentar los rendimientos.

## BIBLIOGRAFIA.

- Adas, G., Elizabeth, A., Arias Arias, R. V., & Manzano Santana, P. (2013). Estudio Comparativo del Té de la especie (*Ilex guayusa*) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del Tungurahua".
- AOAC International. (2005). *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Berté, K. A., Beux, M. R., Spada, P. K., Salvador, M., & Hoffmann-Ribani, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5523-5527.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L., Goya, L., & Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40(3), 393-405.
- Büchi Labortechnik, A. (2002). Training papers spray drying. *Buchi Corporation*.
- 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 (Tesis) Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. *Escuela de Ingeniería Química*.
- Camelo-Méndez, G. (2012). Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de una bebida de Borojoa patinoi Cuatrecasas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2).
- Carrión, N. (2011). Aislamiento Biodirigido (in vitro) de compuestos antioxidantes y antihiper glucemiantes a partir de *Ilex guayusa*. *Escuela de Bioquímica y Farmacia*.
- Castañeda, B., Castro, R., Puebla, P., & Ibáñez, L. (2011). Efecto del extracto atomizado de las hojas de *Calophyllum*. *Horizonte Médico*, 11(1).
- Cerón, I., Higuera, J., & Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5(2011), 5.

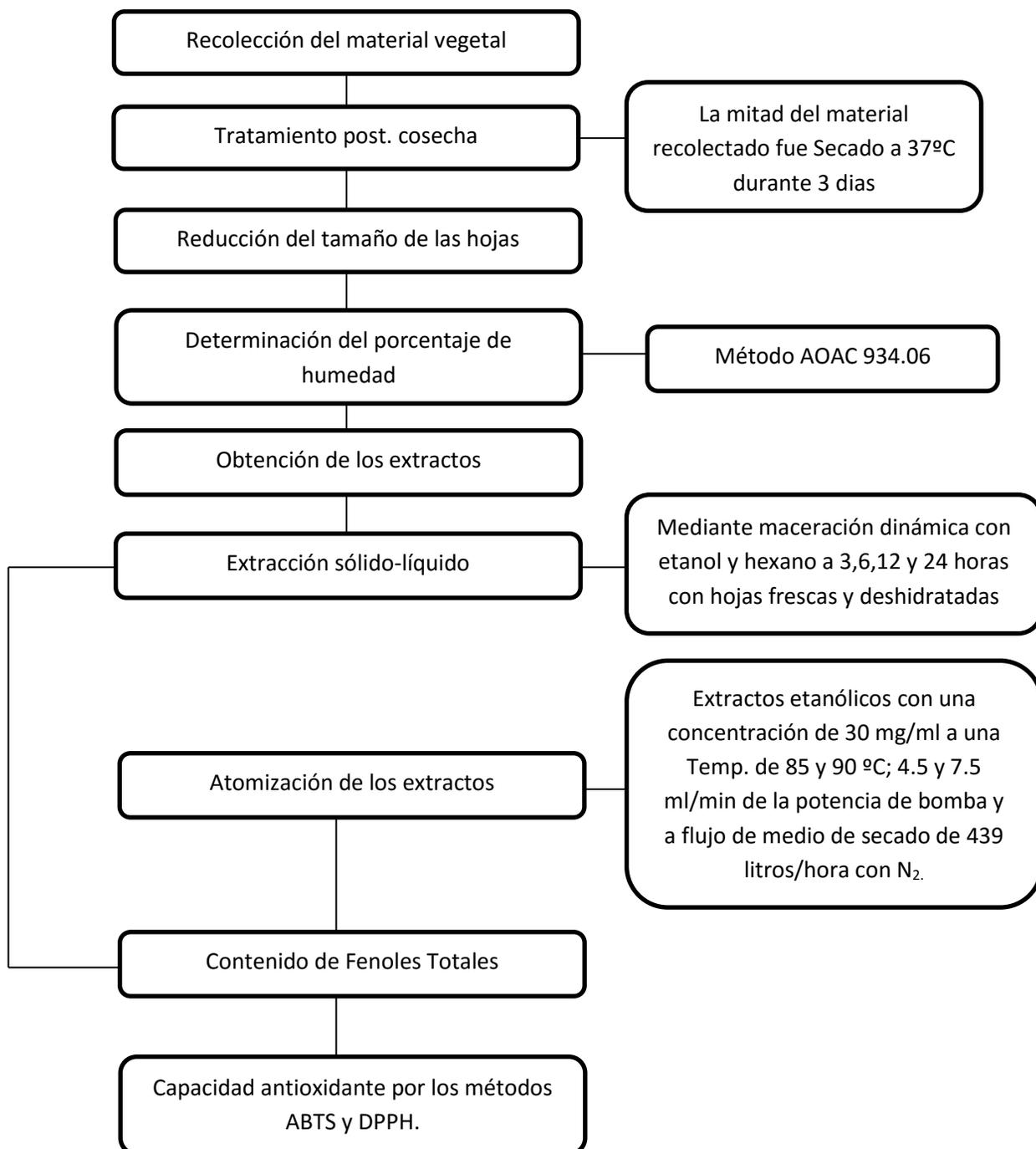
- Cussler, E. L. (2009). *Diffusion: mass transfer in fluid systems*: Cambridge university press.
- Dean, J. R. (2010). *Extraction techniques in analytical sciences* (Vol. 34): John Wiley & Sons.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Giovannini, P. (2015). Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *Journal of ethnopharmacology*, 164, 78-88.
- González, M., & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2(12), 1842-1866.
- Gorinstein, S., Vargas, O. J. M., Jaramillo, N. O., Salas, I. A., Ayala, A. L. M., Arancibia-Avila, P., . . . Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European food research and technology*, 225(3-4), 321-328.
- 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.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*, 4, 187-267
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Jørgensen, P. M., León-Yáñez, S., & Garden, M. B. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden Press.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee Components: Assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- Litescu, S. C., Eremia, S., & Radu, G. L. (2010). Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 241-249): Springer.

- Matamoros, A. (2007). Documento sobre gestión de la Biodiversidad Amazónica en Ecuador. *Programa OTCA-BID ATN/OC-9251-RG*.
- Molestina Alvarez, R. D. (2014). *Factibilidad para la creación de una empresa comercializadora de la bebida energizante a base de Guayusa" Runa" en el mercado de Guayaquil*.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D. L., & Robbins, R. J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 156-162.
- Oliveira, O. W., & Petrovick, P. R. (2010). Spray drying of plant extracts: basic remarks and application. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), 641-650.
- Palomino, L. G., Carlos; Gil, Jesus; Rojano, Benjamin. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.
- Patiño, V. M. (1968). Guayusa, a neglected stimulant from the eastern Andean foothills. *Economic Botany*, 22(4), 311-316.
- Peredo Luna, H., & Palou Garcia, E. (2008). Aceites Esenciales: métodos de extracción. *Temas selectivos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24-32.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
- 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.
- 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*.
- Reverchon, E., Adami, R., Caputo, G., & De Marco, I. (2008). Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: interpretation of results. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(1), 70-84.
- Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana de medicina militar*, 30(1), 15-20
- Ruiz, J. R., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación*, 12(1), 41-47.

- Runha, F., Cordeiro, D., Pereira, C., Vilegas, J., & Oliveira, W. (2001). Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. *Food and bioproducts processing*, 79(3), 160-168.
- Schinella, G., Fantinelli, J. C., Tournier, H., Prieto, J. M., Spegazzini, E., Debenedetti, S., & Mosca, S. M. (2009). Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). *Food Research International*, 42(10), 1403-1409.
- Serrano, M. E. D., López, M. L., & Espuñes, T. d. R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*: Convenio Andrés Bello.
- Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 27(5/6), 155-160.
- Swain, T., & Hillis, W. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.
- Usca, T., & Ramiro, M. (2013). Efecto Estrogénico del Extracto de las Hojas de Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) en Ratas (*Ratus norvegicus*).
- Velásquez Valderrama, Á. M. (2012). La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial.
- Vieira, M. A., Maraschin, M., Pagliosa, C. M., Podestá, R., De Simas, K. N., Rockenbach, I. I., . . . Amante, E. R. (2010). Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *Journal of food science*, 75(3), C280-C285.
- Yatsu, F. K., Borghetti, G. S., & Bassani, V. L. (2011). Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Mate) spray-dried powder. *Journal of medicinal food*, 14(4), 413-419.

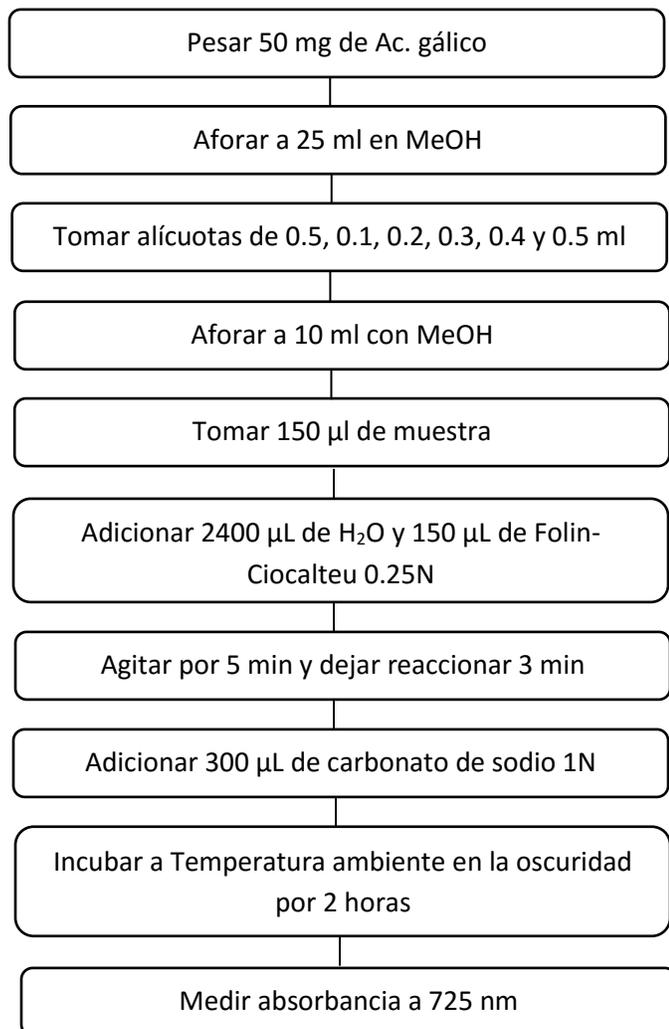
**ANEXOS.**

**Anexo 1.** Metodología de la atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa.

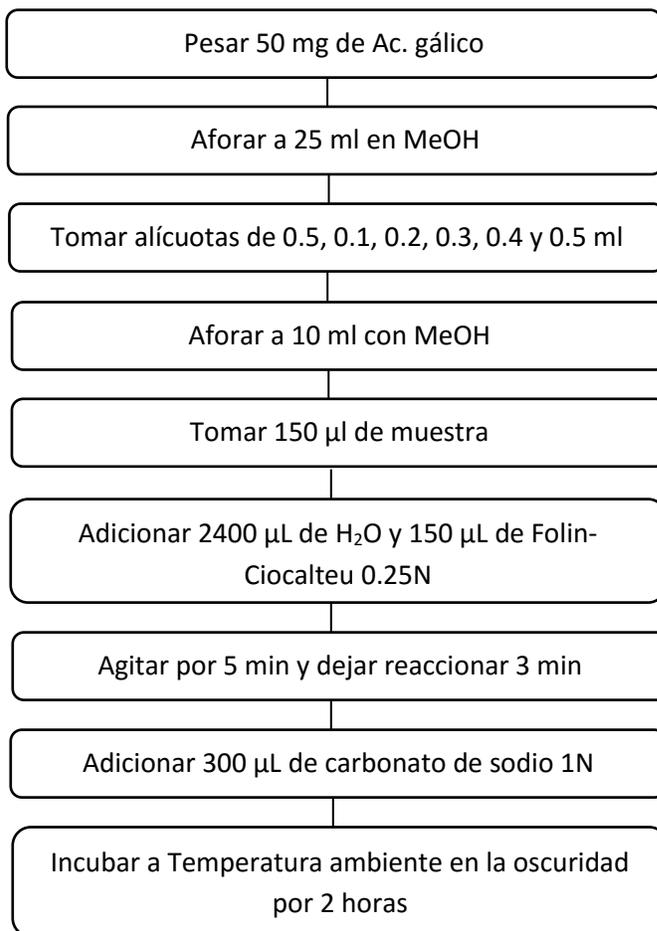


**Anexo 2.** Diagrama para lectura de muestras de Fenoles totales y curva de calibración.

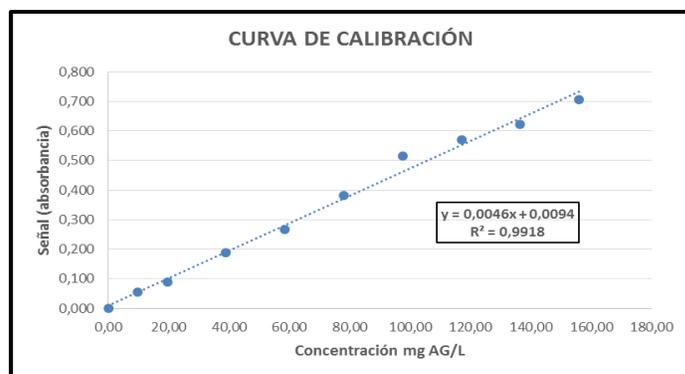
**Preparación y lectura de estándares. Método Folin-Ciocalteu.**



### Medición de fenoles totales. Método Folin-ciocalteu.



### Curva de Calibración para Fenoles Totales. Método Folin-Ciocalteu



### **Cálculos para determinación de concentración para Fenoles totales.**

La concentración expresada en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto se realizó mediante un retroceso, el cual inicia desde la ecuación de la recta dada por la curva de calibración

$$y = mx + b$$

**De donde:**

$y$  = Absorbancia (nm)

$m$  = Pendiente

$x$  = Concentración

$b$  = Intersección

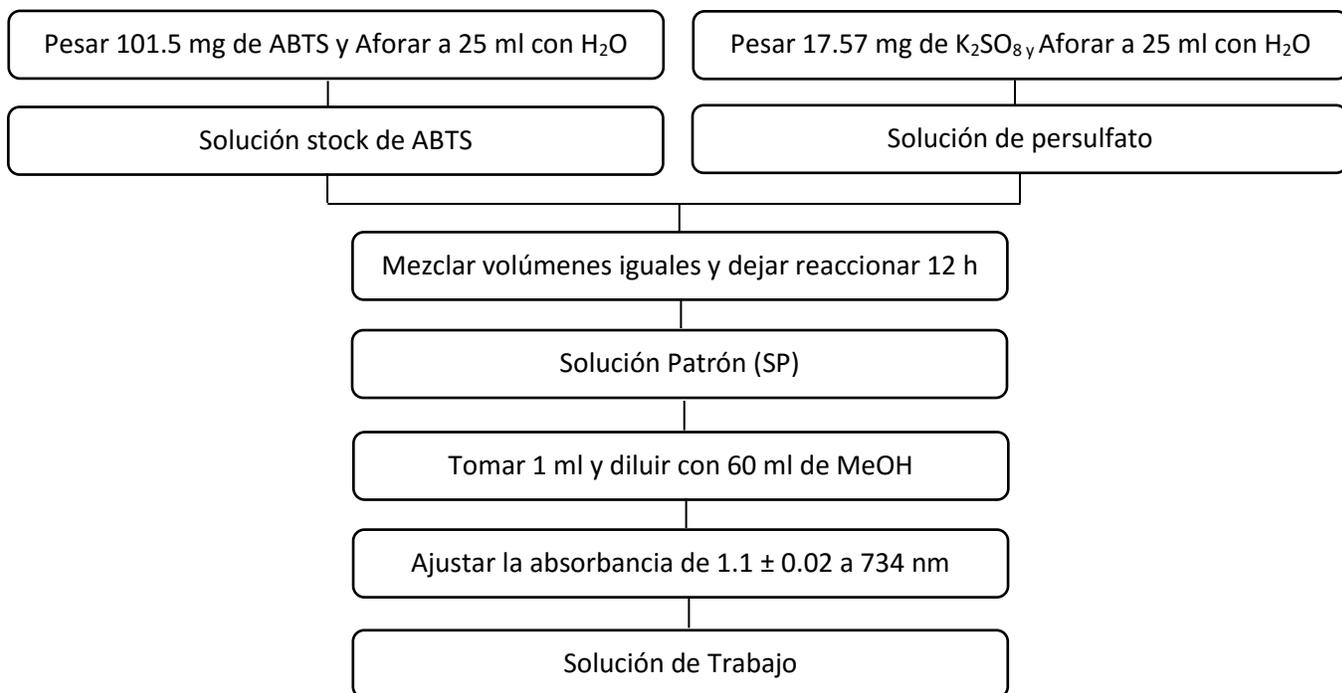
De esta relación se despeja la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

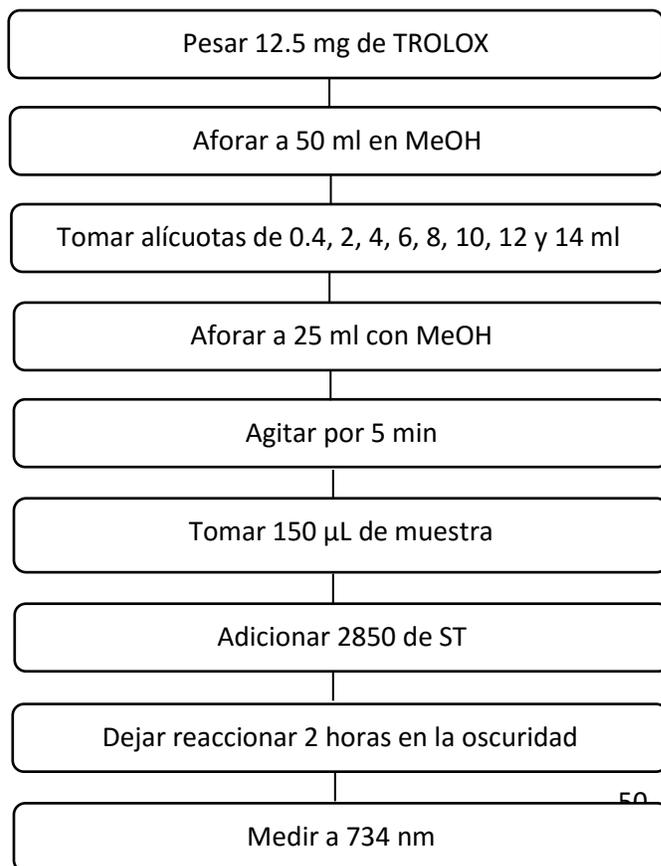
Luego de obtener la concentración se realizan las correcciones de porcentaje de humedad y las diluciones respectivas.

**Anexo 3.** Diagrama para lectura de muestras para ABTS y curva de calibración.

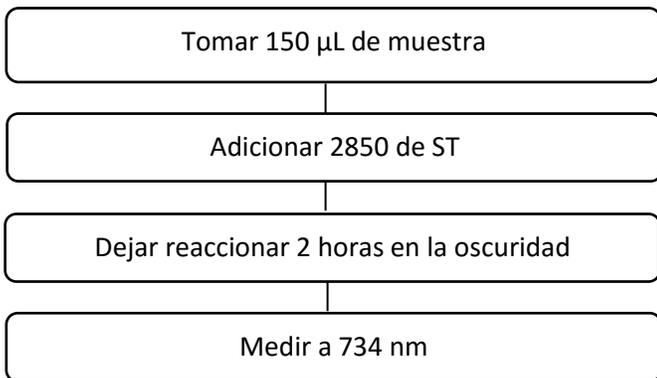
**Preparación de las soluciones de trabajo. Método ABTS**



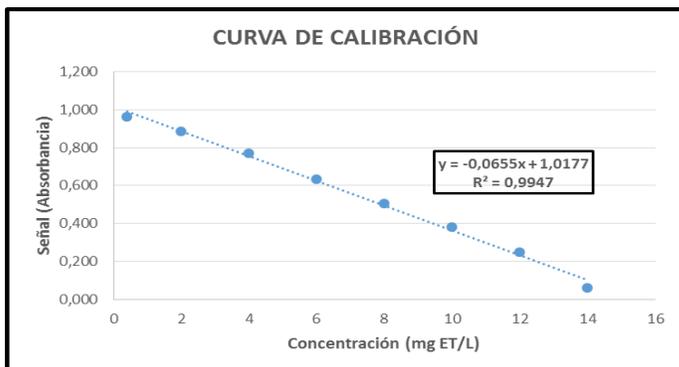
**Preparación de estándares. Método ABTS.**



**Lectura de muestras. Método ABTS.**

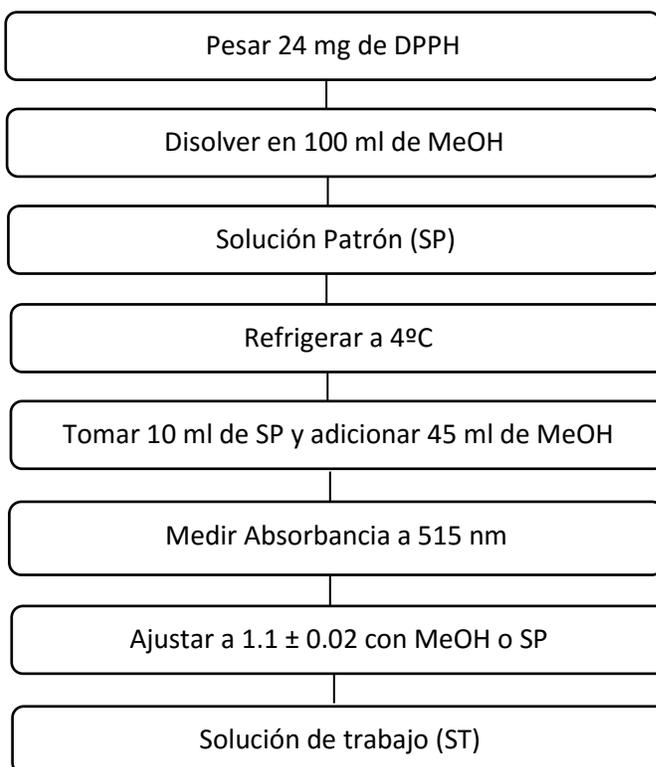


### Curva de Calibración para el método ABTS.

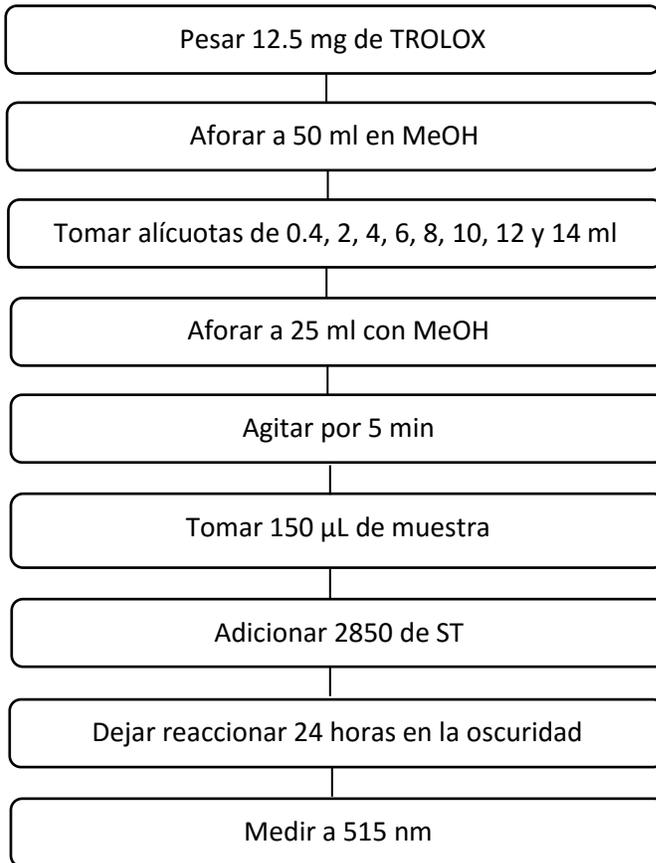


**Anexo 4.** Diagrama para lectura de muestras para DPPH y curva de calibración.

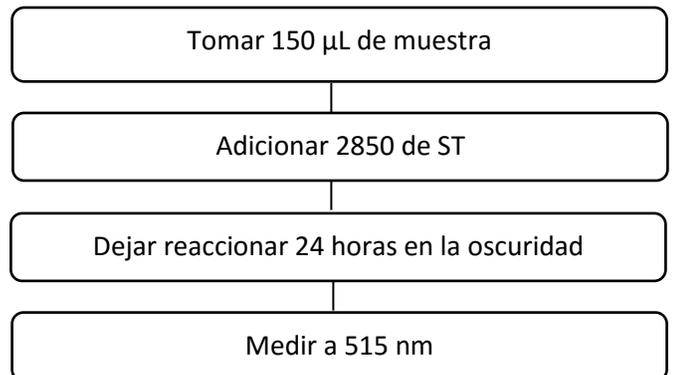
### Preparación de las soluciones de trabajo. Método DPPH.



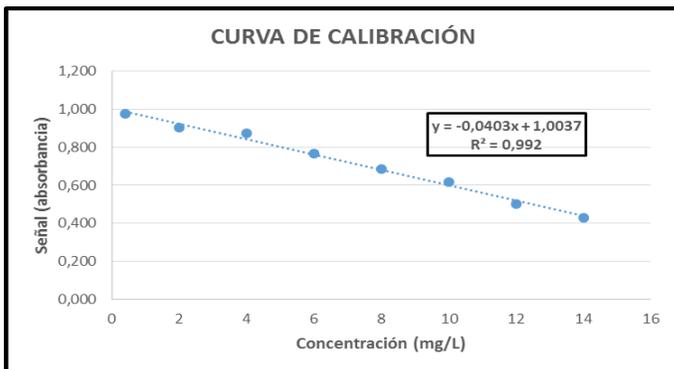
### Preparación de estándares. Método DPPH.



### Lectura de muestras. Método DPPH.



### Curva de Calibración para el método DPPH.



### **Cálculos para determinación de concentración para la capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.**

La concentración expresada en miligramos equivalentes de TROLOX por gramo de extracto se realizó mediante un retroceso, el cual inicia desde la ecuación de la recta dada por la curva de calibración

$$y = mx + b$$

**De donde:**

$y$  = Absorbancia (nm)

$m$  = Pendiente

$x$  = Concentración

$b$  = Intersección

De esta relación se despeja la concentración:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Luego de obtener la concentración se realizan las correcciones de porcentaje de humedad y las diluciones respectivas.

## Anexo 5. Análisis Estadístico para Rendimiento de los extractos.

### ANOVA de un solo factor: Deshidratadas vs. Tiempo (ETOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12. 24. 3. 6

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	5,0284	1,67615	23,77	0,005
Error	4	0,2821	0,07051		
Total	7	5,3105			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,265542	94,69%	90,71%	78,76%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
6	2	3,730	A
3	2	2,100	B
24	2	2,060	B
12	2	1,665	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: Frescas vs. Tiempo (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12. 24. 3. 6

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	20,3051	6,7684	29,22	0,004
Error	4	0,9267	0,2317		
Total	7	21,2318			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,481313	95,64%	92,36%	82,54%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24	2	5,560	A
12	2	5,160	A
6	2	2,250	B
3	2	2,1250	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Deshidratadas vs Frescas (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	deshidratadas. frescas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	7,673	7,673	4,05	0,064
Error	14	26,542	1,896		
Total	15	34,215			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,37691	22,43%	16,88%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
frescas	8	3,774	A
deshidratadas	8	2,389	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Deshidratadas vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12. 24. 3. 6

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,2855	0,09515	2,03	0,252
Error	4	0,1871	0,04677		
Total	7	0,4726			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,216275	60,41%	30,71%	0,00%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24	2	1,680	A
6	2	1,375	A
12	2	1,225	A
3	2	1,210	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Tiempo (Hexano)

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,3382	0,1127	0,36	0,789
Error	4	1,2680	0,3170		
Total	7	1,6062			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,563028	21,06%	0,00%	0,00%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
3 horas	2	1,300	A
6 horas	2	1,120	A
24 horas	2	0,840	A
12 horas	2	0,800	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### **ANOVA de un solo factor: Fresca vs Deshidratada (Hexano)**

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	fresca Hex.. desh. Hex

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1		0,5112	0,5112	3,44	0,085
Error	14		2,0787	0,1485		
Total	15		2,5900			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,385334	19,74%	14,01%	0,00%

### **Comparaciones en parejas de Tukey**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
desh. Hex	8	1,3725	A
fresca Hex.	8	1,015	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### **ANOVA de un solo factor: [Fresca vs Deshidratada (EtOH)] vs [Fresca vs Deshidratada (Hexano)]**

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	fresca Hex.. desh. Hex. fresca EtOH. desh. EtOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3		36,69	12,228	11,96	0,000
Error	28		28,62	1,022		
Total	31		65,31			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,01103	56,17%	51,48%	42,76%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
fresca EtOH	8	3,774	A
desh. EtOH	8	2,389	B
desh. Hex	8	1,3725	B
fresca Hex.	8	1,015	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 6. Análisis Estadístico para Fenoles Totales.

### ANOVA de un solo factor: Frescas vs. Tiempo (ETOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	34,03	11,34	0,13	0,935
Error	4	338,83	84,71		
Total	7	372,86			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9,20365	9,13%	0,00%	0,00%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
6 horas	2	40,8	A
12 horas	2	39,38	A
24 horas	2	38,27	A
3 horas	2	35,19	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: Deshidratada vs. Tiempo (ETOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	182,32	60,77	4,43	0,092
Error	4	54,85	13,71		
Total	7	237,17			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)

3,70320 76,87% 59,52% 7,49%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	36,85	A
12 horas	2	33,19	A
3 horas	2	26,62	A
6 horas	2	25,160	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Frescas vs. Deshidratadas (ETOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	frescas ETOH. desh. ETOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	252,9	252,89	5,80	0,030
Error	14	610,0	43,57		
Total	15	862,9			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6,60104	29,31%	24,26%	7,67%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
frescas ETOH	8	38,40	A
desh. ETOH	8	30,45	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Frescas vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	39,32	13,106	4,99	0,077

Error	4	10,50	2,625
Total	7	49,82	

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad.	R-cuad.
		(ajustado)	(pred)	
1,62016	78,92%	63,12%	15,70%	

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	7,20	A
12 horas	2	4,375	A
3 horas	2	1,890	A
6 horas	2	1,770	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Deshidratada vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	2,141	0,7136	0,96	0,494
Error	4	2,983	0,7458		
Total	7	5,124			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad.	R-cuad.
		(ajustado)	(pred)	
0,863575	41,78%	0,00%	0,00%	

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
3 horas	2	3,495	A
24 horas	2	3,4700	A
12 horas	2	2,62	A
6 horas	2	2,3200	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Frescas vs. Deshidratadas (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	frescas HEX.. desh. HEX

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	2,772	2,772	0,71	0,415
Error	14	54,942	3,924		
Total	15	57,715			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,98102	4,80%	0,00%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
frescas HEX.	8	3,809	A
desh. HEX	8	2,976	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: [Frescas vs. Deshidratadas (EtOH)] vs. [Frescas vs. Deshidratadas (Hexano)]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	frescas HEX..desh. HEX. frescas ETOH. desh. ETOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	7962,0	2653,99	111,75	0,000
Error	28	665,0	23,75		
Total	31	8626,9			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,87331	92,29%	91,47%	89,93%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
frescas ETOH	8	38,40	A
desh. ETOH	8	30,45	B
frescas HEX.	8	3,809	C
desh. HEX	8	2,976	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 7. Análisis Estadístico para ABTS.

### ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Tiempo (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	9,141	3,0469	5,69	0,063
Error	4	2,143	0,5357		
Total	7	11,284			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,731924	81,01%	66,77%	24,04%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	6,380	A
12 horas	2	6,065	A
3 horas	2	5,950	A
6 horas	2	3,690	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: Deshidratas vs. Tiempo (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	3,597	1,1990	2,78	0,175
Error	4	1,728	0,4320		
Total	7	5,325			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,657286	67,55%	43,21%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	7,210	A
3 horas	2	6,340	A
6 horas	2	5,765	A
12 horas	2	5,445	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Deshidratada (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	fresca EtOH. Desh. EtOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	1,789	1,789	1,51	0,240
Error	14	16,609	1,186		
Total	15	18,398			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,08920	9,72%	3,28%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Desh. EtOH	8	6,190	A
fresca EtOH	8	5,521	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,04625	0,015417	2,52	0,197
Error	4	0,02450	0,006125		
Total	7	0,07075			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0782624	65,37%	39,40%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	0,5100	A
6 horas	2	0,3950	A
12 horas	2	0,3650	A
3 horas	2	0,3000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Deshidratadas vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,02260	0,007533	1,08	0,451
Error	4	0,02780	0,006950		
Total	7	0,05040			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0833667	44,84%	3,47%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
12 horas	2	0,305	A
24 horas	2	0,2250	A
6 horas	2	0,17500	A
3 horas	2	0,17500	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Deshidratadas (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	fresca Hex.. Desh. Hex.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0,1190	0,119025	13,75	0,002
Error	14	0,1211	0,008654		
Total	15	0,2402			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0930246	49,56%	45,95%	34,12%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
fresca Hex.	8	0,3925	A
Desh. Hex.	8	0,2200	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: [Fresca vs. Deshidratadas (EtOH)] vs. [Fresca vs. Deshidratadas (Hexano)]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	fresca Hex.. Desh. Hex.. fresca EtOH. Desh. EtOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	248,27	82,7575	138,51	0,000
Error	28	16,73	0,5975		
Total	31	265,00			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,772982	93,69%	93,01%	91,75%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Desh. EtOH	8	6,190	A
fresca EtOH	8	5,521	A
fresca Hex.	8	0,3925	B
Desh. Hex.	8	0,2200	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 8. Análisis Estadístico para DPPH.

### ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Tiempo (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	226,16	75,39	5,67	0,063
Error	4	53,19	13,30		
Total	7	279,35			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3,64651	80,96%	66,68%	23,84%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
3 horas	2	19,41	A
12 horas	2	14,71	A
24 horas	2	11,83	A
6 horas	2	4,745	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: Deshidratada vs. Tiempo (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	27,81	9,270	3,42	0,133
Error	4	10,83	2,708		
Total	7	38,64			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,64546	71,97%	50,95%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	14,775	A
12 horas	2	12,94	A
3 horas	2	10,95	A
6 horas	2	9,9250	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Deshidratada (EtOH)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	fresca EtOH. desh. EtOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	1,102	1,102	0,05	0,829
Error	14	317,989	22,713		
Total	15	319,091			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,76587	0,35%	0,00%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
fresca EtOH	8	12,67	A
desh. EtOH	8	12,148	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,003700	0,001233	0,40	0,761
Error	4	0,012300	0,003075		
Total	7	0,016000			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0554527	23,13%	0,00%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
24 horas	2	0,3500	A
3 horas	2	0,3300	A
12 horas	2	0,3050	A
6 horas	2	0,2950	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Deshidratada vs. Tiempo (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tiempo	4	12 horas. 24 horas. 3 horas. 6 horas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	3	0,03165	0,01055	0,75	0,578
Error	4	0,05650	0,01413		
Total	7	0,08815			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,118849	35,90%	0,00%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
12 horas	2	0,335	A
24 horas	2	0,2500	A
3 horas	2	0,1900	A
6 horas	2	0,17500	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Fresca vs. Deshidratada (Hexano)

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	fresca Hex.. desh. Hex

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0,02722	0,027225	3,66	0,076
Error	14	0,10415	0,007439		
Total	15	0,13137			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0862513	20,72%	15,06%	0,00%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
fresca Hex.	8	0,3200	A
desh. Hex	8	0,2375	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: [Fresca vs. Deshidratada (EtOH)] vs. [Fresca vs. Deshidratada (Hexano)]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	fresca Hex.. desh. Hex. fresca EtOH. desh. EtOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1178,5	392,82	34,58	0,000
Error	28	318,1	11,36		
Total	31	1496,6			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3,37053	78,75%	76,47%	72,24%

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
fresca EtOH	8	12,67	A
desh. EtOH	8	12,148	A
fresca Hex.	8	0,3200	B
desh. Hex	8	0,2375	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 9. Análisis Estadístico de Rendimiento por Atomización.

### ANOVA de un solo factor: (15%-85°C) (15%-90°C) (25%-85°C) (25%-90°C).

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	15%-85°C. 15%-90°C. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	140,35	46,78	2,69	0,181
Error	4	69,47	17,37		
Total	7	209,82			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,16750	66,89%	42,06%	0,00%

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
15%-90°C	2	25,00	A
25%-85°C	2	20,83	A
15%-85°C	2	19,165	A
25%-90°C	2	13,33	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 10. Análisis Estadístico para Fenoles Totales, ABTS y DPPH de los extractos atomizados.

### ANOVA de un solo factor: Fenoles vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	4	15%-85°C. 15%-90°C. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	3	0,05618	0,01873	0,19	0,900
Error	4	0,39997	0,09999		
Total	7	0,45615			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,316215	12,32%	0,00%	*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
15%-90°C	1	2,420	A
15%-85°C	3	2,413	A
25%-85°C	2	2,30500	A
25%-90°C	2	2,215	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: ABTS vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	4	15%-85°C. 15%-90°C. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	3	0,5312	0,17706	5,78	0,062
Error	4	0,1225	0,03063		
Total	7	0,6537			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,175012	81,26%	67,20%	*

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
15%-90°C	1	4,470	A
15%-85°C	3	3,7633	A
25%-90°C	2	3,760	A
25%-85°C	2	3,605	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: DPPH vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	4	15%-85°C. 15%-90°C. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	3	0,8160	0,2720	0,58	0,660
Error	4	1,8823	0,4706		
Total	7	2,6983			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,685985	30,24%	0,00%	*

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
25%-85°C	2	8,195	A
25%-90°C	2	7,635	A
15%-90°C	1	7,570	A
15%-85°C	3	7,380	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 11. Análisis Estadístico Extracto Atomizado vs. Tratamiento inicial.

### ANOVA de un solo factor: Fenoles Totales vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	5	15%-85°C. 15%-90°C. 24 horas desh. EtOH. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	4	67,29	16,823	7,00	0,028
Error	5	12,02	2,403		
Total	9	79,31			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,55024	84,85%	72,73%	*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
24 horas desh. EtOH	2	8,82	A
15%-90°C	1	2,420	B
15%-85°C	3	2,413	B
25%-85°C	2	2,30500	B
25%-90°C	2	2,215	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ANOVA de un solo factor: ABTS vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	5	15%-85°C. 15%-90°C. 24 horas desh. EtOH. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	4	7,6630	1,91574	25,09	0,002
Error	5	0,3817	0,07634		
Total	9	8,0447			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,276303	95,26%	91,46%	*

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
15%-90°C	1	4,470	A
15%-85°C	3	3,7633	A
25%-90°C	2	3,760	A
25%-85°C	2	3,605	A
24 horas desh. EtOH	2	1,700	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: DPPH vs. Condiciones.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
condiciones	5	15%-85°C. 15%-90°C. 24 horas desh. EtOH. 25%-85°C. 25%-90°C

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
condiciones	4	28,190	7,0474	9,61	0,014
Error	5	3,668	0,7337		
Total	9	31,858			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,856545	88,49%	79,27%	*

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

condiciones	N	Media	Agrupación
25%-85°C	2	8,195	A
25%-90°C	2	7,635	A
15%-90°C	1	7,570	A
15%-85°C	3	7,380	A
24 horas desh. EtOH	2	3,535	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.