



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Volatiloma y capacidad antioxidante de las hojas de *Ilex*
guayusa bajo diferentes condiciones de luz y edad**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: DENICE MARIELA ARIAS CARRILLO

TUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN

COTUTOR: PhD. KAREL DIÉGUEZ SANTANA

COTUTORA: PhD. ZULAY MARINA NIÑO RUIZ

**Tena - Ecuador
2024**

Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 30 de agosto de 2024

Yo, Denice Mariela Arias Carrillo, con documento de identidad 1727138214, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.



Denice Mariela Arias Carrillo

C.I: 1727138214

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 30 de agosto de 2024

Yo, Denice Mariela Arias Carrillo, con documento de identidad 1727138214 en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Volatiloma y capacidad antioxidante de las hojas de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de luz y edad, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Denice Mariela Arias Carrillo

C.I: 1727138214

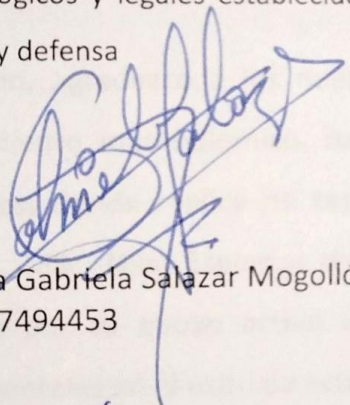
Carrera de Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

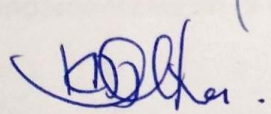
Tena, 30 de agosto de 2024

Certifico que el trabajo de titulación: "VOLATILOMA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE *ILEX GUAYUSA* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ Y EDAD", aprobado bajo el mecanismo de titulación de tesis, fue realizado por Denice Mariela Arias Carrillo, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa



Noroska Gabriela Salazar Mogollón
C.I: 1757494453



Karel Diéguez Santana
C.I: 1756444129



Zulay Marina Niño Ruiz
C.I: 1157560303

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, la Sociedad Alemana de Cooperación Internacional (GIZ) y la empresa ADIMAQ por su generoso financiamiento para llevar a cabo este proyecto de investigación. También quiero reconocer a Kallari por su colaboración logística en la recolección de muestras.

Agradezco sinceramente a Giovani Grefa por facilitar el contacto con los agricultores, compartir sus historias, mitos y conocimientos ancestrales conmigo. Mi gratitud se extiende a las agricultoras Lupita Grefa, Ibeth Andy y Carola Grefa, propietarias de las chakras, por enseñarnos sus métodos de cultivo y conocimientos ancestrales, siempre recibiéndonos con hospitalidad.

Asimismo, agradezco a los miembros del grupo "Valorización de *Ilex guayusa*. Un acercamiento metabolómico, funcional y aplicativo" y al Laboratorio de Productos Naturales, donde realicé mi tesis. Mi reconocimiento especial a MSc. Evencio Joel Medina, MSc. Nina Espinosa de los Monteros, Ing. Melanie Ochoa y Ing. Jefferson Pastuña por su apoyo activo en el desarrollo de mi investigación, siendo piezas fundamentales en el éxito de este trabajo.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros y amigos cercanos en este proyecto, Tomás Garzón y Mateo Fernández, quienes han sido un apoyo constante a lo largo de nuestros proyectos de investigación, mostrando la amabilidad y solidaridad que caracteriza nuestra amistad.

Finalmente, agradezco enormemente a mi tutora PhD. Noroska Salazar y mis cotutores PhD. Karel Diéguez y PhD. Zulay Niño por guiarme desde los primeros pasos de mi educación universitaria, motivar mi aprendizaje y compartir momentos significativos que atesoro. Su orientación ha sido fundamental en mi desarrollo académico y personal.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios que ha sido mi guía y mi fortaleza, a mis padres Silvia Carrillo y Agustín Arias con los que he contado incondicionalmente, también a mis hermanos Carla Arias y David Arias que han sido un pilar fundamental durante toda mi vida y mi camino académico. Además, se la dedico a mis cuñados John Alejandro y Carolina Vinueza quienes han sido como mis hermanos desde que los conocí y quienes me han brindado su apoyo durante mi carrera. Mi familia ha sido desde el principio quienes me apoyaron y me dieron ese soplo de aliento que necesitaba para estudiar lejos de ellos, ahora sé que cada momento tendrá su recompensa.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD..... ii

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL..... iii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....

¡Error! Marcador no definido.

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

INDICE DE TABLAS ix

ÍNDICE DE FIGURAS x

INDICE DE ANEXOS xii

RESUMEN..... xiii

ABSTRACT xiv

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes 1

1.2. Planteamiento del problema 3

1.3. *Justificación de la investigación* 4

1.4. Objetivos de la investigación 6

1.4.1. *General* 6

1.4.2. *Específicos* 6

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA 7

2.1. Recolección de materia vegetal 7

2.2. Lavado y deshidratado 8

2.3. Preparación del extracto acuoso liofilizado 8

2.4. Análisis de compuestos volátiles por medio de cromatografía gaseosa
acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-MS) 9

2.4.1. *Preparación de muestra* 9

2.4.2. *Tratamiento de datos* 9

2.4.3. *Identificación de compuestos volátiles y semivolátiles en bibliotecas públicas.* 10

2.4.4. Identificación de los estándares de referencia	10
2.4.5. Análisis estadístico del volatiloma de <i>I. guayusa</i>	11
2.5. Determinación de capacidad antioxidante	11
2.5.1. Método ABTS.....	11
2.5.2. Método DPPH.....	13
2.5.3. Análisis estadístico de capacidad antioxidante	14
CAPÍTULO III. RESULTADOS	15
3.1. Recolección de material vegetal	15
3.2. Obtención del extracto acuoso liofilizado de las muestras de guayusa bajo las condiciones de estudio.....	15
3.3. Perfil de compuestos identificados en el extracto acuoso de <i>I. guayusa</i>	16
3.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los extractos acuosos de <i>I. guayusa</i>	17
3.5. Actividad antioxidante de los extractos acuosos de las hojas de <i>I. guayusa</i>	22
3.5.1. Método ABTS.....	22
3.5.2. Método DPPH.....	25
3.5.3. Análisis estadístico de la capacidad antioxidante de las hojas de <i>I. guayusa</i> ...	28
4.1. Recolección de material vegetal	30
4.2. Obtención del extracto acuoso liofilizado de las muestras de guayusa bajo las condiciones de estudio.....	30
4.3. Perfil de compuestos identificados en el extracto acuoso de <i>I. guayusa</i>	31
4.4. Actividad antioxidante en las hojas de <i>I. guayusa</i> bajo las condiciones de estudio.....	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Diseño experimental para el análisis de extractos de <i>I. guayusa</i>	14
Tabla 2-3: Metabolitos verificados en bibliotecas espectrales mediante el software MSDIAL.....	16
Tabla 3-3: Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto a la capacidad antioxidante equivalente al trolox para los métodos ABTS y DPPH.....	28
Tabla 4-4: Compuestos identificados en el extracto acuoso de las hojas de <i>I.</i> <i>guayusa</i> y sus propiedades.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3: Plano principal del PCA de los perfiles metabolómicos de <i>I. guayusa</i> en diferentes condiciones de luz y edad que se representan en “Grupo” en Alto Talag, Alto Pano y Alto Tena (A, B y C respectivamente) que se representan en “Chakra”	18
Figura 2-3: Plano principal del PCA de los perfiles metabolómicos de <i>I. guayusa</i> en diferentes condiciones de luz y edad (4 a 6 años; 6 a 10 años)	19
Figura 3-3: Círculo de correlaciones del PCA (loadings) con los picos cromatográficos encontrados en el perfil metabólico de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes condiciones de luz y en Alto Talag, Alto Pano y Alto Tena.....	20
Figura 4-3: Mapa de calor de los metabolitos identificados en los extractos de <i>Ilex guayusa</i> bajo diferentes condiciones de luz y edad (4 a 6 años; 6 a 10 años).....	22
Figura 5-3: Curva de calibración del estándar trolox por el ensayo ABTS.....	23
Figura 6-3: Concentración inhibitoria media del extracto acuoso de <i>Ilex guayusa</i> bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica (Sombra, de 0 a 300 y luz, mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena.....	24
Figura 7-3: Capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método ABTS del extracto acuoso de <i>Ilex guayusa</i> bajo diferentes condiciones de luz en dónde (sombra, 0 a 300 PPFD y luz, mayor a 300 PPFD) y en Talag, Alto Pano y Alto Tena.....	25
Figura 8-3: Curva de calibración del estándar trolox por el ensayo DPPH.....	25
Figura 9-3: Concentración inhibitoria media por el método DPPH del extracto acuoso de <i>Ilex guayusa</i> bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica (sombra “-”, de 0 a 300 y luz “+”, mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena.....	26
Figura 10-3: Capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método DPPH de los extractos acuosos de <i>Ilex guayusa</i> bajo diferentes condiciones de	

intensidad lumínica (sombra, 0 a 300 PPFD y luz, mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto por el método DPPH.....	27
Figura 11-3: Prueba de Tukey para la Capacidad antioxidante equivalente al trolox del extracto acuoso de <i>I. guayusa</i> bajo diferentes condiciones de luz (+ luz, - sombra), edad (T0 de 4 a 6 años, T1 de 6 a 8 años y T2 de 8 a 10 años) y Chakra (A; Talag, B; Alto Pano y C; Alto Tena).....	29

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Registro en Excel de los parámetros utilizados en el software MS-DIAL.
- Anexo B:** Verificación de la identidad espectral de los estándares cafeína, teobromina y teofilina en la base de datos NIST 20.
- Anexo C:** PCA con la corrección del efecto Drift por medio de regresión cúbica integrada entre las funciones del paquete “notame”.
- Anexo D:** Código de los compuestos volátiles y semivolátiles del extracto acuoso de las hojas de Ilex guayusa
- Anexo E:** Imagen satelital de la chakra de Talag con coordenadas 1°04'59.5"S 77°53'24.6"W perteneciente a la agricultora Lupita Grefa.
- Anexo F:** Imagen satelital de la chakra de Alto Pano con coordenadas 1°00'08"S 77°53'36"W perteneciente a la agricultora Ibeth Andy.
- Anexo G:** Imagen satelital de la chakra de Alto Tena con coordenadas 0°56'21.4"S 77°52'31.1"W perteneciente a la agricultora Carola Grefa.
- Anexo H:** PCA de los grupos control del extracto acuoso de las hojas de I. guayusa.
- Anexo I:** Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) e interacciones en el análisis ANOVA para el método ABTS.
- Anexo J:** Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) e interacciones en el análisis ANOVA para el método DPPH.
- Anexo K:** Análisis estadísticos (ANOVA y TUKEY) de la capacidad antioxidante equivalente al trolox para los métodos ABTS y DPPH.

RESUMEN

Ilex guayusa, un árbol nativo de la Región Amazónica, ha despertado interés en la industria como bebida energizante y por sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, la optimización de las condiciones de cosecha para maximizar el aprovechamiento de estos productos aún está en desarrollo. Este proyecto evaluó el perfil de compuestos volátiles bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica y estado de maduración en Talag, Alto Pano y Alto Tena, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron compuestos como acetofenona, 4-Vinilguaiacol, 4-metoxifenol, ácido benzoico y chalcona que incrementaron en condiciones de sombra en un rango de edad de 6 a 10 años, mientras teobromina y 1-metilpípecolato de etilo fueron más abundantes en plantas de 4 a 6 años. El perfil de componentes identificados mostró una variación en la abundancia de muestras cosechadas en rangos de edad entre 4 a 6 años y 6 a 10 años, así como en aquellas cosechadas en condiciones de luz y sombra, mientras el sitio de cosecha no mostró ningún impacto significativo. Por otro lado, la capacidad antioxidante evaluada mediante los métodos ABTS y DPPH sí se vio influenciada por luz, edad y ubicación. Muestras cosechadas en alto Pano en ausencia de luz y con edades en un rango de 6 a 10 años presentaron mayor capacidad antioxidante, lo cual sugiere que, aunque la composición volátil no se ve afectada por la localización de la chakra, el perfil de compuestos de mayor masa molecular probablemente varía significativamente de acuerdo al sitio de cosecha.

Palabras clave: antioxidantes, chakra, GC-MS, *Ilex guayusa*, volatiloma.

ABSTRACT

Ilex guayusa, a tree native to the Amazon region, has attracted interest in the industry as an energy drink and for its antioxidant properties. However, the optimization of harvesting conditions to maximize the utilization of these products is still under development. This project evaluated the profile of volatile compounds under different conditions of light intensity and ripening stage in Talag, Alto Pano and Alto Tena, using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Compounds such as acetophenone, 4-Viniloguaiacol, 4-methoxyphenol, benzoic acid and chalcone were identified, which increased under shaded conditions in an age range from 6 to 10 years, while theobromine and ethyl 1-methylpipercolinate were more abundant in plants aged 4 to 6 years. The profile of identified components showed a variation in the abundance of samples harvested in age ranges between 4 to 6 years and 6 to 10 years, as well as in those harvested under light and shade conditions, while the harvest site did not show any significant impact. On the other hand, the antioxidant capacity evaluated by ABTS and DPPH methods was influenced by light, age and location. Samples harvested in high Pano in the absence of light and with ages ranging from 6 to 10 years presented higher antioxidant capacity, suggesting that, although volatile composition is not affected by chakra location, the profile of higher molecular mass compounds probably varies significantly according to harvest site.

Key words: antioxidants, chakra, GC-MS, *Ilex guayusa*, volatiloma

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Ilex guayusa Loes (*I. guayusa*) pertenece a la familia Aquifoliaceae, es un árbol silvestre representativo de la región amazónica del Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia (Radice et al., 2017). También se cultiva en regiones subtropicales andinas. Se estima que puede llegar a crecer de 6 hasta 10 metros y presenta un follaje denso (García Barriga & Schultes, 1992). Además, se reconoce esta especie debido a que “el tronco tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura del pecho, corteza blanca y textura lisa. Las ramas son extendidas y flexibles. Las hojas son coriáceas, verde-oliváceas, enteras, oblongo-elípticas, simples, alternas, coriáceas, dentadas” (Schultes, 1972). Se estima que *I. guayusa* está lejanamente emparentada con *Ilex paraguayensis* (yerba mate), y con *Ilex vomitoria* (el yaupon) (Schultes, 1972).

I. guayusa ha sido citado en numerosas investigaciones sobre colecciones arqueológicas precolombinas, antiguos manuales históricos y estudios etnobotánicos, consolidando su reputación como la planta más relevante en la vida cotidiana de las comunidades amazónicas kichwas (Innerhofer et al., 2011, como se citó en Radice et al., 2017). Además, se menciona en bibliografía que para los Jesuitas en Ecuador *I. guayusa* representó una fuente de ingresos debido a su alta demanda como bebida diaria para la salud humana y como ritual de purificación al limpiar el estómago, denominándose como “bebida mágica” (Radice et al., 2017). Dueñas et al. (2016) mencionan otras aplicaciones de la guayusa como remedio para la gripe, calmante de dolores corporales, repelente de insectos y mordeduras de serpientes y usado para evitar el envejecimiento (Villacís-Chiriboga, 2017). En un análisis fitoquímico realizado previamente se reporta que las hojas de *I. guayusa* contienen como principales metabolitos a la cafeína, teobromina, compuestos fenólicos, flavonoides además de guanidinas, los cuales tienen propiedades terapéuticas (Radice et al., 2017).

Las plantas, siendo organismos capaces de realizar fotosíntesis, cuentan con un metabolismo primario compartido por todos los seres vivos. Además, poseen un metabolismo secundario que les capacita para sintetizar y almacenar una variedad de compuestos químicos, que contribuyen como mecanismo de defensa cuando las plantas se encuentran en condiciones de peligro, por ataque de herbívoros, microorganismos y en presencia de otras especies que compiten por la obtención de nutrientes, luz y agua (J. Silva, 2022). El conjunto de compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas con diferentes estructuras y funciones, no participan de forma directa en los procesos fotosintéticos, sin embargo, los mismos reportan poseer propiedades antitumorales, antibacterianas y antioxidantes que son de gran utilidad en las industrias farmacéuticas (Melo, 2014). Los antioxidantes son conocidos por contribuir en la prevención de mecanismos de oxidación producidos por radicales libres. Estas reacciones se caracterizan por ser el resultado de la presencia de moléculas inestables producidas de manera endógena por medio de reacciones biológicas presentes en procesos metabólicos normales y de defensa. De forma exógena, los radicales libres son producidos por la radiación como la luz ultravioleta (UV), humo del tabaco, contaminación, entre otros, dichas causas desencadenan la oxidación de las biomoléculas presentes en el organismo como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, causando la generación de inflamación, envejecimiento y la aparición de enfermedades (Ruiz Benitez, 2020). Por ejemplo, un estudio demostró que en los extractos de *Ilex paraguariensis*, a causa de su contenido de polifenoles, existe una protección a las células del epitelio pigmentario de la retina del daño inducido por el estrés oxidativo (Tate et al., 2020).

Por otro lado, se conoce que la exposición a la luz solar es un componente abiótico esencial requerido por las plantas para la fotosíntesis, el crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, La irradiación excesiva puede causar daños en las plantas como reducir su crecimiento. Así mismo, la falta de luz solar también puede disminuir la absorción de energía luminosa e inhibir el crecimiento y rendimiento de las plantas al afectar la tasa fotosintética neta. Sin embargo, numerosos metabolitos secundarios que son considerados esenciales para prevenir enfermedades pueden

limitar el uso de la planta cuando se encuentran en condiciones elevadas. Por ejemplo, se encontró que en *Camellia sinensis* (Té negro) la calidad y cantidad de polifenoles en las hojas de té están influenciadas por la intensidad de la luz. Además, en condiciones de sombra, se ha observado que aumenta la concentración de ciertos polifenoles, como las catequinas, que son responsables de propiedades antioxidantes del té negro (Li et al., 2020). Otro estudio realizado en condiciones de sombra en las hojas de *Tithonia diversifolia* que posee un alto contenido de polifenoles, obtuvo mayor contenido total de polifenoles conforme aumentaba el crecimiento de la planta (Scull et al., 2022). Dichos estudios sugieren que la intensidad de la luz tiene diferentes efectos sobre la acumulación de metabolitos secundarios en diferentes plantas. Por consiguiente, es fundamental determinar el momento óptimo de cosecha cuando la producción de antioxidantes es una prioridad (Li et al., 2020). Estos factores ambientales y agronómicos interactúan para determinar la calidad y cantidad de metabolitos secundarios producidos en las plantas de café (Arias et al., 1990).

De la misma manera, durante el desarrollo y madurez, se producen reacciones bioquímicas que afectan los niveles de estos componentes, por ejemplo, a medida que avanzan hacia la senescencia, aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, el metabolismo secundario puede activarse para la reparación celular, dependiendo de la disponibilidad de estos metabolitos en la planta. Por ejemplo, en algunas hierbas, como la salvia (*Salvia officinalis*) y el tomillo (*Thymus vulgaris*), se han demostrado variaciones en la concentración de aceites esenciales y otros compuestos a medida que envejecen (Acosta, 2011).

1.2. Planteamiento del problema

La Amazonía ecuatoriana, es la zona que presenta la mayor cantidad de plantas usadas con fines etnomédicos como *Ilex guayusa* que ha sido consumida tradicionalmente por comunidades indígenas (Villacís-Chiriboga, 2017). La forma más común de preparación es por medio de infusiones acuosas mediante ebullición para consumo diario, debido a sus efectos estimulantes y beneficios para la salud (Villacís-Chiriboga, 2017). Hasta el

momento, se reconoce la importancia de los principales metabolitos presentes en *I. guayusa* como los fenoles y flavonoides. Así como su relación directa con la capacidad antioxidante de una solución, la cual es producida por la transferencia de electrones que estabilizan los radicales libres, inhibiendo las reacciones de oxidación, evitando el desarrollo de enfermedades que están relacionadas con estas reacciones oxidativas (Ruiz Benitez, 2020). Sin embargo, la información sobre el volatiloma y la actividad antioxidante de este cultivo, así como su relación con factores de cosecha, es limitada, lo que dificulta la comprensión de la relación entre la medicina popular y las aplicaciones farmacéuticas. En este sentido, tanto la radiación solar, la etapa fisiológica y la ubicación geográfica de la planta influyen en los cambios metabólicos y alteran el contenido de compuestos bioactivos, como fenoles y flavonoides, relacionados con la actividad antioxidante. Por lo que, es fundamental comprender la influencia de estas variables sobre *I. guayusa* con la finalidad de establecer las condiciones más adecuadas para su cosecha (Riachi et al., 2018).

1.3. Justificación de la investigación

De los cuatro géneros de la familia Aquifoliceae, el género *Ilex* es el de mayor valor económico, debido a que posee un gran número de especies utilizadas como plantas ornamentales y medicinales (Radice et al., 2017). Actualmente, hay interés por investigar los compuestos bioactivos como los polifenoles y alcaloides, que se encuentran de forma natural en las plantas. Esta tendencia se debe principalmente a los efectos positivos que estos compuestos tienen en la salud humana. En este contexto, se puede corroborar científicamente su potencial antioxidante y comprender mejor los mecanismos de acción que sustentan sus propiedades terapéuticas. Esta validación científica ayuda a respaldar y ampliar el conocimiento tradicional de las comunidades indígenas y culturas locales, al proporcionar evidencia objetiva sobre los beneficios para la salud de los compuestos naturales utilizados en la medicina tradicional.

Además, la caracterización de ingredientes activos de origen natural, permite identificar nuevas moléculas o identificar aquellas no descritas antes para una especie en

particular, en este caso, con posible actividad antioxidante. Este tipo de descubrimientos puede tener implicaciones importantes en la industria farmacéutica y de suplementos alimenticios, así como en la formulación de productos cosméticos y productos para el cuidado de la salud. En resumen, este enfoque de investigación ayuda a validar y aprovechar el potencial terapéutico de los ingredientes naturales, respaldando así la información etnomedicinal y etnobotánica transmitida a lo largo de generaciones.

La caracterización metabolómica no direccionada de compuestos volátiles también conocida como volatiloma, representa un paso fundamental que permite explorar de manera amplia y sin restricciones el perfil de compuestos presentes en el extracto acuoso de las hojas de *I. guayusa* bajo diversas condiciones de luz solar y edad de la planta. En lugar de enfocarse en componentes específicos previamente identificados, este enfoque analiza de manera integral y sin sesgos la diversidad de metabolitos presentes. Los estudios posteriores pueden utilizar esta información para dirigir sus esfuerzos en el análisis metabolómico no direccionado con enfoque a moléculas con mayor polaridad y masa molecular a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, para luego de una identificación completa trabajar hacia la obtención de moléculas puras o extractos enriquecidos que muestran actividades biológicas prometedoras. Al conocer la diversidad y abundancia de metabolitos presentes en las muestras bajo las condiciones de estudio, se pueden seleccionar aquellos que se consideren más relevantes para el estudio en cuestión, optimizando así los recursos y esfuerzos en la búsqueda de compuestos con actividades específicas. Dada su importancia cultural y económica, es fundamental fomentar un cultivo sostenible de *I. guayusa* que garantice que su recolección beneficie a las comunidades locales y sea realizado de manera respetuosa con el medio ambiente.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. General

Determinar el volatiloma y capacidad antioxidante bajo la influencia de diferentes condiciones de intensidad lumínica y estado de maduración de los extractos de las hojas de *I. guayusa*.

1.4.2. Específicos

Determinar el perfil de compuestos volátiles presentes en las muestras de *I. guayusa* por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Analizar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de hojas recolectadas de *I. guayusa*.

Analizar mediante métodos estadísticos la incidencia de las variables en el volatiloma de los extractos acuosos de las hojas de *I. guayusa*.

Evaluar los factores favorables para la óptima recolección de hojas de *I. guayusa* que maximizan la actividad antioxidante y la obtención de los metabolitos secundarios de interés.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Recolección de materia vegetal

Las hojas fueron recolectadas en 3 chakras diferentes (A, B y C) que fueron georreferenciadas. Las tres chakras seleccionadas se encuentran en la provincia de Napo situada al centro norte del país, en la zona geográfica conocida como Región Amazónica, específicamente en los sectores de Talag (A), Alto Pano (B) y Alto Tena (C) pertenecientes al cantón Tena. En el caso específico de *I. guayusa*, por ser cultivada en un lugar cálido y soleado, Las muestras fueron tomadas cumpliendo las condiciones de sombra en un rango 0 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz [+] en mediciones superiores a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Carrasco, 2009). La edad de los árboles se dividió en 3 diferentes períodos: 4 a 6 años (temprano [0]), 6 a 8 años (medio [1]) y de 8 a 10 años (tardío [2]). Además, se contó con el permiso de investigación MAATE-CMARG-2023-0017 el cual se obtuvo en la plataforma del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE).

Los agricultores que forman parte de la Asociación Wiñak de las diferentes chakras proporcionaron los árboles que se encontraban en las diferentes edades seleccionadas. Se visualizó la posición en que se encuentra el árbol con respecto a sus condiciones de luz o sombra y se realizaron varias mediciones de PPFD (Densidad de flujo de fotones fotosintéticos) para determinar si cumple con la condición. Las hojas fueron recolectadas bajo el mismo principio etnobotánico utilizado por los agricultores, que consiste en seleccionar ramas sin “gogoyos”, es decir, sin brotes jóvenes. Solo se recolectaron hojas de color verde oscuro, ya que los agricultores mencionaron que las hojas maduras son más oscuras y adecuadas para el secado, a diferencia de las hojas jóvenes de color más claro, que a menudo no se secan bien debido a su alto contenido de humedad. Las hojas recolectadas se envolvieron en papel periódico etiquetado con los tipos de variable correspondientes y se almacenaron en una hielera con geles fríos.

2.2. Lavado y deshidratado

Las impurezas se retiraron sumergiendo las hojas de *I. guayusa* en agua potable, después las hojas fueron colocadas sobre papel absorbente en una bandeja de aluminio por 30 minutos, para la remoción del agua de manera lenta y gradual para no causar la pérdida de propiedades químicas. Adicionalmente, se realizó un secado artificial de 15 a 17 horas con la temperatura no mayor a 45 °C dentro de la estufa para evitar la volatilización de los componentes activos de la planta (J. Silva, 2022). Posterior al secado, se procedió a conservar las hojas secas en bolsas ziploc con protección de luz solar, calor y humedad (J. Silva, 2022).

2.3. Preparación del extracto acuoso liofilizado

El extracto acuoso total se obtuvo de la maceración de 10 g de hojas de *I. guayusa* seca y triturada con ayuda de una licuadora, con 100 mL de agua destilada durante un periodo de 9 días con 20 minutos de ultrasonido por día, los extractos obtenidos se filtraron al vacío y liofilizaron para la obtención del extracto total concentrado (Tevez & Wendel, 2016). El rendimiento se calculó como el porcentaje de masa del extracto en relación con la masa inicial de las hojas utilizadas (**ecuación 1**) en base a técnicas de extracción, en donde explican los fundamentos de cálculo de rendimientos en dichos procesos (Trost & Fleming, 1992).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Masa del extracto liofilizado}}{\text{Masa de las hojas trituradas}} \right) * 100 \quad (1)$$

2.4. Análisis de compuestos volátiles por medio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-MS)

2.4.1. Preparación de muestra

Se tomaron 5 mg de cada extracto acuoso liofilizado de las hojas de *I. guayusa* y se disolvieron en 1 mL de metanol de grado analítico, la mezcla se centrifugó por 3 minutos a 10000 rpm con la finalidad de eliminar partículas. De la misma manera se prepararon soluciones estándar de cafeína, teobromina, teofilina, ácido clorogénico y ácido málico. Además, se utilizó el blanco de procesamiento y el control de calidad (QC) que es el resultado de una alícuota de cada extracto de muestra. El análisis GC-MS de las muestras del extracto de hojas de *I. guayusa* se realizó con un cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP2020NX equipado con un inyector split/splitless y con una columna capilar Rtx-5 (30 m x 0.25 mm I.D. x 0,25 μ m df). En primer lugar, la temperatura del horno se fijó a 70 °C durante 1 min y luego se aumentó la temperatura a 300 °C a razón de 6 °C/min durante 55 min. La temperatura final fue de 280 °C en 20 min a razón de 5 °C/min, mientras que la temperatura del inyector fue de 220 °C y la del detector de 290 °C. Se inyectó 1 μ L de volumen en modo *splitless*. El helio fue usado como gas portador a un caudal de 1 mL/min. La temperatura de la fuente de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron en 200 °C, el rango de barrido de masas fue de 50 a 500 Da. Todos los análisis se realizaron por triplicado (Ali et al., 2021).

2.4.2. Tratamiento de datos

Los cromatogramas obtenidos de la caracterización de los metabolitos presentes en los extractos acuosos de *I. guayusa* fueron tratados mediante quimiometría, para lo cual, los archivos Shimadzu (*.qgd) de los datos espectrales que no estaban procesados, fueron convertidos primero a (*.mzXML) en LabSolutions y después a (*.mzML) en el software ProteoWizard. Tras obtener los datos espectrales en (*.mzML) se procedió a procesarlos en MS-DIAL ver. 4.9.221218, en el cual se realizó la detección de picos,

alineación, recuperación de información y otros parámetros registrados en el **Anexo 1** (Lai et al., 2018). La lista de picos cromatográficos (*.txt) y espectro (*.mgf) fueron almacenados en el repositorio (https://github.com/AriasDenice/VolatilomaGuayusa_DeniceArias).

2.4.3. Identificación de compuestos volátiles y semivolátiles en bibliotecas públicas

El resultado de la alineación (*.mgf) que se obtuvo de MS-DIAL fue exportado a Redes Moleculares Sociales de Productos Naturales Globales (GNPS, por sus siglas en inglés), se realizó mediante el uso de la documentación de GNPS (Aksenov et al., 2021). La identificación de los metabolitos se seleccionó de forma manual con el uso de una tolerancia de Índice de Retención de Kovats de 10 entre el valor experimental y la literatura o bases de datos (Libro de Excel disponible en (https://github.com/AriasDenice/VolatilomaGuayusa_DeniceArias)).

2.4.4. Identificación de los estándares de referencia

Los espectros de los estándares fueron identificados en MS-FINDER que es una base de datos interna, en la cual, se utilizó 0.02 Da de tolerancia m/z, 1% de remoción de ruido y un rango de masa de 50-500 m/z, con un 70% de coincidencia espectral mínima. Además, la identidad espectral de los estándares fue respaldada, por medio de la base de datos NIST 20 con el software NIST MS Search 2.3 (**Anexo 2**). Finalmente, el archivo (*.mgf) de los espectros de los estándares se identificaron en MS-DIAL, como parámetros se utilizaron 10 unidades de tolerancia para el Índice de Retención, 0,075 minutos y 0.2 Da de tolerancia, mínimo de IE y 70% de identificación, dichos metabolitos se consideraron de nivel 1 acorde a Sumner et al. (2007).

2.4.5. Análisis estadístico del volátiloma de *I. guayusa*

Se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) por medio de R v.4.3.2 (R development) para determinar tendencias de agrupación entre las distintas muestras. Para lo cual, se exportó la tabla de picos cromatográficos (*.txt) de MS-DIAL para el análisis estadístico y control de la calidad de los datos con el paquete “notame” de R (<https://github.com/antonvsdata/notame>) (Klãvus et al., 2020). Los procedimientos realizados en R se encuentran en (https://github.com/AriasDenice/VolatilomaGuayusa_DeniceArias). Finalmente, se generó el mapa de calor, con la finalidad de identificar la variabilidad en concentración de los metabolitos identificados.

2.5. Determinación de capacidad antioxidante

2.5.1. Método ABTS

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó el método espectrofotométrico ABTS, la reducción colorimétrica fue realizada acorde al protocolo de Arnao et al. (2001) con ajustes de Thaipong et al. (2006), se preparó una solución de cationes radicales ABTS•+ (ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM) en agua destilada y se incubó en la oscuridad a 25 °C durante 12 horas. Luego, la solución se diluyó con etanol al 96 % hasta lograr una absorción de $0,700 \pm 0,005$. Para la curva de calibración, se utilizó como estándar trolox y las absorbancias fueron monitoreadas a 734 nm en un espectrofotómetro UV-VIS-NIR modelo UV-3600. Se realizó una calibración con seis concentraciones del estándar, para lo cual se preparó una solución madre 906 µM, se pesó 5.13 mg de trolox en 10 mL de etanol absoluto con agitación durante 5 minutos. Se prepararon 6 concentraciones de la curva de calibración (10, 25, 50, 100, 200, y 400) µM en un volumen final de 1 mL de etanol 96%. El porcentaje de inhibición fue calculado según la ecuación (2) (Cano et al., 2023).

$$\%PI = \left(1 - \left(\frac{A - A'}{A^0}\right)\right) \quad (2)$$

Donde, (A^0) corresponde a la absorbancia del Blanco + ABTS^{•+}; (A') representa la absorbancia del estándar trolox + blanco y (A) es la absorbancia del trolox + ABTS^{•+}. El blanco se preparó en proporción 2:1 (etanol:agua), las soluciones se prepararon por triplicado, es importante mencionar que la mezcla del estándar con ABTS^{•+} (A), fue incubada en la oscuridad durante 6 minutos para continuar con la lectura. Para las muestras de *I. guayusa* se realizó un porcentaje de inhibición exploratorio, para esto se preparó una solución madre a una concentración de 2000 ug/mL y se calculó el porcentaje de inhibición de una dilución de la madre que se encontraba a 100 ug/ml siguiendo la **ecuación(2)**. Con base en el porcentaje de inhibición obtenido se prepararon 6 concentraciones distintas de la muestra (100, 133, 166.7, 200, 233.3 y 300) μ g/mL. Similar al procedimiento realizado con el estándar, la muestra con el radical ABTS^{•+} se dejó incubar durante 6 minutos para medir la absorbancia. Finalmente, se calculó el IC₅₀ y los resultados se expresaron como valores TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) μ M/g como se indica en las **ecuaciones 3 y 4**, respectivamente (Sridhar & Charles, 2019).

$$IC_{50} = EXP\left(\frac{50-b}{a}\right); y = a \ln(x) - b \quad (3)$$

$$TEAC = \left(\frac{IC_{50} Trolox}{IC_{50} muestra}\right) \quad (4)$$

La medición de la capacidad antioxidante se realiza mediante su reacción con el catión radical ABTS^{•+}, disminuyendo la intensidad del color. El radical ABTS^{•+} es soluble en medios polares y apolares, y no se ve afectado por la fuerza iónica, permitiendo evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos en extractos de plantas y fluidos biológicos. Este método es ideal para compuestos coloreados, como los antocianos, reduciendo las interferencias de los pigmentos (Ruiz Benitez, 2020).

2.5.2. Método DPPH

La actividad antioxidante se determinó utilizando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), en base el protocolo de Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución patrón de 2 mg de DPPH en 6 mL de etanol absoluto, la cual fue almacenada en refrigeración y cubierta con papel aluminio para protegerla de la luz. Para la curva de calibración se usó trolox como estándar y se preparó una solución madre 906 μM . Para lo cual se pesó 5.13 mg de trolox en 10 mL de etanol absoluto con agitación, luego se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (25, 55, 75, 100, 200, 400) μM en un volumen final de 1 mL de etanol. Con las absorbancias registradas se calculó el porcentaje de inhibición del estándar tal como se describió para el ensayo de ABTS **ecuación 2**. Donde, (A°) representa la absorbancia del etanol absoluto + DPPH; (A') representa la absorbancia del extracto + etanol absoluto y (A) representa la absorbancia del extracto de *I. guayusa* + etanol absoluto + DPPH (Sridhar & Charles, 2019). Las soluciones se prepararon por triplicado, se agitaron y se dejaron incubar por 30 minutos para continuar con la lectura. Para las muestras de *I. guayusa*, se preparó una solución madre de 2000 $\mu\text{g/mL}$. Se calculó el porcentaje de inhibición exploratorio **ecuación 2** con una muestra de guayusa que se encontraba en una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Con base en este porcentaje de inhibición exploratorio se prepararon las muestras de guayusa con concentraciones de (50, 100, 200, 400, 600 y 800) $\mu\text{g/mL}$. En primer lugar, para cada concentración se realizaron soluciones de la muestra con DPPH y agua destilada, se agitó por vórtex por un minuto y se dejó incubar por 30 minutos en un agitador de placas para posteriormente medir la absorbancia a 515 nm. Finalmente, se calculó el IC_{50} (**fórmula 3**) y los resultados se expresaron como valores TEAC expresando en $\mu\text{M/g}$ (**fórmula 4**), los cuales se compararon con la evidencia de la literatura.

2.5.3. *Análisis estadístico de capacidad antioxidante*

Se aplicó un diseño experimental factorial con niveles mixtos con bloques de 3 variables, dos con tres niveles y una con dos niveles (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diseño experimental para el análisis de extractos de *I. guayusa*

Ubicación		Chakra A (Talag)		Chakra B (Alto Pano)		Chakra C (Alto Tena)	
Condición de luz		+	-	+	-	+	-
Edad	0 (4-6 años)	A0+	A0-	B0+	B0-	C0+	C0-
	1 (6-8 años)	A1+	A1-	B1+	B1-	C1+	C1-
	2 (8-10 años)	A2+	A2-	B2+	B2-	C2+	C2-

Se realizó un análisis de varianza en R para evaluar la significancia y validez de los datos de TEAC. Se realizó la prueba Shapiro–Wilk, homocedasticidad y la prueba de Durbin-Watson como pruebas paramétricas para comprobar los supuestos del ANOVA (Normalidad de los residuos, Homogeneidad de la varianza y Asunción de independencia de los residuos). Como complemento al análisis ANOVA se utilizó la prueba de comparaciones múltiples Turkey para determinar las diferencias específicas entre pares de grupos mientras que ANOVA detectó diferencias globales significativas entre Chakra, luz y sombra (Gorjanović et al., 2012).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Recolección de material vegetal

A través de varias visitas, se llevó a cabo la selección de las chakras para el estudio, detallando su ubicación, altitud y descripción. En Talag ($1^{\circ}04'59.5''\text{S}$ $77^{\circ}53'24.6''\text{W}$, 504 msnm), dicho espacio posee una alta diversidad de alimentos y especies plantadas, cada una ocupa su sección asignada, incluyendo la guayusa (**Anexo 5**). En Alto Pano ($1^{\circ}00'08''\text{S}$ $77^{\circ}53'36''\text{W}$, 365 msnm), en este caso, los árboles de guayusa comparten espacio con árboles de cacao y palmeras de chonta, manteniendo una distancia aproximada de un metro por árbol, aunque algunas palmeras generan sombra sobre los árboles de guayusa (**Anexo 6**). Por otro lado, en Alto Tena ($0^{\circ}56'21.4''\text{S}$ $77^{\circ}52'31.1''\text{W}$, 665 msnm), las plantas de guayusa compiten con varios árboles y palmeras, a pesar de una separación irregular de entre uno y 3 metros entre cada uno, enfrentándose también a la competencia de algunos arbustos (**Anexo 7**). Por lo tanto, se recolectaron muestras de 54 árboles de guayusa que cumplieran con las condiciones de estudio en las diferentes chakras, para lo cual se escogieron tres árboles por cada condición, posteriormente cada muestra fue etiquetada y agrupadas para cada combinación de variables.

3.2. Obtención del extracto acuoso liofilizado de las muestras de guayusa bajo las condiciones de estudio

Se obtuvieron un total de 18 extractos acuosos liofilizados de las hojas de *I. guayusa* (6 por cada chakra) de los cuales se obtuvieron 0.8 gramos de extracto liofilizado por cada 10 gramos de hojas de *I. guayusa* trituradas. El cálculo del rendimiento se realizó para evaluar la eficiencia del proceso y la calidad del extracto obtenido, el resultado fue de 8%.

3.3. Perfil de compuestos identificados en el extracto acuoso de *I. guayusa*

Se obtuvo una lista con 1825 picos cromatográficos como metabolitos en el software MS-DIAL con sus respectivos espectros, de los que se encontraron 72 coincidencias buscando en GNPS (ID=6e58e53bada34fba9520a4799583da6a) a partir de los espectros de MS-DIAL. Se verificaron parámetros claves de identificación por GC-MS como los índices de retención, así se identificaron un total de 13 metabolitos. Adicionalmente, se identificaron 7 compuestos adicionales comparando los espectros de los componentes con los resultados encontrados en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST-2020, por sus siglas en inglés) (**Tabla 2**).

En este sentido, la identificación se clasificó en dos grupos, (a) aquellos realizados en nivel 1 - a través de estándares puros; (b) nivel 2 - a través de librerías públicas, coincidencia de fragmentos obtenidos, tiempos de retención e índice de retención.

Tabla 2. Metabolitos verificados en bibliotecas espectrales mediante el software MSDIAL.

ID	TR (min)	*EI Score	IR E	IR L	Nombre
IL1D	25.64	0.86	1862.6	1848	Cafeína
IL1D	25.86	0.85	1870	1874	Teobromina
IL1D	26.00	0.85	1880	1900	Teofilina
IL2D	9.97	0.84	1198.6	1197	1,2-Bencenodiol
IL2D	9.03	0.80	1160	1159	Ácido Benzoico
IL2D	49.66	0.79	28.31	2832	Supraeno
IL2D	10.38	0.78	1214.5	1213	3-Aminofenol
IL2D	13.00	0.76	1316.9	1317.5	4-Vinilloguaiacol
IL2D	26.96	0.75	1923.1	1926	Ácido hexadecanoico, 2-metil-
IL2D	13.42	0.71	1333.2	1343	Ácido 3-Fenilpropionico
IL2D	13.92	0.83	1352.9	1357	Fenol, 2,6-dimetoxi-
IL2D	27.85	0.84	1959.9	1970.6	Chalcona
IL2D	22.264	0.75	1703	1697	2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitropona
IL2D	7.43	0.77	1094.2	1090	4-Metoxifenol
IL2D	32.22	0.71	2105.5	2102	Hidroxiflavona
IL2D	13.617	0.83	1341	1314	Resorcinol
IL2D	8.362	0.71	1133	1191	1-metilpipecolinato de etilo

<i>IL2D</i>	19.168	0.78	1567	1569	Acetofenona
<i>IL2D</i>	23.037	0.89	1740	1736	2,5-Dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona
<i>IL2D</i>	10.462	0.75	1218	1224	Cumarina
<i>IL2D</i>	18.353	0.84	1533	1490	Purina
<i>IL2D</i>	19.546	0.83	1583	1608	1-amino-2-metilnaftaleno
<i>IL2D</i>	24.517	0.75	1809	1816	1H-indol-3-carboxaldehído

***Nivel de Score para la identificación de metabolitos de los extractos acuosos de *I. guayusa*.**

En este caso, IL2D, representa la identificación de nivel 2 en GNPS del tratamiento con MS-DIAL; para los metabolitos identificados con nivel 1 corresponde el producto punto de MS-DIAL y para los metabolitos identificados con nivel 2 corresponde al coseno de GNPS; Tr, tiempo de retención; IR E, Índice de Retención experimental; IR L, Índice de Retención de la literatura.

Los metabolitos cafeína, teobromina y teofilina, se identificaron comparando espectros de estándares que se tomaron como controles positivos. En estos, el espectro de la muestra y el estándar coincidieron en más de un 85% en GNPS y en NIST.

3.4. *Análisis de Componentes Principales (PCA) de los extractos acuosos de I. guayusa.*

El uso de PCA implica crear un sistema de variables recién definidas conocidas como componentes principales (CP). El primer PC abarca la mayoría de la información presente en el conjunto original de datos, mientras que el segundo componente engloba la máxima variación restante, y este patrón continúa en orden secuencial. Los resultados del análisis de PCA son gráficos de "scores" y de "loadings". Por medio del gráfico de "loadings" se pudo determinar la correlación entre las variables, cada variable cuenta con un valor de "loading" en cada componente principal que indica en qué extensión dicha variable contribuye al CP. Por otro lado, el gráfico de "scores" representa diferencias y/o similitudes entre las muestras lo cual ayuda a buscar agrupamientos

entre las mismas, dicho valor describe el comportamiento de una muestra con respecto a sus variables (Airado-Rodríguez et al., 2017).

El plano principal del PCA, mostrado en la **Figura 1**, representa el agrupamiento entre las muestras de *I. guayusa* bajo las condiciones de luz y edad de estudio agrupados en tres Chakras: Alto Pano, Alto Tena y Talag. El primer componente principal (PC1) explica el 47.77% de la variabilidad total, mientras que el segundo componente principal (PC2) explica el 17.23%. En dicho gráfico no es posible apreciar una clara separación entre las muestras en las condiciones de estudio, sin embargo, se observa un patrón de agrupamiento según la edad de la planta, en aquellas cosechadas en condiciones de luz en edades comprendidas entre 6-8, 8-10 años, separadas de las cosechadas bajo condiciones de luz con una edad de 4-6 años. Además, las muestras cosechadas en sombra tienden a agruparse en el cuadrante derecho. Por lo tanto, se reestructura el análisis eliminando el factor "chakra" y reestructurando el análisis en cuanto a la edad, ya que no fue posible distinguir muestras cosechadas de 6-8 años con aquellas de 8-10 años.

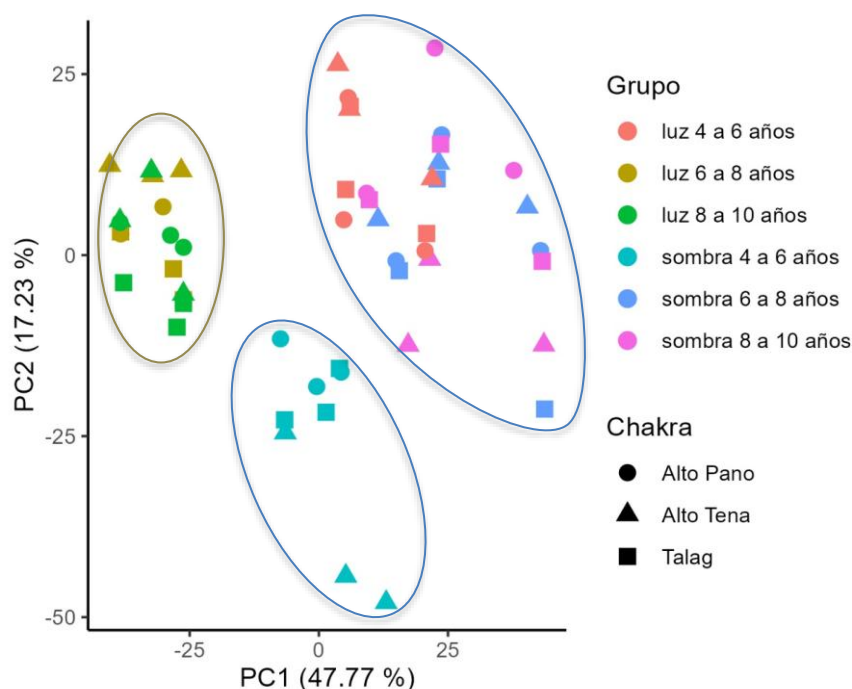


Figura 1. Plano principal del PCA de los perfiles metabolómicos de *I. guayusa* en diferentes condiciones de luz y edad que se representan en "Grupo" en Alto Talag, Alto Pano y Alto Tena (A, B y C respectivamente) que se representan en "Chakra".

En la **Figura 2**, es más notable el agrupamiento entre las muestras, entre grandes grupos, el primero corresponde a aquellas cosechadas en condiciones de luz y agrupadas en el cuadrante negativo de la PC1, que además son las mismas que cumplen con el rango de edad entre 6-10 años. El segundo grupo corresponde a aquellas cosechadas en condiciones de luz con una edad entre 4-6 años, las mismas se encuentran agrupadas cerca del origen de la PC1, estas a su vez comparten similitudes con las cosechadas en sombra con una edad entre 6-10 años, sin embargo, cabe destacar que estas últimas también muestran una distribución hacia la PC1 positiva. El último grupo se encuentra en el origen de la PC1 y en el cuadrante negativo de la PC2 corresponde a las muestras cosechadas en condición de sombra con una edad promedio entre 4-6 años. Por consiguiente, se mantiene una clara separación según las condiciones de luz y edad.

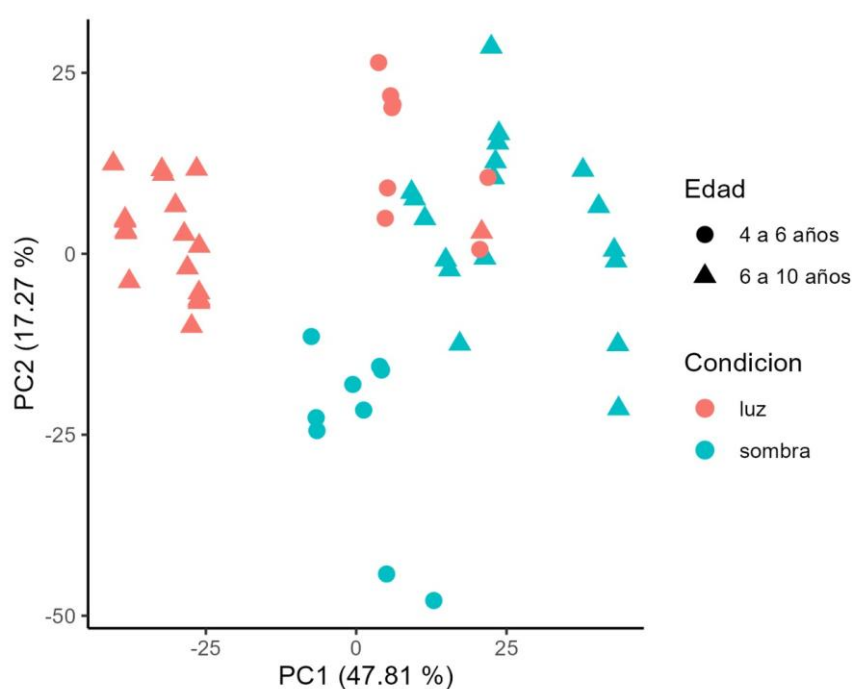


Figura 2. Plano principal del PCA de los perfiles metabólicos de *I. guayusa* en diferentes condiciones de luz y edad (4 a 6 años; 6 a 10 años).

Con la finalidad de visualizar las relaciones entre las variables y el agrupamiento observado, se proporciona el gráfico de loadings. En donde es posible verificar cuáles son los metabolitos más influyentes en la variabilidad observada en los datos de *I. guayusa* bajo diferentes condiciones de luz y edad (**Figura 3**). En la figura, se observa el

círculo de correlaciones del PCA en donde cada punto representa un compuesto (variable). Donde los puntos de color azul representan los metabolitos identificados de nivel 1 y los puntos de color rojo representan los metabolitos identificados de nivel 2, el criterio se debe a Sumner et al. (2007). En el gráfico, las variables en este caso los metabolitos identificados, pueden indicar, correlación con el agrupamiento visto en las componentes principales (**Figura 2**). Los metabolitos que se encuentran en un mismo cuadrante del círculo están positivamente correlacionados entre sí y contribuyen de manera similar a los componentes. Por ejemplo, los metabolitos acetofenona y 2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitropona se encuentran en la PC 1 positiva sugiriendo que ambos están correlacionados y PC1 positiva, contribuyen significativamente a la agrupación encontrada en dicha PC. En contraste, los metabolitos 1H-indol-3-carboxaldehído y cafeína, se encuentran en la PC2 negativa sugiriendo que estos compuestos contribuyen significativamente a la agrupación de las muestras en dicha componente principal.

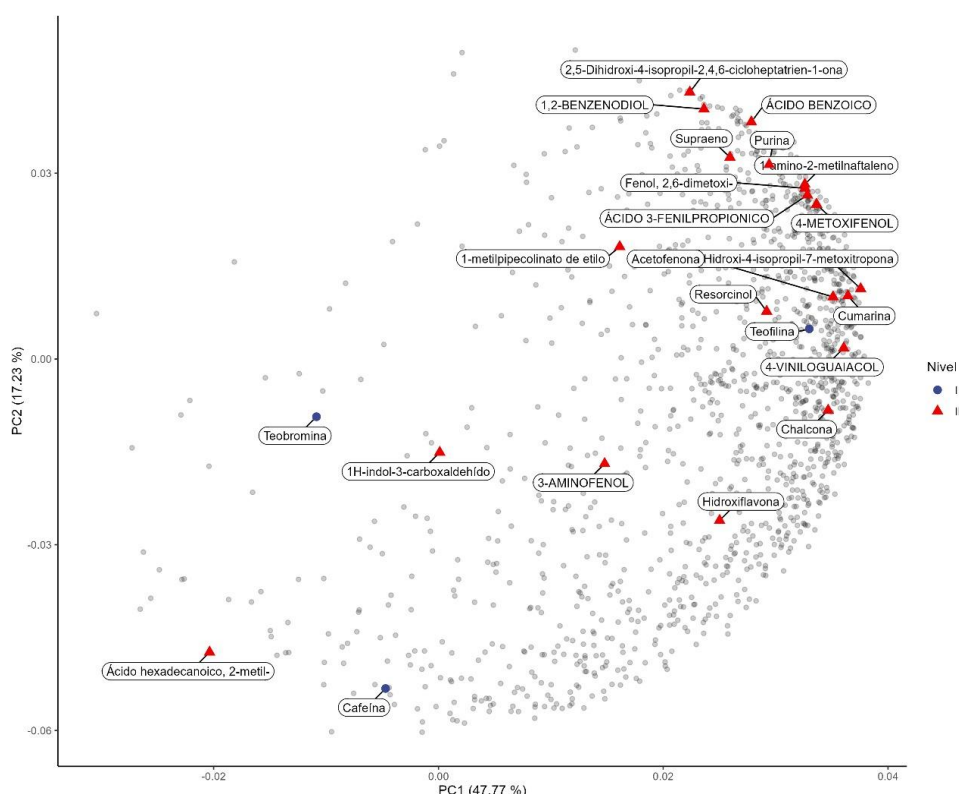


Figura 3. Círculo de correlaciones del PCA (loadings) con los picos cromatográficos encontrados en el perfil metabólico de *Ilex guayusa* en diferentes condiciones de luz y en Alto Talag, Alto Pano y Alto Tena.

Con la finalidad de conocer la abundancia de los compuestos bajo las condiciones de luz y sombra se procedió a generar el mapa de calor (**Figura 4**). En donde, los compuestos fueron agrupados en cinco superclases: fenólicos, ácidos carboxílicos, flavonoides, fitosteroles y alcaloides, indicados por colores específicos en la parte superior del gráfico. En primer lugar, se muestran los compuestos como la **acetofenona**; **2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitrotona**; **4-Vinilguaiacol**; **ácido 3-Fenilpropionico**; **4 metoxifenol**; **1-amino-2-metilnaftaleno**; **fenol**, **2,6-dimetoxi-** y **2,5-Dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona** que presentan una mayor abundancia (color blanco) en muestras recolectadas en sombra de 6 a 10 años y en luz de 4 a 6 años. Así mismo, compuestos como: **1H-indol-3-carboxaldehido**, **hidroxiflavona**, **resorcinol** y **teofinlina** tienen mayor abundancia en luz en edades de 6 a 10 años. Asimismo, el **ácido benzoico** se observa que su mayor abundancia está en muestras de sombra de 6 a 10 años y también en luz de 4 a 6 años. Por otro lado, los compuestos con mayor abundancia (color blanco a rojo) son: **1,2-Bencenodiol**, **supraeno**, **chalcona**, **purina** y **3-aminofenol** en donde se observa una mayor abundancia en muestras de 6 a 10 años en condiciones de sombra, la **cumarina** muestra un leve aumento de abundancia en muestras de sombra de 6 a 10 años. La **teobromina** y el **1-metilpipecolinato de etilo**, muestran mayor abundancia en condiciones de luz de 4 a 6 años. El **ácido hexadecanoico**, **2-metil-** tiene mayor abundancia en luz de 6 a 10 años y sombra de 4 a 6 años. Cabe destacar, que la **cafeína** muestra una alta abundancia en todas las muestras. Este análisis sugiere que la condición de luz afecta significativamente la composición química de las hojas de *I. guayusa*. En general, la producción de alcaloides se ve favorecida por la luz, mientras que la sombra favorece la producción de fenoles y ácidos carboxílicos. Por ejemplo, los compuestos pertenecientes a la superclase de los fenoles, como el **Resorcinol** y la **Cumarina**, muestran una mayor abundancia en condiciones de sombra. Asimismo, los compuestos como **1,2-Bencenodiol** y **Supraeno**, que son de la superclase de los ácidos carboxílicos, tienen una mayor abundancia en condiciones de sombra en hojas de 6 a 10 años.

En contraste, los alcaloides como la **teobromina** y el **1-metilpipecolinato** de etilo son más abundantes bajo luz, especialmente en hojas de 4 a 6 años. Los fitosteroles como

el **ácido hexadecanoico, 2-metil-** también muestran mayor abundancia en condiciones de luz, particularmente en hojas de 6 a 10 años.

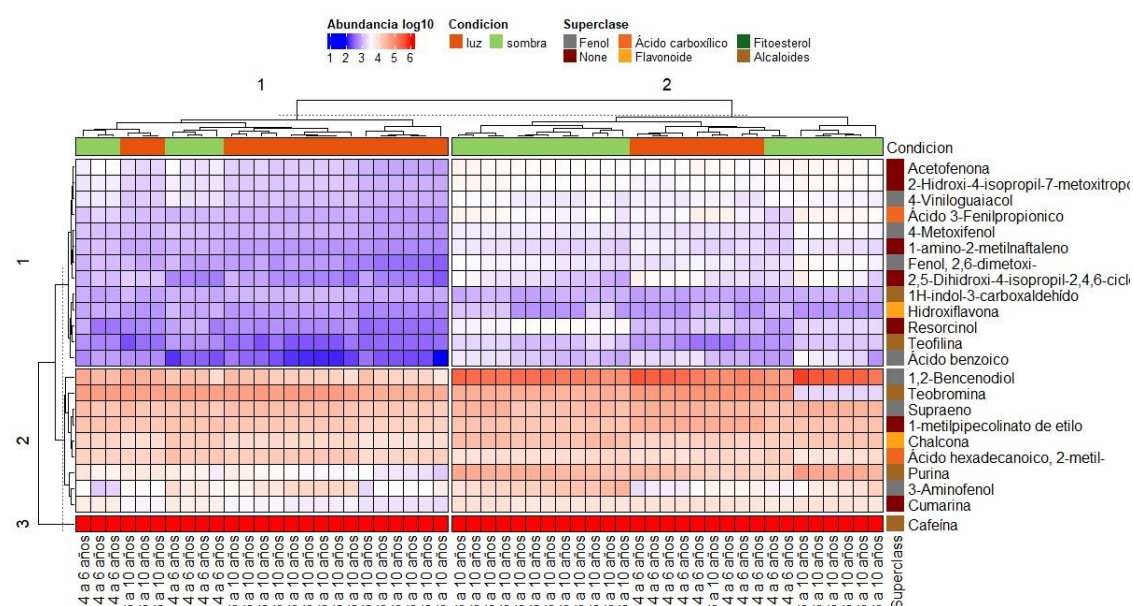


Figura 4. Mapa de calor de los metabolitos identificados en los extractos de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de luz y edad (4 a 6 años; 6 a 10 años).

3.5. Actividad antioxidante de los extractos acuosos de las hojas de *I. guayusa*

3.5.1. Método ABTS

Se obtuvo la curva de calibración que muestra la relación entre la concentración de trolox que es un antioxidante estándar y el porcentaje de inhibición (**Figura 5**). La curva se obtuvo al medir la absorbancia del radical ABTS^{•+} después de añadir el agente antioxidante (trolox) en distintas concentraciones. Cuanto mayor sea el porcentaje de inhibición registrado, mayor será la capacidad antioxidante de la muestra evaluada. La curva de calibración que se realizó presenta un R^2 de 0,98. Un R^2 cercano a 1 indica un correcto ajuste del modelo a los datos experimentales (Xin & K M Schaich, 2013).

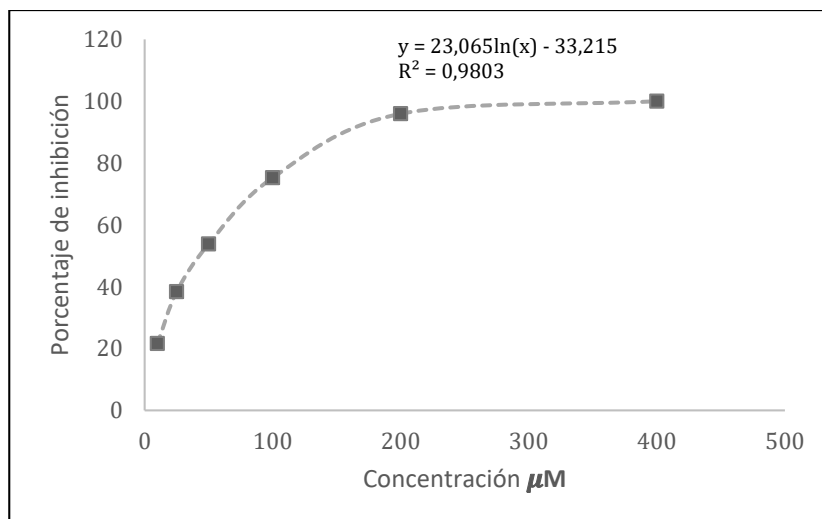


Figura 5. Curva de calibración del estándar trolox por el ensayo ABTS.

3.5.1.1. Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) μg/mL

Se calculó el IC₅₀, este valor representa la concentración necesaria de la muestra para inhibir el 50% de la actividad del radical ABTS^{•+}. Un menor valor de IC₅₀ indica una mayor capacidad antioxidante del compuesto evaluado. De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto acuoso liofilizado de *I. guayusa* demostró una buena eficiencia en la neutralización del radical ABTS^{•+}. La concentración del extracto necesaria para inhibir el 50% de la actividad del radical ABTS^{•+} fue de 100 μg/mL. La neutralización del radical ABTS^{•+} fue mayor en muestras de sombra para las tres chakras, arrojando valores desde 133,11 hasta 233,04 μg/mL (**Figura 6**).

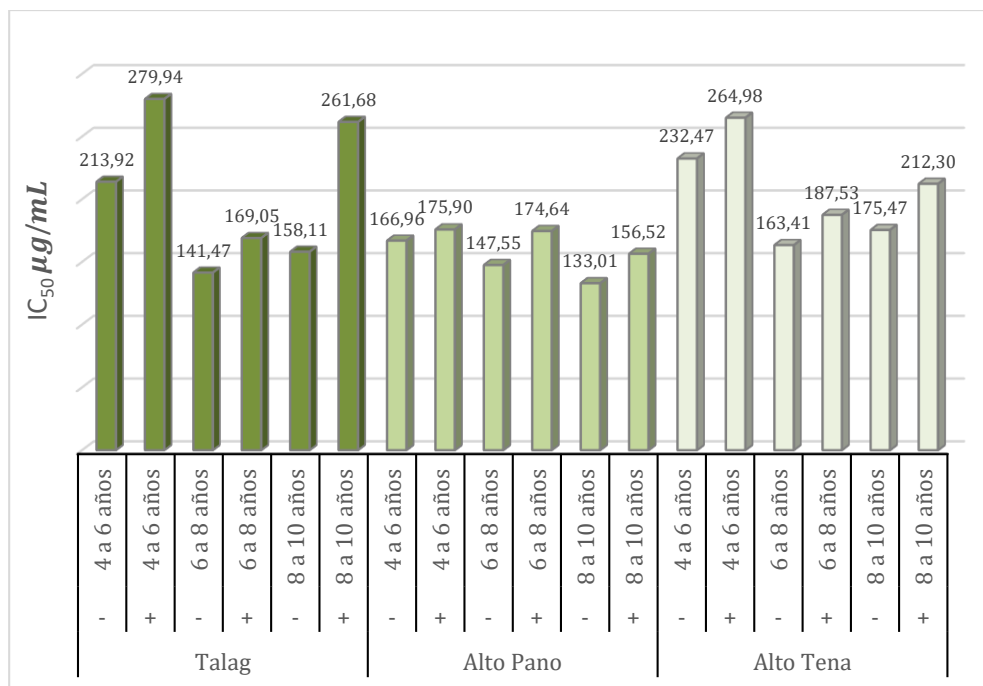


Figura 6. Concentración inhibitoria media del extracto acuoso de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica (Sombra, de 0 a 300 y luz, mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena.

3.5.1.2. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC) $\mu\text{M}/\text{mL}$

El TEAC se refiere a una medida de la capacidad antioxidante de una muestra expresada en términos de la capacidad equivalente de trolox necesario para mostrar la misma capacidad antioxidante. Los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *I. guayusa* medida por el método ABTS se muestran en la **Figura 7**. La mayor capacidad antioxidante se presentó en condiciones de sombra y edad de 8 a 10 años para Talag, Alto Pano y Alto Tena. Lo cual concuerda con los análisis estadísticos presentados en la siguiente sección. Los valores obtenidos para cada chakra fueron: Alto Talag (0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$), Alto Pano (0,32 $\mu\text{M}/\text{mL}$) y Alto Tena (0,21 $\mu\text{M}/\text{mL}$).

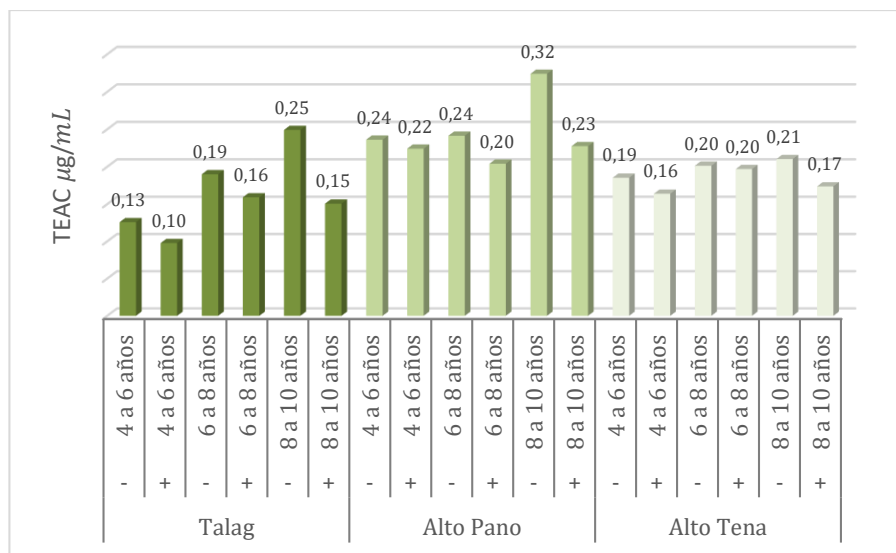


Figura 7. Capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método ABTS del extracto acuoso de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de luz en dónde (sombra, 0 a 300 PPFD y luz, mayor a 300 PPFD) y en Talag, Alto Pano y Alto Tena.

3.5.2. Método DPPH

Para cuantificar la capacidad antioxidante primero se realizó una curva de calibración empleando trolox como estándar (**Figura 8**). La curva se obtuvo al aplicar concentraciones conocidas del estándar trolox al radical DPPH y se registró su absorbancia, la absorbancia medida refleja la cantidad de DPPH reducido, es decir, la capacidad antioxidante del estándar a esa concentración específica. En dicha curva, se obtuvo un R^2 de 0.99 que indica si está correctamente ajustada la ecuación modelada a los datos.

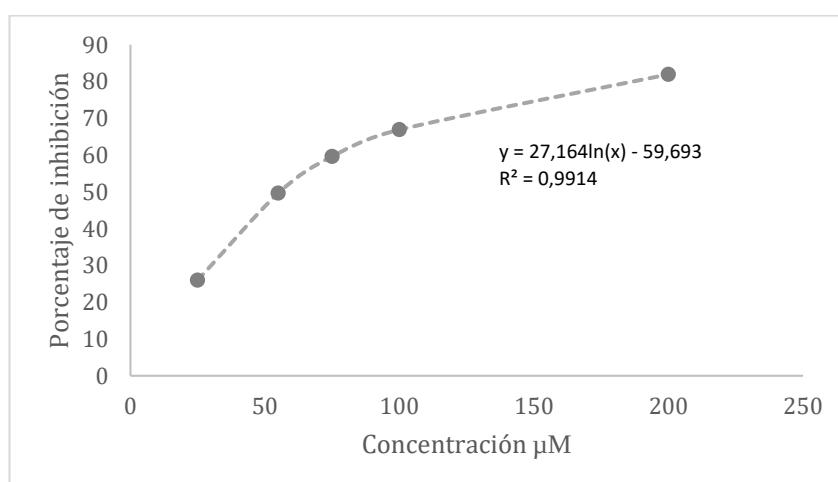


Figura 8. Curva de calibración del estándar trolox por el ensayo DPPH.

3.5.2.1. Concentración Inhibitoria Media (IC_{50}) $\mu g/mL$

En la **Figura 9** se observa el cálculo del IC_{50} de los extractos acuosos liofilizados de *I. guayusa* por el método DPPH. En Talag, los valores más bajos se encuentran en plantas de 8 a 10 años bajo sombra ($147.43 \mu g/mL$) y luz ($185.88 \mu g/mL$), mientras que las plantas de 4 a 6 años bajo luz muestran el valor más alto (372.44). En Alto Pano, las plantas de 4 a 6 años bajo luz tienen el valor más alto ($431.96 \mu g/mL$), y las de 8 a 10 años bajo sombra muestran el valor más bajo ($125.67 \mu g/mL$). En Alto Tena, las plantas de 4 a 6 años en luz presentan el valor más alto ($342.87 \mu g/mL$), y las de 8 a 10 años bajo sombra tienen el valor más bajo ($179.47 \mu g/mL$).

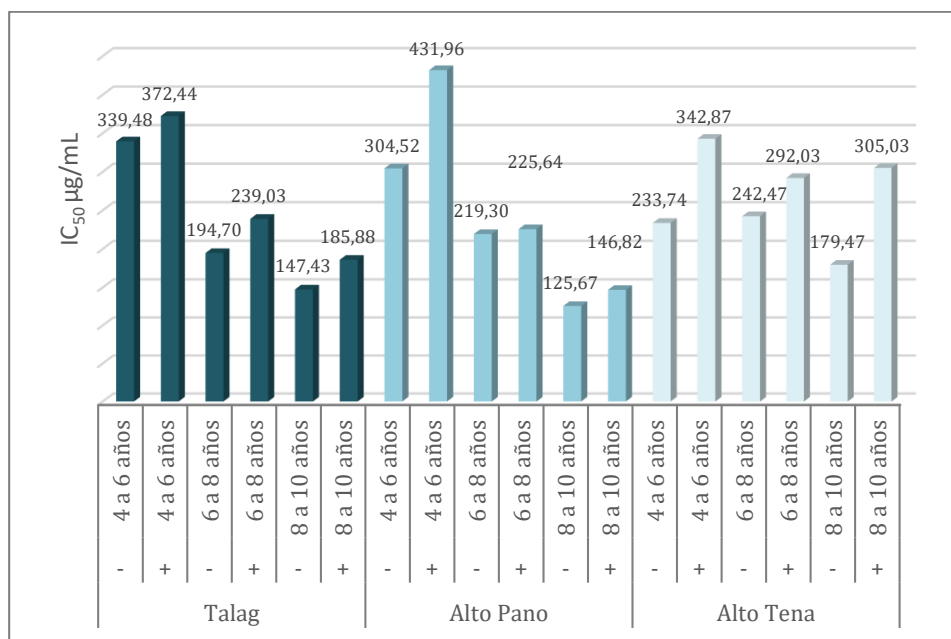


Figura 9. Concentración inhibitoria media por el método DPPH del extracto acuoso de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica (sombra "-", de 0 a 300 y luz "+", mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena.

3.5.2.2. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC) $\mu\text{M}/\text{mL}$

En la **Figura 10** se muestra la capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método DPPH de los extractos acuosos de las hojas de *I. guayusa* en diferentes condiciones de luz y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena. En Talag, los valores más altos se encuentran en plantas de 8 a 10 años bajo luz (0.38), y los más bajos en plantas de 4 a 6 años bajo sombra (0.16). En Alto Pano, las plantas de 8 a 10 años bajo sombra presentan el valor más alto (0.44), mientras que las de 4 a 6 años bajo luz tienen el valor más bajo (0.18). En Alto Tena, las plantas de 8 a 10 años en sombra tienen el valor más alto (0.32), y las de 4 a 6 años en luz presentan el valor más bajo (0.17). En general, se observa que los valores son más altos bajo condiciones de sombra y en plantas de 8 a 10 años en todas las localidades estudiadas.

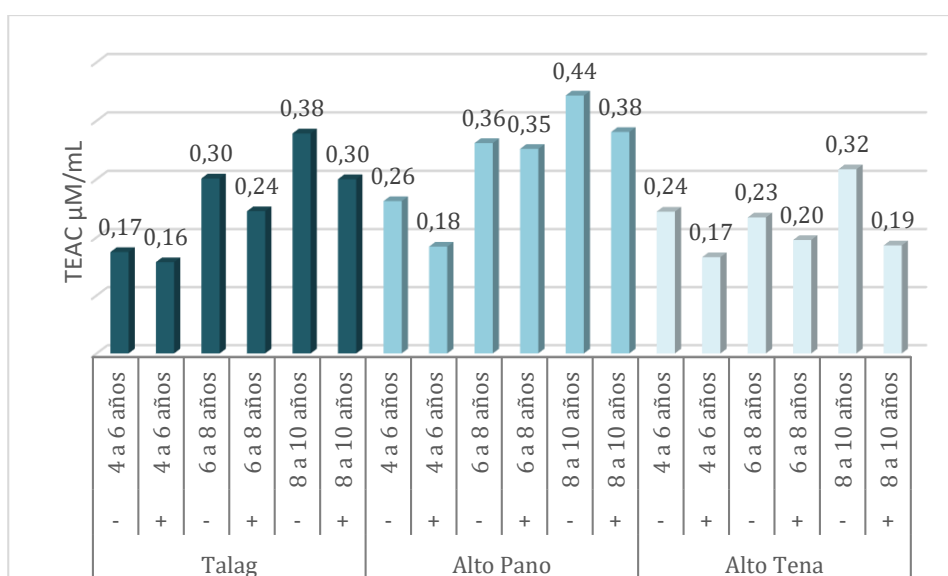


Figura 10. Capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método DPPH de los extractos acuosos de *Ilex guayusa* bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica (sombra, 0 a 300 PPFD y luz, mayor a 300 PPFD) y edad en Talag, Alto Pano y Alto Tena por el método DPPH.

3.5.3. Análisis estadístico de la capacidad antioxidante de las hojas de *I. guayusa*

En los experimentos preliminares de la presente investigación se estudiaron los efectos de tres factores: chakra, luz y edad en la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las hojas de *I. guayusa*. En la **tabla 3** se muestra el análisis de varianza (ANOVA), en donde tanto los factores como sus interacciones (chakra-luz, chakra-edad, luz-edad, chakra-luz-edad) proporcionan resultados estadísticamente significativos ($p < 0.005$). En el método ABTS, los factores individuales tienen mayor impacto y las interacciones también son significativas, aunque con menores valores F (F de Fisher), indicando complejas relaciones entre los factores. Similarmente en el método DPPH, los factores individuales presentan efectos significativos, en donde la edad muestra el mayor impacto y las interacciones también son significativas y con valores F inferiores. Esto sugiere, que todos los factores y sus interacciones afectan significativamente la capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto a la capacidad antioxidante equivalente al trolox para los métodos ABTS y DPPH.

	<i>GL*</i>	<i>SC*</i>		<i>CM*</i>		<i>F*</i>		<i>p*</i>	
		ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
Chakra	2.0	0.0610	0.1065	0.0305	0.0532	549.73	198.00	1.0477e ⁻²⁷	3.7540e ⁻²⁰
Luz	1.0	0.0113	0.0505	0.0113	0.0505	204.21	187.69	2.0737e ⁻¹⁶	7.5210e ⁻¹⁶
Edad	2.0	0.0228	0.1695	0.0114	0.0847	206.07	314.92	1.9400e ⁻²⁰	1.5579e ⁻²³
Chakra:Luz	2.0	0.0040	0.0031	0.0020	0.0015	36.357	5.8104	2.2917e ⁻⁰⁹	6.5024e ⁻⁰³
Chakra:Edad	4.0	0.0136	0.0421	0.0034	0.0105	61.503	39.181	1.3531e ⁻¹⁵	1.1985e ⁻¹²
Luz:Edad	2.0	0.0156	0.0070	0.0078	0.0035	141.26	13.008	9.0478e ⁻¹⁸	5.6014e ⁻⁰⁵
Chakra:Luz:Edad	4.0	0.0050	0.0060	0.0012	0.0015	22.899	5.6163	1.7859e ⁻⁰⁹	1.2817e ⁻⁰³
Residual	36.0	0.0019	0.0096	0.0005	0.0002	ND*	ND*	ND*	ND*

*Notas. GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrado medio, F: F de Fisher, p: Valor de p (Probabilidad), ND: No definido

Finalmente, se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias entre grupos. Esta se caracteriza por ser una prueba de comparación múltiple y es aplicable cuando se comparan más de dos medias. En la **Figura 11**, se detalla que el diagrama A (prueba de ABTS) y B (prueba de DPPH) que miden la capacidad antioxidante en función de las condiciones de cosecha (luz-sombra) presentan un valor p extremadamente

significativo, lo que indica diferencias significativas entre los grupos, en ambos casos la capacidad antioxidante es mayor en ausencia de luz. Por otro lado, en los diagramas C (prueba de ABTS) y D (prueba de DPPH) que muestran el efecto de la capacidad antioxidante en función de la edad de cosecha, muestran que la capacidad antioxidante en tres edades presenta diferencias significativas entre los grupos siendo mayoritaria en aquellas cosechadas en un rango de edad entre 8 a 10 años. Finalmente, los gráficos E (prueba ABTS) y F (prueba DPPH) que expresan la influencia de la localización en la capacidad antioxidante, podemos apreciar como es mayoritaria en Alto Pano, seguida por Talag y menor en Alto Tena.

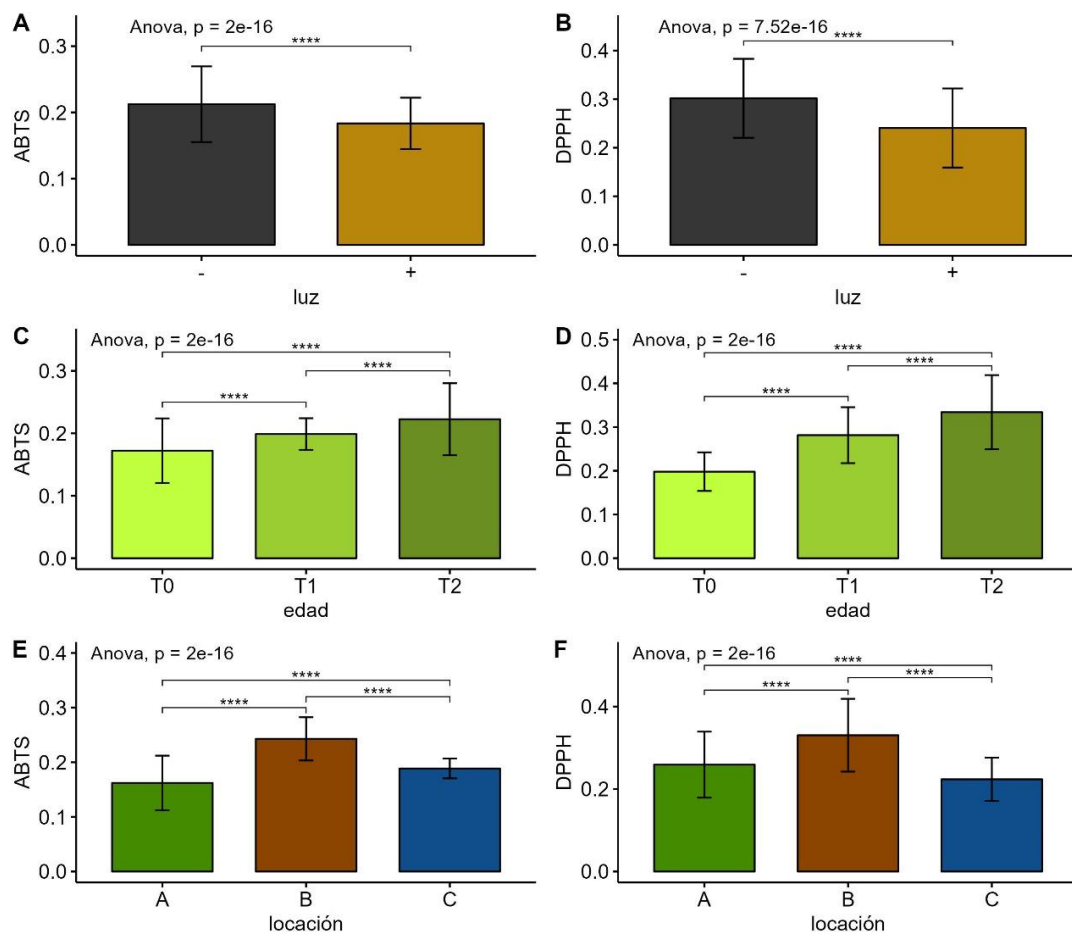


Figura 11. Prueba de Tukey para la Capacidad antioxidante equivalente al trolox del extracto acuoso de *I. guayusa* bajo diferentes condiciones de luz (+ luz, - sombra), edad (T0 de 4 a 6 años, T1 de 6 a 8 años y T2 de 8 a 10 años) y Chakra (A; Talag, B; Alto Pano y C; Alto Tena).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

4.1. Recolección de material vegetal

En el presente estudio, la recolección de hojas de *I. guayusa* se llevó a cabo en tres localidades de la región amazónica del Ecuador: Talag, Alto Pano y Alto Tena. Las tres chakras fueron georreferenciadas y los detalles se encuentran en los **Anexos 5, 6 y 7**, respectivamente. La chakra Talag se encuentra a una altitud de aproximadamente 500 msnm (metros sobre el nivel del mar), Alto Pano, con una altitud de alrededor de 450 msnm y Alto Tena a cerca de 600 msnm. Estas áreas representan una diversidad de entornos en donde la guayusa puede prosperar, de acuerdo con estudios previos que indican su capacidad de crecimiento en valles, laderas de montañas, terrenos planos e incluso huertos y pastizales. Esta planta es adaptable a suelos jóvenes con creciente meteorización y de textura intermedia, preferiblemente arenosa, y puede tolerar problemas de drenaje. Aunque puede adaptarse a suelos compactos, prefiere aquellos que estén bien drenados y sean fértiles (Collaguazo, 2012). Además, las condiciones climáticas y del suelo en estas localidades son propicias para su desarrollo óptimo. Esto se debe a que, *I. guayusa* se desarrolla mejor a temperaturas que oscilan entre los 18 y los 26 °C con una humedad relativa del 70% y a una altitud que va desde los 400 hasta 600 metros sobre el nivel del mar (Quiroz Fuel & Quishpe Guanoluiza, 2013).

4.2. Obtención del extracto acuoso liofilizado de las muestras de guayusa bajo las condiciones de estudio

En el presente estudio se obtuvieron los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *I. guayusa*. Este proceso involucró varios pasos y consideraciones importantes para asegurar la calidad y consistencia del producto final. La técnica de extracción utilizada es eficaz para extraer los compuestos volátiles de las hojas de guayusa, por la alta solubilidad de los compuestos en agua y durante la liofilización se garantizó la preservación de su actividad antioxidante, ya que minimiza la degradación térmica y

oxidativa (Ruiz et al., 2010). Se ha comprobado que la liofilización es un método eficiente para la obtención de extractos acuosos, ya que preserva la actividad biológica de los compuestos presentes. Este proceso implica la eliminación del agua mediante sublimación, lo que permite obtener un extracto en polvo con alta pureza y estable (Herrera & Rodriguez, 2016). Por ello, La técnica de extracción es fundamental en este contexto, debido a que influye directamente en el rendimiento y la composición del extracto. Por ejemplo, en *Ilex vomitoria* (Yaupon), se observó que extractos acuosos liofilizados contienen una gran cantidad de metilxantinas y otros compuestos volátiles, que actúan como antioxidantes e incluso modulan la actividad antioxidante de otros componentes presentes en el extracto (Palumbo et al., 2009).

El rendimiento del 8% obtenido en la extracción acuosa liofilizada en la presente investigación se considera favorable, comparado con un estudio sobre la extracción de compuestos bioactivos del mate por Filip & Ferraro (2003) en donde obtuvieron rendimientos que varían entre 6% y 10%, en donde también se ha demostrado que la maceración y la liofilización son técnicas favorables para la preservación de compuestos volátiles y la actividad antioxidante. Asimismo, en la extracción de compuestos antioxidantes y volátiles de las hojas secas de té verde, se reportaron rendimientos que oscilaban entre 7% y 12% utilizando técnicas similares de extracción (Labbé et al., 2008, como se citó en Theppakorn, 2016).

4.3. Perfil de compuestos identificados en el extracto acuoso de *I. guayusa*

El análisis del perfil volátil de la guayusa proveniente de diferentes chakras, edades de cosecha y condiciones de luz reveló que las dos últimas variables son las que principalmente determinan la variabilidad en la composición de compuestos volátiles (**Figura 2**). Se observaron diferencias significativas en el perfil volátil con respecto a la intensidad lumínica, en donde para la condición de luz se agruparon principalmente en la región del lado izquierdo del gráfico (PC1 negativo). Esta información se respalda con lo obtenido por Reginatto et al. (1999) en donde la acumulación de compuestos como

metilxantinas y compuestos fenólicos en diferentes especies *Ilex* se ve influenciada por la luz directa.

Por otro lado, en la condición de sombra se agruparon principalmente en la región del lado derecho (PC1 positivo). Por ejemplo, un estudio realizado en yerba mate observó que compuestos fenólicos como ácido clorogénico, neclorogénico y criptoquímico tienen mayor acumulación en hojas cultivadas en sombra debido a una respuesta adaptativa al estrés por baja irradiación (Walter et al., 2023). Los compuestos fenólicos actúan como fotoprotectores y antioxidantes, contribuyendo con la planta a mantener su funcionalidad y protegerse contra el daño oxidativo en condiciones de menor luz solar (Kumar et al., 2023).

Además, la agrupación por edad de 4 a 6 años: en muestras de luz se agruparon en la parte superior izquierda (PC2 positivo) y las muestras de sombra se agruparon en la parte inferior y media derecha del gráfico (PC2 negativo). Finalmente, las muestras en edades de 6 a 10 años se agruparon en luz en la parte media izquierda del gráfico, mostrando una tendencia hacia valores neutros o ligeramente positivos en PC2 y para sombra se agruparon en la parte superior y media derecha del gráfico, con valores (PC2 positivo). La combinación de edad y exposición a la luz crea una interacción compleja que puede ser observada eficazmente en el PCA. Por ejemplo, las plantas más jóvenes pueden responder de manera diferente a las condiciones de luz en comparación con las plantas de mayor edad. Se reportó en Filho et al. (2015) que la edad de las plantas en yerba mate afecta la concentración de compuestos bioactivos, a mayor edad el perfil químico es más complejo debido a la acumulación de metabolitos secundarios lo largo del tiempo.

En este sentido, los compuestos que mayormente se expresaron en condiciones de luz en un rango de edad de 6 a 10 años fueron 1H-indol-3-carboxaldehído, hidroxiflavona, resorcinol y teofilina, los cuales entran en la superclase de fenoles y flavonoides, mientras que en sombra fueron 1,2-bencenodiol, supraeno, chalcona, purina y 3-aminofenol, en el mismo rango de edad. En un rango de edad de 4-6 años, los componentes en mayor abundancia fueron en condiciones de luz teobromina y 1-

metilpipecolinato de etilo, y de sombra acetofenona, 2-hidroxi-4-isopropil-7-metoxitrotona, 4-vinilguaiacol, ácido 3-fenilpropionico, 4-metoxifenol, 1-amino-2-metilnaftaleno, fenol, 2,6-dimetoxi- y 2,5-dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (**Figura 4**).

Durante el desarrollo de las plantas se generan una cantidad significativa de compuestos fenólicos como parte de su metabolismo secundario, destinados a protegerlas de factores estresantes ambientales, como plagas, exposición solar y temperaturas extremas (Meyer et al., 2006). En este estudio, los fenoles producidos en condiciones de luz incluyen 1H-indol-3-carboxaldehído, hidroxiflavona, resorcinol y teofilina. Sin embargo, una excesiva exposición a la luz puede dañar los compuestos fenólicos debido a la degradación fotoquímica y la oxidación, lo que explica por qué en algunas condiciones, los fenoles presentes en este estudio como 1,2-bencenodiol, supraeno, chalcona, purina y 3-aminofenol se encuentran en mayor abundancia en condición de sombra. Estos compuestos pueden estar más protegidos de la degradación en entornos con menor luz. Estos hallazgos se relacionan con lo encontrado en hojas de yerba mate, donde las hojas más maduras presentaron una mayor cantidad de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides y ácidos fenólicos como ácido clorogénico, ácido caféico y rutina (Coelho et al., 2007).

Además de compuestos fenólicos, se identificaron varios alcaloides fundamentales (**Tabla 4**) como la cafeína presente en mayor abundancia en todas las muestras, teobromina, teofilina y 1H-indol-3-carboxaldehído, estos aumentaban en condiciones de luz de 6 a 10 años y purina en sombra de 6 a 10 años (**Figura 4**). Estos compuestos son reconocidos por sus diversas propiedades bioactivas, incluyendo efectos estimulantes, antioxidantes y terapéuticos. Los alcaloides teobromina y teofilina, presentes en menores cantidades comparados con la cafeína, también tienen efectos estimulantes y relajantes del músculo liso bronquial, siendo útiles en el tratamiento del asma. La teobromina, además, tiene propiedades vasodilatadoras y diuréticas (Azam et al., 2003). Aunque la purina no es un alcaloide estimulante por sí misma, las bases purinas son precursoras de moléculas como la cafeína y teofilina, esenciales en el

metabolismo energético y la señalización celular. El 1H-indol-3-carboxaldehído, identificado en este estudio, posee propiedades antimicrobianas y puede contribuir a la actividad antioxidante general del extracto de *Ilex guayusa*.

En el presente estudio, los alcaloides teobromina y 1-metilpipecolinato de etilo muestran una mayor abundancia en condiciones de luz, especialmente en hojas más jóvenes (4-6 años). Esto se debe a que estos compuestos juegan un papel crucial en la defensa de las plantas y su acumulación es inducida por la luz. Otros estudios han mostrado resultados similares. Por ejemplo, la investigación de Ramírez et al. (2015) también reportó una mayor concentración de teobromina en condiciones de alta irradiación en hojas jóvenes de cacao. Del mismo modo, García et al. (2013) encontraron que la exposición a la luz incrementa la acumulación de alcaloides en plantas de té, destacando que las hojas jóvenes son más receptivas a este estímulo lumínico. La acumulación de alcaloides en respuesta a diferentes condiciones de luz y edad en *Ilex guayusa* es consistente con lo observado en otras especies del género *Ilex*, lo cual podría estar relacionado con la necesidad de la planta de adaptarse a diferentes niveles de estrés ambiental (Silva et al., 2018). La mayor concentración de alcaloides como la cafeína, teobromina y teofilina en condiciones de luz puede estar relacionada con la necesidad de la planta de defenderse contra herbívoros y otros estresores (Silva et al., 2018), mientras que el aumento de purina en condiciones de sombra sugiere una adaptación específica a la baja irradiación (Dartora et al., 2011). Estos patrones de acumulación reflejan una compleja interacción entre el ambiente y la biosíntesis de metabolitos secundarios, subrayando la importancia de las condiciones de cultivo en la optimización de los perfiles químicos de plantas de interés comercial y medicinal (Silva et al., 2018; Dartora et al., 2011).

La relación de estos alcaloides con la actividad antioxidante y terapéutica es significativa. Los alcaloides, en particular la cafeína, han demostrado tener una actividad antioxidante considerable. Los estudios han mostrado que la cafeína puede mejorar la capacidad antioxidante total en diversas matrices biológicas, lo cual es crucial para proteger las células del daño oxidativo, que es un factor clave en el envejecimiento y en la etiología

de muchas enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Azam et al., 2003). Diversos estudios han correlacionado el consumo de compuestos ricos en alcaloides con una reducción en el riesgo de varias enfermedades crónicas. Por ejemplo, la cafeína y la teobromina han sido estudiadas por su potencial en la reducción del riesgo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Costa et al., 2010). Estas propiedades se deben a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer efectos neuroprotectores.

Los ácidos carboxílicos identificados en el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *I. guayusa* se muestran en la **Tabla 4**. El ácido hexadecanoico, 2-metil- (ácido palmítico) identificado en el presente estudio y con mayor abundancia en luz de 6 a 10 años y en sombra de 4 a 6 años, es un ácido graso saturado que se ha encontrado en otras especies del género *Ilex*, como *I. paraguariensis*. Este compuesto es conocido por sus propiedades antioxidantes. Los estudios han mostrado que los ácidos grasos saturados pueden mejorar la estabilidad de las membranas celulares, protegiéndolas contra el estrés oxidativo y reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares (Santos et al., 2018). El ácido 3-fenilpropiónico es otro ácido carboxílico identificado en *I. guayusa*. Este compuesto ha sido menos estudiado en otras especies de *Ilex*, pero su presencia es notable debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El ácido 3-fenilpropiónico actúa como un potente antioxidante, neutralizando los radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo, que es un factor contribuyente en el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Wang et al., 2016). En un estudio realizado por González et al. (2016) se obtuvo que el ácido hexadecanoico, 2-metil-, mostró una mayor abundancia en plantas expuestas a condiciones de luz plena en comparación con aquellas cultivadas en sombra. Además, se observó una concentración significativamente mayor de este compuesto en plantas de mayor edad (6-10 años) en contraste con plantas más jóvenes (1-3 años).

Por otra parte, los flavonoides que son compuestos polifenólicos esenciales para los beneficios terapéuticos de *I. guayusa* y otras especies del género *Ilex* debido a sus propiedades antioxidantes también fueron identificados principalmente la chalcona en condición de sombra en un rango de edad entre 6 a 10 años y la hidroxiflavona en condición de luz y el mismo rango de edad (**Tabla 4**), estos se caracterizan por sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos.

En otras especies de *Ilex*, como la yerba mate, también se han identificado flavonoides que contribuyen a la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de la planta. Estos compuestos han demostrado reducir el riesgo de enfermedades crónicas, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Gugliucci, 1996; Bracesco et al., 2011). Por ejemplo, la chalcona, identificada en *I. guayusa* y otras especies de *Ilex*, es conocida por inhibir la proliferación de células cancerosas y reducir la inflamación (Pinho et al., 2015). La hidroxiflavona, también presente en *I. guayusa*, es destacada por su potente capacidad antioxidante y neuroprotectora, ayudando a prevenir enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Costa et al., 2010). Estudios han demostrado que, aunque la producción puede ser menor en comparación con plantas expuestas a luz plena debido a la estimulación de la fotosíntesis, también pueden estar presentes en condiciones de sombra, aunque en menor cantidad (M. J. González et al, 2016; Croteau et al, 1994).

Adicionalmente, se identificaron otros compuestos dentro del volatiloма que de manera similar cumplen un papel fundamental en la capacidad antioxidante de la planta con posibles aplicaciones terapéuticas en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo. Por ejemplo, el resorcinol con mayor abundancia en condición de luz y en un rango de edad de 6 a 10 años, también se ha identificado en *I. paraguariensis*, conocida por su capacidad antioxidante y propiedades terapéuticas (Gugliucci, 1996). Este compuesto tiene propiedades antimicrobianas y antioxidantes significativas, contribuyendo a la neutralización de radicales libres y la prevención del daño celular. La acetofenona, que presentó mayor abundancia en condiciones de luz de 4 a 6 años y en condiciones de sombra de 6 a 10 años, también se ha encontrado en

otras especies de *Ilex*. Este compuesto tiene propiedades antioxidantes y se ha asociado con la reducción del estrés oxidativo, ayudando en la prevención de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (A. G. González et al., 2014). La cumarina con mayor abundancia en condición de sombra de 6 a 10 años, en estudios previos ha mostrado potencial en la prevención de enfermedades crónicas, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, debido a su capacidad para reducir el estrés oxidativo y la inflamación (Cheynier, 2005).

Por otro lado, el 1-amino-2-metilnaftaleno y el 1-metilpípecolato de etilo que aumentaron en condiciones de cosecha de luz de 4 a 6 años, son compuestos menos estudiados en el género *Ilex*, pero su presencia en *I. guayusa* sugiere un potencial antioxidante y bioactivo que merece una mayor investigación. De igual manera, el 2,5-Dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona y el 2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitropona fueron más abundantes en condiciones de luz en un rango de edad de 4 a 6 años y en sombra de 6 a 10 años. Estos compuestos, han sido identificados en otras plantas medicinales, aunque su presencia en el género *Ilex* no ha sido ampliamente documentada, lo que resalta la novedad y el potencial terapéutico del extracto de *I. guayusa*.

Tabla 4. Compuestos identificados en el extracto acuoso de las hojas de *I. guayusa* y sus propiedades.

Clase	Compuestos fenólicos	Propiedades
	1,2-Bencenodiol	Se utiliza como revelador fotográfico, revelador de tintes para pieles, como intermediario de antioxidantes en caucho y aceites lubricantes, en inhibidores de polimerización y en productos farmacéuticos (Ito & Maeno, 1986).
	Ácido benzoico	Se usa como conservante en alimentos y productos cosméticos por sus propiedades antimicrobianas (Hamzah et al., 2011).
	Supraeno	Tiene propiedades antioxidantes y se utiliza en la industria cosmética y en productos para el cuidado de la piel debido a su capacidad para hidratar y proteger la piel contra el daño oxidativo (Kabuto et al., 2013).
	3-Aminofenol	Los aminofenoles son intermediarios en la

Compuestos fenólicos	4-Vinilguaiacol	síntesis de tintes y, por lo tanto, se pueden encontrar en numerosos productos cosméticos, especialmente en tintes para el cabello (Lee & Lin, 2009). Tiene un papel como feromona, agente aromatizante (Dionisio et al., 2018).
	Fenol, 2,6-dimetoxi-	Tiene un papel como antiinflamatorio no esteroideo, un medicamento antiasmático, un analgésico no narcótico, un medicamento para el sistema nervioso periférico (He & Yang, 2009).
	4-Metoxifenol	Se emplea como agente inhibitorio de monómeros acrílicos y acrilonitrilos, así como estabilizador en hidrocarburos clorados y etilcelulosa. Además, funciona como inhibidor ultravioleta y desempeña un papel crucial como intermediario químico en la producción de antioxidantes, productos farmacéuticos, plastificantes y colorantes (Reddy et al., 2003).
Alcaloides	Cafeína	Cumple diversas funciones, sirviendo como estimulante del sistema nervioso central, un psicotrópico, un diurético, un aditivo alimentario, un adyuvante, un metabolito vegetal, un contaminante ambiental, un xenobiótico (Hägg et al., 2000).
	Teobromina	Es vasodilatador, diurético y estimulador del corazón. Tiene un papel como antagonista del receptor de adenosina, un componente alimentario (Yamamoto et al., 2014) (Ford et al., 1998).
	Teofilina	Tiene un papel como fármaco antiasmático, antiinflamatorio, inmunomodulador, antagonista de los receptores de adenosina (Ebisuzaki et al., 1997).
	Purina	Presenta actividades antibacterianas y coccidiostáticas (Meesters et al., 2014).
	1H-indol-3-carboxaldehído	Tiene un papel como metabolito vegetal, metabolito xenobiótico humano, metabolito bacteriano y metabolito marino. Es un heteroarecarbaldehído, un alcaloide indol y un miembro de los indoles (Ross et al., 2022).
Ácidos carboxílicos	Ácido hexadecanoico, 2-metil-	El ácido 2-metilhexadecanoico es un ácido graso ramificado por metilo que es ácido hexadecanoico (palmítico) que lleva un sustituyente metilo en la posición 2. Es un ácido

	Ácido 3-fenilpropionico	graso saturado de cadena ramificada, un ácido graso de cadena larga y un ácido graso metilramificado (Callaghan et al., 2006). Tiene un papel como agente antifúngico, se utiliza como condimento y fragancia (Dionisio et al., 2018).
Flavonoides	Chalcona	Acetofenona en la que uno de los hidrógenos metilo ha sido reemplazado por un grupo bencilideno. Tiene un papel como metabolito (Fu et al., 2013) (<i>Chalcone-PubChem</i> , n.d.).
	Hydroxyflavona	Es una monohidroxiflavona y un miembro de los flavonoles. Es un ácido conjugado de un flavonol (1-), es un tinte de origen vegetal (Schutte-Smith et al., 2019).
Compuestos volátiles y semivolátiles sin subclase identificada	2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitropona	Compuesto utilizado para investigar dopamina y serotonina (National Center for Biotechnology Information, 2024).
	Resorcinol	Es un inhibidor de la eritropoyetina y sensibilizador, y se usa como antiséptico, desinfectante en medicamentos tópicos para tratar afecciones cutáneas como acné, dermatitis seborreica, eczema, psoriasis, callos, callosidades y verrugas. Presenta actividad queratolítica, contribuyendo a la eliminación de la piel dura, escamosa o áspera. Aunque su uso principal es tópico, el resorcinol también se ha documentado por su actividad antitiroidea, aunque no se confía en indicación terapéutica formal en este aspecto (Merker et al., 1982).
	1-metilpípecolinato de etilo	No hay datos disponibles acerca de su aplicación en medicina o en contextos comerciales (Information, 2024).
	Acetofenona	Se emplea como fragancia en jabones y perfumes, así como agente aromatizante en alimentos y disolvente para plásticos y resinas. (Dionisio et al., 2018).
	2,5-Dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona	Es un compuesto de origen natural presente en diversas plantas, como cedros y cipreses. Se ha comprobado que posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (Saniewski et al., 2014).
	Cumarina	Cumple con roles como tinte fluorescente, metabolito vegetal y metabolito humano (Munshi & Row, 2005).
	1-amino-2-metilnaftaleno	Usado para la síntesis de otros compuestos orgánicos (Chen et al., 2024).

4.4. Actividad antioxidante en las hojas de *I. guayusa* bajo las condiciones de estudio

En general, se han adaptado varias técnicas colorimétricas para evaluar la actividad antioxidante y los mecanismos relacionados de los productos naturales. Dentro de los métodos químicos empleados para evaluar la capacidad antioxidante por medio de la captación de radicales libres, destaca el radical ABTS^{•+}, el cual es un método analítico ampliamente utilizado en una amplia distribución de materiales vegetales debido a su rapidez, generando resultados consistentes y reproducibles. Además, el radical ABTS^{•+} exhibe varios puntos máximos de absorción y una excelente solubilidad, lo que posibilita la evaluación de compuestos con características lipofílicas como hidrofílicas (Suriyatem et al., 2017). Por otro lado, el método DPPH es particularmente sensible a los compuestos lipofílicos debido a la naturaleza lipofílica del radical DPPH, además es un ensayo simple, rápido y reproducible (Cabrera et al., 2003). Es por ello, que ambos métodos han sido utilizados para reconocer la influencia de las condiciones de estudio en la capacidad antioxidante de *I. guayusa*.

En este contexto, en la **Figura 7** y **Figura 10** de la presente investigación se muestran los valores de TEAC resultantes de ambos métodos, siendo 0.32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y 0.44 $\mu\text{M}/\text{mL}$ los valores más altos obtenidos por los métodos ABTS y DPPH respectivamente. Estos datos son inferiores en comparación con un estudio realizado en yerba mate en donde se realizó extracción en solución acuosa asistida por ultrasonido con valores de TEAC de $4.20 \pm (\mu\text{mol L}^{-1} \text{ Trolox g}^{-1})$ por el método DPPH y $57.87 \pm 0.49 (\mu\text{mol L}^{-1} \text{ Trolox g}^{-1})$ por el método ABTS, esto se debe a la extracción en agua destilada a 90 °C, que incrementó la capacidad antioxidante en las muestras (Bisognin et al., 2019). De la misma manera, en infusiones de yerba mate se reportaron resultados de la capacidad antioxidante equivalente al trolox por el método ABTS de 1.48 - 1.81 ($\mu\text{mol Trolox/g extracto}$) (Bravo et al., 2007). Por otra parte, en un estudio realizado por Jara et al., 2013 demostraron que los extractos de *I. guayusa* obtenidos mediante extracción etanólica presentaron valores de IC₅₀ superiores, lo cual puede atribuirse a la mayor eficiencia del etanol en extraer compuestos fenólicos, sugiriendo que el solvente utilizado en la extracción por

maceración influye significativamente en la actividad antioxidante medida, además las hojas fueron secadas al sol, lo que puede causar tal variación y por lo tanto afectar la extracción selectiva de compuestos que pueden contribuir a una mayor actividad antioxidante (Arteaga-Crespo et al., 2020).

Los resultados muestran que la ausencia de luz incrementa la capacidad antioxidante de *I. guayusa* (**Figura 11**). Esto está en línea con el estudio de Miranda et al. (2018), que demostró que la exposición a la luz puede reducir la actividad antioxidante en diversas plantas debido a la degradación de compuestos fotosensibles, como los flavonoides y otros fenoles. En el trabajo de Campos et al. (2017) también se demuestra que las hojas de *Ilex guayusa* cultivadas en sombra presentan niveles más altos de polifenoles en comparación con las expuestas a pleno sol. De la misma manera los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con una mayor producción de fenoles como **4-Vinilguaiacol, 4 metoxifenol, fenol, 2,6-dimetoxi-, ácido benzoico, 1,2-Bencenodiol, supraeno, 3-aminofenol** en condiciones de sombra. Los resultados sugieren que los compuestos fenoles y ácidos carboxílicos, más abundantes en sombra según el mapa de calor, están correlacionados con una mayor capacidad antioxidante de la guayusa. Por otro lado, la luz, que promueve la producción de fitosteroles y alcaloides, está asociada con una menor capacidad antioxidante, lo cual concuerda con los valores más bajos de ABTS y DPPH observados bajo luz en los gráficos de Tukey (**Figura 11**).

Adicionalmente, en ambos métodos se observó un incremento en la capacidad antioxidante equivalente al trolox conforme aumenta la edad de la planta, siendo mayor en un rango de edad de 8 a 10 años (**Figura 11**). Lo cual, concuerda con los hallazgos de García-Ruiz et al. (2016), quienes reportaron que las plantas de *Ilex guayusa* más maduras tienen concentraciones más altas de compuestos fenólicos y flavonoides. Esto puede deberse a la mayor acumulación de estos compuestos a lo largo del ciclo de vida de la planta, lo que mejora su capacidad antioxidante. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos durante el análisis, en el cual se ve una mayor concentración de compuestos como **chalcona e hidroxiflavona** en un rango de edad entre 6 a 10 años en condiciones de luz y sombra, respectivamente (**Figura 4**).

Por otro lado, se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la actividad antioxidante con respecto a la localización de la chakra, siendo mayor en Alto Pano que en los otros dos sitios (**Figura 11**). De acuerdo a lo que se pudo observar, la chakra Alto Pano se caracteriza por presentar mayor variabilidad de cultivos, incluyendo árboles de cacao, que podrían contribuir a la capacidad antioxidante de los compuestos debido a la interacción entre diferentes especies vegetales y la posible transferencia de nutrientes en el suelo. La influencia de las condiciones ambientales en la actividad antioxidante de plantas pertenecientes al género *Ilex* ya ha sido reportada, tal es el caso del trabajo de Jiménez et al. (2019) donde se destaca cómo las condiciones ambientales específicas de cada región, incluyendo el tipo de suelo y el clima, pueden afectar la composición química y la actividad antioxidante de *Ilex guayusa*. Asimismo, en la investigación de Pérez et al. (2020) encontraron que las plantas cultivadas en regiones con suelos ricos en nutrientes y condiciones climáticas favorables tenían mayores niveles de antioxidantes.

Los valores de TEAC obtenidos para el método ABTS para todas las variables fueron ligeramente menores en comparación con los del método DPPH, los valores más altos obtenidos fueron 0.32 µg/mL en ABTS y 0.44 µg/mL en DPPH, ambos en muestras de 8 a 10 años y en sombra como se muestra en la **Figura 7** y **Figura 10** respectivamente. Esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza química y la especificidad de cada uno de los métodos en relación con los diferentes tipos de antioxidantes presentes en los extractos. En el presente estudio se identificaron los metabolitos lipofílicos que pudieran contribuir a una mayor capacidad antioxidante obtenida mediante el ensayo con DPPH (**Tabla 2**). El ácido hexadecanoico, 2-metil, también conocido como ácido palmitoleico, es un ácido graso que posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, la chalcona es un flavonoide lipofílico conocido por su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria y la hidroxiflavona es un tipo de flavonoide que, aunque puede tener cierta solubilidad en agua, muestra propiedades lipofílicas significativas que potencian su actividad antioxidante (**Tabla 4**). En estudios similares realizados con otras especies de *Ilex*, como *I. paraguariensis*, se ha observado que los

compuestos lipofílicos también contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante medida por DPPH. Filip et al., (2001) demostraron que los flavonoides lipofílicos y los ácidos grasos presentes en yerba mate incrementan la actividad antioxidante en el ensayo DPPH más que en el ensayo ABTS. Esto sugiere que la afinidad de los compuestos antioxidantes hacia el medio lipofílico del radical DPPH es un factor crucial para los resultados observados. Asimismo, un estudio sobre la actividad antioxidante de extractos de té verde también muestra resultados similares, donde los compuestos lipofílicos, como catequinas y otros flavonoides, presentaron una mayor eficiencia en la reducción del radical DPPH comparado con ABTS (Cabrera et al., 2003). Por otra parte, el ABTS es más sensible tanto a compuestos hidrofílicos como lipofílicos, pero es más sensible a la luz, lo que puede haber causado un menor valor en los resultados de TEAC debido a la degradación o interferencia de los compuestos antioxidantes bajo condiciones luminosas intensas. Por este motivo, dado que existen diferentes tipos de antioxidantes según su naturaleza química, se debe emplear más de un tipo de ensayo antioxidante.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se identificaron 23 metabolitos secundarios, de los cuales 18 fueron identificados en un nivel 2 mediante la búsqueda automatizada en las bibliotecas públicas de GNPS, 7 metabolitos secundarios en NIST y 3 con nivel de identificación 1 mediante estándares de referencia. El perfil volátil evidenció principalmente la presencia de los siguientes metabolitos: fenoles, ácidos carboxílicos, flavonoides, glucósidos, fitoesteres y alcaloides, sin embargo, no fue posible encontrar una diferenciación de muestras cosechadas en diferentes chakras, siendo agrupadas solo por condiciones de luz y edad. Bajo estas condiciones el mapa de calor mostró que Fenoles como **4-Vinilguaiacol**, **4 metoxifenol**, **fenol**, **2,6-dimetoxi-**, **ácido benzoico**, **1,2-Bencenodiol**, **supraeno** y **3-aminofenol**; flavonoides como **la chalcona**; ácidos carboxílicos como el **ácido 3-Fenilpropionico** y alcaloides como la **purina** tienden a aumentar su concentración relativa en muestras cosechadas en un rango de edad entre 6 a 10 años en condiciones de sombra. Mientras en condiciones de luz los compuestos como **teobromina** y **1-metilpipecolinato de etilo** mostraron mayor abundancia en muestras cosechadas en un rango de edades de 4 a 6 años. En contraste la capacidad antioxidante de *Ilex guayusa* bajo estas condiciones de estudio revela que la luz, la edad y la localización son factores determinantes. La ausencia de luz incrementa significativamente la capacidad antioxidante, sugiriendo que las condiciones de cultivo con sombra pueden ser más favorables para mantener los niveles de compuestos antioxidantes y se relaciona con los compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides identificados con mayor abundancia en sombra y a mayor edad, indicando que la recolección en etapas avanzadas de crecimiento maximiza el contenido de antioxidantes. En términos de localización, la variabilidad observada sugiere que las plantas cultivadas en Alto Pano tienen una capacidad antioxidante superior. Considerando que, aunque no se encontró variabilidad en el perfil volátil según la ubicación de la chakra, es probable que esta variabilidad sea encontrada en el perfil de compuestos de mayor masa molecular en los cuales se

encuentran predominantemente los polifenoles. Estos hallazgos, respaldados por estudios previos, destacan la importancia de optimizar las prácticas de cultivo y la selección de las condiciones ambientales para mejorar la calidad y los beneficios antioxidantes de *I. guayusa*.

Recomendaciones

Los hallazgos presentados, en conjunto con estudios previos, subrayan la importancia de las condiciones ambientales y de crecimiento en la capacidad antioxidante de *I. guayusa*. La ausencia de luz, la madurez de la planta y las condiciones específicas de la localización son factores críticos que pueden maximizar la capacidad antioxidante. Estos resultados tienen implicaciones prácticas para la agricultura y la industria de productos naturales, sugiriendo que optimizar las condiciones de cultivo y seleccionar plantas de mayor edad podrían mejorar significativamente el contenido antioxidante de los productos derivados de *I. guayusa*. Futuros estudios deberían enfocarse en investigar los mecanismos moleculares detrás de estas variaciones y desarrollar prácticas agrícolas que maximicen los beneficios antioxidantes de esta planta.

Se recomienda que en base al presente estudio se continúe realizando futuras investigaciones sobre los metabolitos identificados con actividad biológica. Además, utilizar enfoques integrados que realicen diferentes tecnologías y plataformas analíticas como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en combinación con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas como complemento para proporcionar una visión más completa del metaboloma. Al ser metabolitos importantes para la elaboración de productos fitoquímicos, se podrían realizar análisis de suelo más exhaustivos en las chakras, como conocer micro y macro nutrientes, humedad y pH. Además, investigar la actividad biológica de los metabolitos producidos con diferentes concentraciones del extracto y solventes. Con respecto a la capacidad antioxidante, se sugiere aplicar otras técnicas para su comparación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta , V. (2011). *Variación en la composición química del aceite esencial de Lippia graveolens, en poblaciones silvestres de Yucatán, y su relación con factores edafoclimáticos* [Centro de investigación de Yucatán]. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/946>
- Airado, D., Acedo, M y Cortés, A. (2017). *Reducción de la dimensionalidad para el análisis e interpretación afectiva en la práctica educativa*. <https://doi.org/https://doi.org/10.17060/ijodaep.2017.n1.v4.1031>
- Aksenov, A, Laponogov, I., Zhang, Z., Doran, S. L. F., Belluomo, I., Veselkov, D., Bittremieux, W., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Maloney, K. N., Misra, B. B., Melnik, A. V., Smirnov, A., Du, X., Jones, K. L., Dorrestein, K., Panitchpakdi, M., Ernst, M., van der Hooft, J. J. J., ... Veselkov, K. (2021). Autodeconvolución y redes moleculares de datos de cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Naturaleza Biotecnología. Nature Biotechnology*, 39(2), 169–173. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0700-3>
- Ali, A., Khalil, A., Khuda, F., Nazir, N., Ullah, R., Bari, A., Haider, A., Jamal, S. B., Ahmad, S., Khan, Z., Shah, S. M. M., Shah, S. W. A., Nasir, A., Ali, A., Zahoor, M., & Jan, S. (2021). Detección fitoquímica y biológica de extractos de hojas, corteza y frutos de la pared de ilex dipyrena. *Life*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/life11080837>
- Arias, J. H., Balcazar, A., & Hurtado, R. (1990). *Sistemas de producción en Colombia*. <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/720>
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). La contribución hidrófila y lipófila a la actividad antioxidante total. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Arteaga, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de antioxidantes fenólicos de Ilex gauyusa Loes. Utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Heliyon*, 6(1), e03043. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Azam, S., NU, K., & SM., H. (2003). *Propeidades antioxidantes y prooxidantes de la cafeína, teobromina y xantina*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12960921/>
- Bisognin, D., da Luz, L. V., Lencina, K. H., dos Santos, C. O., & Sautter, C. K. (2019). Contenido de fenólicos y flavonoides totales y actividad antioxidante de la shoja de Ilex paraguariensis. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 54, e00856. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.PAB2019.V54.00856>
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Avances recientes en la investigación de Ilex paraguariensis: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>
- Brand, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Uso de un método de radicales libres para evaluar la actividad antioxidante. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Bravo, L., Goya, L., & Lecumberri, E. (2007). LC/MS Caracterización de los constituyentes fenólicos del mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) y su actividad antioxidante en comparación con las bebidas de consumo habitual. *Investigación alimentaria internacional*, 40(3), 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.016>
- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determinación de componentes del té con actividad antioxidante. *Diario de la química agrícola y alimentaria*, 51(15), 4427–4435. <https://doi.org/10.1021/jf0300801>
- Callaghan, A., Gieg, L. M., Kropp, K. G., Suflita, J. M., & Young, L. Y. (2006). Comparación de los mecanismos del metabolismo de los alcanos en condiciones reductoras de sulfato entre dos aislados bacterianos y un consorcio bacteriano. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 72(6), 4274–4282. <https://doi.org/10.1128/AEM.02896-05>
- Campos, R., Gómez, A., & Rodríguez, L. (2017). Influencia de la sombra en el contenido de polifenoles en hojas de *Ilex guayusa*. *Journal of Plant Research*, 25(3), 145–158.
- Cano, A., Maestre, A. B., Hernández-Ruiz, J., & Arnao, M. B. (2023). ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. In *Processes* (Vol. 11, Issue 1, p. 185). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/pr11010185>
- Carrasco, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia*, 27(3), 59–76. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292009000300009>
- Chalcone | C₁₅H₁₂O | CID 637760 - PubChem. (n.d.). Retrieved June 13, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chalcone>
- Chen, Y. H., Duan, M., Lin, S. L., Liu, Y. W., Cheng, J. K., Xiang, S. H., Yu, P., Houk, K. N., & Tan, B. (2024). Reacción umplolung de iminas promovida por aromatización organocatalítica. *Química de la naturaleza*, 16(3), 408–416. <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01384-x>
- Cheyrier, V. (2005). Flavonoides en el vino. En *flavonoides: Química, Bioquímica y Aplicaciones* (pp. 263–318). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039443>
- Coelho, G. C., Rachwal, M. F. G., Dedeczek, R. A., Curcio, G. R., Nietsche, K., & Schenkel, E. P. (2007). Efecto de la intensidad de la luz sobre el contenido de metilxantina de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Sistemática Bioquímica y Ecología*, 35(2), 75–80. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2006.09.001>
- Collaguazo, P. (2012). *Plan de Manejo de la especie guayusa (Ilex guayusa L.). Macas, Ecuador*. [https://www.google.com/search?q=Collaguazo%2C+P.+2012.+Plan+de+Manejo+de+la+especie+guayusa+\(Ilex+guayusa+L.\).+Macas%2C+Ecuador.&rlz=1C1CHZN_esEC1003EC1003&oq=Collaguazo%2C+P.+2012.+Plan+de+Manejo+de+la+especie+guayusa+\(Ilex+guayusa+L.\).+Macas%2C+Ecu](https://www.google.com/search?q=Collaguazo%2C+P.+2012.+Plan+de+Manejo+de+la+especie+guayusa+(Ilex+guayusa+L.).+Macas%2C+Ecuador.&rlz=1C1CHZN_esEC1003EC1003&oq=Collaguazo%2C+P.+2012.+Plan+de+Manejo+de+la+especie+guayusa+(Ilex+guayusa+L.).+Macas%2C+Ecu)
- Costa, S., Vieira, E. L., Oliveira, A. A., Ferreira, A. C., & Lima, L. S. (2010). Efectos neuroprotectores de la cafeína en el modelo de lesiones de 6-hidroxidopamina en ratas. *Revisiones de fitoquímica*, 9, 347–355.
- Dartora, N., De Souza, L. M., Santana-Filho, A. P., Iacomini, M., Valduga, A. T., Gorin, P. A. J., & Sassaki, G. L. (2011). UPLC-PDA-MS Evaluación de compuestos bioactivos de hojas de *Ilex paraguariensis* con diferentes condiciones de crecimiento, tratamientos y envejecimiento. *Food Chemistry*, 129(4),

- 1453–1461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>
- Dionisio, K., Phillips, K., Price, P. S., Grulke, C. M., Williams, A., Biryol, D., Hong, T., & Isaacs, K. K. (2018). Descriptor de datos: Base de datos de productos químicos y productos, un recurso para obtener datos relevantes sobre la exposición a sustancias químicas en productos de consumo. Datos científicos, 5. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.125>
- Dueñas, J., Jarrett, C., Cummins, I., & Logan–Hines, E. (2016). Guayusa Amazónica (*Ilex guayusa* Loes.): Un panorama histórico y etnobotánico. botánica económica, 70(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
- Ebisuzaki, Y., Boyle, P. D., & Smith, J. A. (1997). Metilxantinas. I. Teofilina anhidra. Acta Crystallographica Sección C: Comunicaciones de estructuras cristalinas, 53(6), 777–779. <https://doi.org/10.1107/S0108270197001960>
- Filho, W., Manolas, E., & Pace, P. (2015). El futuro que queremos son cuestiones clave sobre el desarrollo sostenible en la educación superior después de Río y la década de las Naciones Unidas de educación para el desarrollo sostenible. Revista Internacional de Sostenibilidad en la Educación Superior, 16(1), 112–129. <https://doi.org/10.1108/IJSHE-03-2014-0036>
- Filip, R., & Ferraro, G. E. (2003). Investigando sobre nuevas especies de “Compañero”: *Ilex brevicuspis*: Estudio fitoquímico y farmacológico. Revista Europea de Nutrición, 42(1), 50–54. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0399-1>
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., & Ferraro, G. (2001). Compuestos fenólicos en siete especies de *Ilex* sudamericanas. Fitoterapia, 72(7), 774–778. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8)
- Ford, K., Ebisuzaki, Y., & Boyle, P. D. (1998). Metilxantinas. II. Teobromina anhidra. Acta Crystallographica Sección C: Comunicaciones de estructuras cristalinas, 54(12), 1980–1983. <https://doi.org/10.1107/S0108270198009469>
- Fu, Z., Xu, J., Zhu, T., Leong, W. W. Y., & Chi, Y. R. (2013). Activación por β -carbono de ésteres carboxílicos saturados mediante organocatálisis de carbeno N-heterocíclico. Química de la naturaleza, 5(10), 835–839. <https://doi.org/10.1038/nchem.1710>
- García, A., Morales, C., & Salgado, M. (2016). Efecto de la madurez de las plantas en la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en *Ilex guayusa*. *Plant Biochemistry Journal*, 14(2), 123–130.
- García, H., & Schultes, R. E. (1992). *Flora medicinal de Colombia : botanica medica / Hernando Garcia Barriga ; prologo Richard Evans Schultes*.
- García, M., Hernández, M., & Torres, F. (2013). Efectos de la luz sobre la producción de alcaloides en *Camellia Sinensis*. regulación del crecimiento vegetal, 29(4), 211–220.
- González, A., Chinea, J. L., Bermejo, J., Martín, J. D., & Coll, J. (2014). Cumarinas naturales como agentes antioxidantes y neuroprotectores: de la química a la medicina. Comunicaciones de productos naturales, 9(2), 193–198.
- González, M., Pérez, L., & Rodríguez, P. R. (2016). Variabilidad ambiental y producción de metabolitos secundarios en especies de *Ilex*. Revista de investigación vegetal, 129(3), 451–460.
- Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F. T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., & Sužnjević, D.

- (2012). Capacidad antioxidante de té e infusiones de hierbas: polarográfica Evaluación. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9573–9580. https://doi.org/10.1021/JF302375T/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2012-02375T_0003.GIF
- Gugliucci, A. (1996). Efectos antioxidantes de *Ilex paraguariensis*: inducción de una menor oxidabilidad del LDL humano in vivo. *Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica*, 224(2), 338–344. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1030>
- Hägg, S., Spigset, O., Mjörndal, T., & Dahlqvist, R. (2000). Efecto de la cafeína sobre la farmacocinética de la clozapina en voluntarios sanos. *Revista británica de farmacología clínica*, 49(1), 59–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00111.x>
- Hamzah, H., Yusof, N. A., Salleh, A. B., & Bakar, F. A. (2011). Tira reactiva óptica para la detección de ácido benzoico en alimentos. *Sensors*, 11(8), 7302–7313. <https://doi.org/10.3390/s110807302>
- He, J., & Yang, J. C. (2009). 1-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)etanona. *Acta Crystallographica Sección E: Informes de estructura en línea*, 65(12). <https://doi.org/10.1107/S1600536809046285>
- Herrera, X., & Rodriguez, K. (2016). EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOL Y ANTOCIANINAS CONTENIDOS EN EL AGRAZ (*Vaccinium meridionale swartz*) OBTENIDOS A NIVEL LABORATORIO POR MEDIO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS. In *Fundación Universidad de América* (Issue May). <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/478>
- Information, N. for B. (2024). *Resumen de compuestos de PubChem para CID 566742, 1-metilpiperidina-2-carboxilato de etilo*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-1-methylpiperidine-2-carboxylate>
- Ito, I., & Maeno, T. (1986). C atecol: un inhibidor potente y específico del canal rápido de potasio en las neuronas aferentes primarias de ranas. *La revista de fisiología*, 373(1), 115–127. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016038>
- Jiménez, P., Ortiz, M., & Vasconez, E. (2019). Impacto de las condiciones ambientales en la actividad antioxidante de *Ilex guayusa*. *Plant Science Today*, 7(4), 256–263.
- Kabuto, H., Yamanushi, T. T., Janjua, N., Takayama, F., & Mankura, M. (2013). Efectos del escualeno/escualano sobre los niveles de dopamina, la actividad de las enzimas antioxidantes y la composición de ácidos grasos en el cuerpo estriado del modelo de ratón con enfermedad de Parkinson. *Revista de ciencia oleo*, 62(1), 21–28. <https://doi.org/10.5650/jos.62.21>
- Klãvus, A., Kokla, M., Noerman, S., Koistinen, V. M., Tuomainen, M., Zarei, I., Meuronen, T., Häkkinen, M. R., Rummukainen, S., Babu, A. F., Sallinen, T., Kärkkäinen, O., Paananen, J., Broadhurst, D., Brunius, C., & Hanhineva, K. (2020). “Notame”: flujo de trabajo para perfiles metabólicos LC-MS no específicos. *metabolitos*. *Metabolites*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/metabo10040135>
- Kumar, K., Debnath, P., Singh, S., & Kumar, N. (2023). Una descripción general de los fenólicos vegetales y su participación en la tolerancia al estrés abiótico. En *Stresses* (Vol. 3, Número 3, págs. 570–585). Instituto Editorial Digital Multidisciplinario. <https://doi.org/10.3390/stresses3030040>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J.,

- Showalter, M., Takeuchi, K., Kind, T., Beal, P., Arita, M., & Fiehn, O. (2018). Identificación de metabolitos mediante la integración de bases de datos de metabolomas con quimioinformática de espectrometría de masas. *Nature Methods*, 15(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Lee, H., & Lin, Y. W. (2009). Permeación de ingredientes de tintes para el cabello, p-fenilendiamina e isómeros de aminofenol, a través de guantes protectores. *Anales de Higiene Ocupacional*, 53(3), 289–296. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mep009>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). El efecto de los factores ambientales y de desarrollo sobre los metabolitos secundarios de las plantas medicinales. En *Fisiología y Bioquímica Vegetal* (Vol. 148, Issue December 2019, pp. 80–89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Meesters, C., Mönig, T., Oeljeklaus, J., Krahn, D., Westfall, C. S., Hause, B., Jez, J. M., Kaiser, M., & Kombrink, E. (2014). Un inhibidor químico de la señalización de jasmonato se dirige a JAR1 en *Arabidopsis thaliana*. *biología química de la naturaleza*, 10(10), 830–836. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1591>
- Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes.* <https://207.180.208.103/handle/123456789/5576>
- Merker, P., Yeung, D., Doughty, D., & Nacht, S. (1982). Farmacocinética del resorcinol en ratas. *Comunicaciones de Investigación en Patología Química y Farmacología*, 38(3), 367–388. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)51177-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)51177-5)
- Meyer, M., Capuco, A. V., Ross, D. A., Lintault, L. M., & Van Amburgh, M. E. (2006). Regulación nutricional y del desarrollo de la glándula mamaria de la vaquilla prepúber: I. Masa y composición del parénquima y la almohadilla grasa. *Revista de ciencia láctea*, 89(11), 4289–4297. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72475-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72475-4)
- Miranda, L., Paredes, F., & Tapia, J. (2018). Efecto de la luz en la actividad antioxidante de plantas medicinales. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(1), 10–18.
- Munshi, P., & Row, T. N. G. (2005). E Explorando el límite inferior en los enlaces de hidrógeno: análisis de interacciones débiles C-H...O y C-H... π en cumarinas sustituidas a partir del análisis de densidad de carga. *Revista de Química Física A*, 109(4), 659–672. <https://doi.org/10.1021/jp046388s>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 606603, 2,4,6-cicloheptatrien-1-ona, 2-hidroxi-7-metoxi-4-(1-metiletil)-. En *Definiciones*. <https://doi.org/10.32388/uq8dyz>
- Palumbo, M., Talcott, S. T., & Putz, F. E. (2009). *Ilex Vomitoria* Ait. (Yaupon): Una fuente nativa de América del Norte de un té rico en cafeína y antioxidantes. *botánica económica*, 63(2), 130–137. <https://doi.org/10.1007/s12231-009-9078-3>
- Pérez, S., Ramírez, G., & Torres, A. (2020). Composición química y actividad antioxidante de plantas cultivadas en diferentes regiones. *Plant Science Journal*, 15(2), 89–97.
- Pinho, E., Soares, G., & Henriques, M. (2015). Evaluación de la actividad antibacteriana del ácido cafeico encapsulado por β -ciclodextrinas. *Revista de microencapsulación*, 32(8), 804–810.

<https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1094531>

- Quiroz Fuel, S. A., & Quishpe Guanoluiza, M. A. (2013). *Elaboración de una bebida energizante a base de guayusa (Ilex guayusa) y naranjilla (solanum quitoense) edulcorada con panela*. https://www.google.com/search?q=Quiroz+%26+Quishpe%2C+2013+guayusa&sca_esv=3e9dc9b55742d0c1&sca_upv=1&rlz=1C1CHZN_esEC1003EC1003&sxsrf=ACQVn09dKBUvYcV8wNgC6BjaCDK W1qrBSQ%3A1714120976747&ei=EGkrZvGZLaCWwt0PrpK_gAU&ved=0ahUKEwjx4a6fvt-FAXUgi7AFHS7JD1AQ4dUDC
- Radice, M., Scalvenzi, L., & Sablón Cossio, N. (2017). *A revisión sistemática de sus usos tradicionales, componentes químicos, actividades biológicas y oportunidades de biocomercio*. 3868. <https://doi.org/10.3390/mol2net-02-03868>
- Ramírez, A., Pérez, J., & Ortiz, C. (2015). Acumulación de luz y alcaloides en Theobroma Cacao. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 45–53.
- Reddy, M. B., Andersen, M. E., Morrow, P. E., Dobrev, I. D., Varaprath, S., Plotzke, K. P., & Utell, M. J. (2003). P Modelado fisiológico de la cinética de inhalación de octametilciclotetrasiloxano en humanos durante el descanso y el ejercicio. *Ciencias Toxicológicas*, 72(1), 3–18. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg001>
- Reginatto, F. H., Athayde, M. L., Gosmann, G., & Schenkel, E. P. (1999). Acumulación de metilxantinas en especies de Ilex: cafeína y teobromina en Erva-Mate (Ilex paraguariensis) y otras especies de Ilex. *Revista de la Sociedad Química Brasileña*, 10(6), 443–446. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531999000600004>
- Riachi, L. G., Simas, D. L. R., Coelho, G. C., Marcellini, P. S., Ribeiro da Silva, A. J., & Bastos de Maria, C. A. (2018). Efecto de la intensidad de la luz y las condiciones de procesamiento sobre los compuestos bioactivos del mate extraído de la yerba mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.). *Química de Alimentos*, 266, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.028>
- Ross, D. H., Seguin, R. P., Krinsky, A. M., & Xu, L. (2022). Medición de alto rendimiento y predicción basada en aprendizaje automático de secciones transversales de colisión para fármacos y metabolitos de fármacos. *Revista de la Sociedad Estadounidense de Espectrometría de Masas*, 33(6), 1061–1072. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00111>
- Ruiz, M., (2020). *Determinación de la actividad antioxidante*. Ediciones Universidad Simón Bolívar. <https://hdl.handle.net/20.500.12442/7986>
- Ruiz, S., Venegas, E., Chávez Gaona, M., & Eustaquio Saldarriaga, C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de Morinda citrifolia L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *Ucv - Scientia*, 2(2), 11–22. <https://doi.org/10.18050/REVUCV-SCIENTIA.V2I2.876>
- Saniewski, M., Horbowicz, M., & Kanlayanarat, S. (2014). Una revisión de las actividades biológicas de los troponoides y su uso en la agricultura. En *Journal of Horticultural Research* (Vol. 22, Número 1, págs. 5-19). Instituto Warzywnictwa. <https://doi.org/10.2478/johr-2014-0001>
- Santos, H., Price, J. C., Bueno, A. A., & Paula-Gomes, C. A. (2018). El papel de los ácidos grasos saturados

- en la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares: un enfoque en el pasado y perspectivas futuras. *Revista de Nutrición Humana y Dietética*, 31(6), 628–639.
- Schultes, R. (1972). *Ilex guayusa desde el 500 d.C. hasta la actualidad*.
- Schutte, M., Roodt, A., Alberto, R., Twigge, L., Visser, H. G., Kirsten, L., & Koen, R. (2019). Estructuras de complejos de renio (I) con 3-hidroxiflavona y ácido benzohidroxámico como ligandos O, O'-bidentados y confirmación del apilamiento π mediante espectroscopia de RMN de estado sólido. *Acta Crystallographica Sección C: Química estructural*, 75(4), 378–387. <https://doi.org/10.1107/S2053229619002717>
- Scull, I., Savón, L., Ruiz, T., Agricultural, M. H.-C. J. of, & 2022, U. (2022). Efecto de la edad de crecimiento en el contenido de polifenoles de materiales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.). *Scielo.Sld.Cu* Scull, I Savón, TE Ruiz, M HerreraCuban Journal of Agricultural Science, 2022•scielo.Sld.Cu. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802022000300004&script=sci_arttext&tlng=en
- Silva, F., Vieira, L. G. E., Ribas, A. F., Moro, A. L., Neris, D. M., & Pacheco, A. C. (2018). La acumulación de prolina induce la producción de fenólicos totales en plantas de tabaco transgénico bajo déficit hídrico sin aumentar la actividad de G6PDH. *Fisiología Vegetal Teórica y Experimental*, 30(3), 251–260. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0119-0>
- Silva, J. (2022). "Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (*Anethum graveolens*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante." <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8880>
- Sridhar, K., & Charles, A. L. (2019). Actividad antioxidante in vitro de extractos de uva Kyoho en ensayos DPPH [rad] y ABTS [rad]: métodos de estimación de EC 50 utilizando programas estadísticos avanzados. *Química de Alimentos*, 275, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>
- Sumner, L., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W. M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Normas mínimas de presentación de informes propuestas para análisis químicos. *Metabolómica. Metabolomics*, 3(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Suriyatem, R., Auras, R. A., Intipunya, P., & Rachtanapun, P. (2017). Modelado matemático predictivo para el cálculo de EC50 de la actividad antioxidante y la capacidad antibacteriana de los productos apícolas tailandeses. *Revista de ciencias farmacéuticas aplicadas*, 7(9), 122–133. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70917>
- Tate, P., Marazita, M. C., Marquioni-Ramella, M. D., & Suburo, A. M. (2020). Los extractos de *Ilex paraguariensis* y sus polifenoles previenen el daño oxidativo y la senescencia de las células del epitelio pigmentario de la retina humana. *Revista de alimentos funcionales*, 67, 103833. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103833>
- Tevez, M., & Wendel, G. H. (2016). Actividad de los extractos acuosos liofilizados de hojas y corteza de *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek (Santalaceae) sobre el tránsito intestinal en ratones. *Spei Domus*, 12(25). <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2016.02.01>

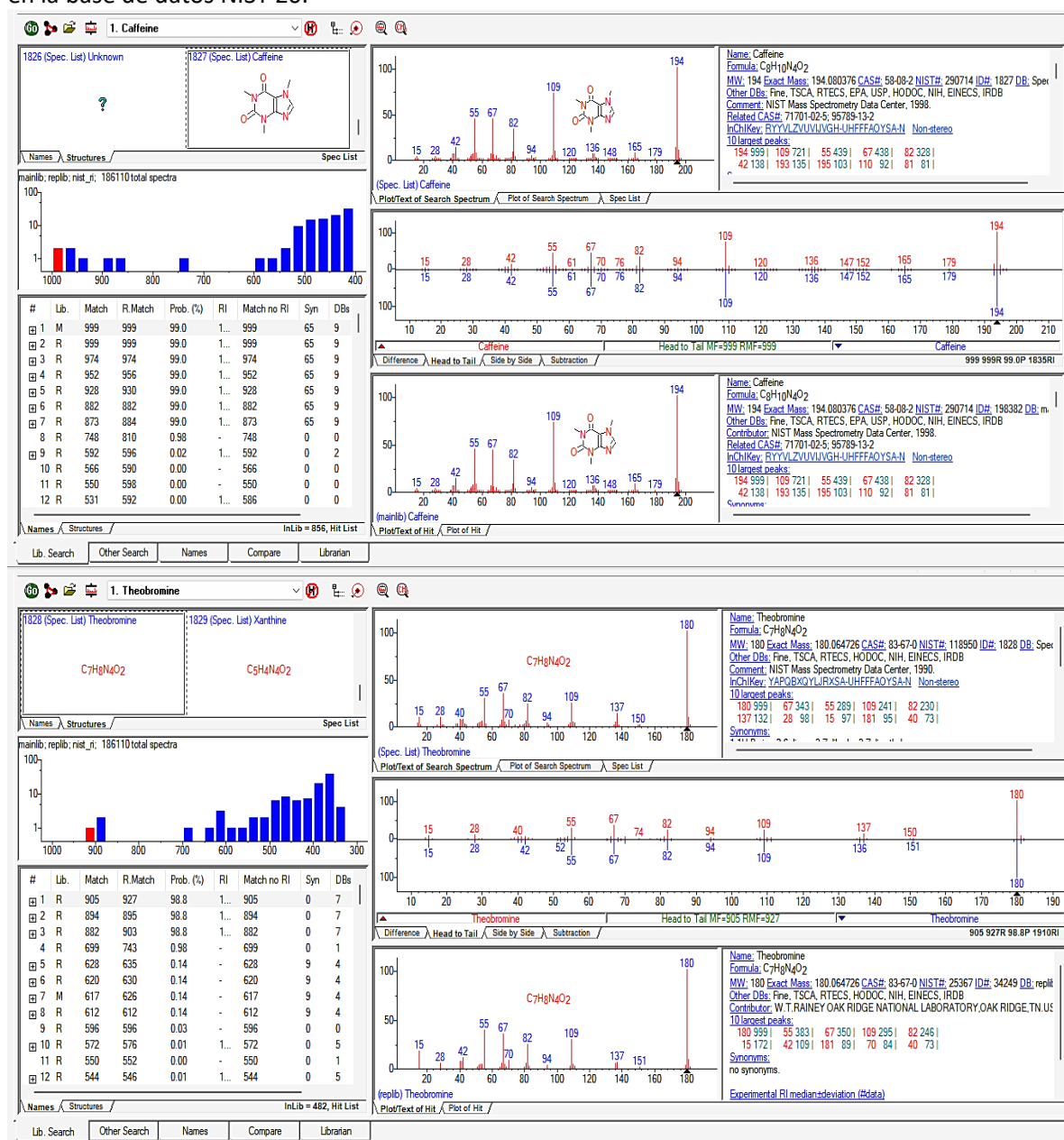
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparación de ensayos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC para estimar la actividad antioxidante de extractos de fruta de guayaba. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2006.01.003>
- Theppakorn, T. (2016). Estabilidad y cambios químicos de los compuestos fenólicos durante el procesamiento del té Oolong. *Revista internacional de investigación alimentaria*, 23(2), 564–574. https://www.researchgate.net/profile/Theerapong-Theppakorn/publication/299389676_Stability_and_chemical_changes_of_phenolic_compounds_during_Oolong_tea_processing/links/56f3478808ae38d7109a57bd/Stability-and-chemical-changes-of-phenolic-compounds-during-O
- Trost, B., & Fleming, I. (1992). Síntesis orgánica integral: selectividad, estrategia y eficiencia en la química orgánica moderna. *Reseñas de opciones en línea*, 30(02), 30-0931-30-0931. <https://doi.org/10.5860/choice.30-0931>
- Villacís, J. (2017). Villacís-Chiriboga, José. (2017). Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.). *Revista Etnobiología*. 15. 79-88. - Buscar con Google. *ETNOBIOLOGÍA*, 15(3), 79–88. <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/129>
- Walter, L. Moura, M. M., Gabira, M. M., de Aguiar, N. S., Stuepp, C. A., & Kratz, D. (2023). Cómo influyen el sombreado y el tipo de contenedor en *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. *Producción de plántulas. ciencia forestal*, 68(5–6), 533–539. <https://doi.org/10.1093/forsci/fxac036>
- Wang, L., Xu, M., & Liu, Y. (2016). P Análisis fitoquímico y actividad antioxidante de plantas medicinales asociadas con anticancerígenos. *Fronteras en farmacología*, 7, v.
- Xin, T. y KM Schaich. (2013). Efectos de la estructura molecular sobre la cinética y dinámica del ensayo de capacidad antioxidante equivalente trolox con ABTS+•. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 61 (23), 5511–5519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf4010725>
- Yamamoto, T., Takahashi, H., Suzuki, K., Hirano, A., Kamei, M., Goto, T., Takahashi, N., & Kawada, T. (2014). La teobromina mejora la absorción del polifenol del cacao en ratas. *Biociencia, Biotecnología y Bioquímica*, 78(12), 2059–2063. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.942252>

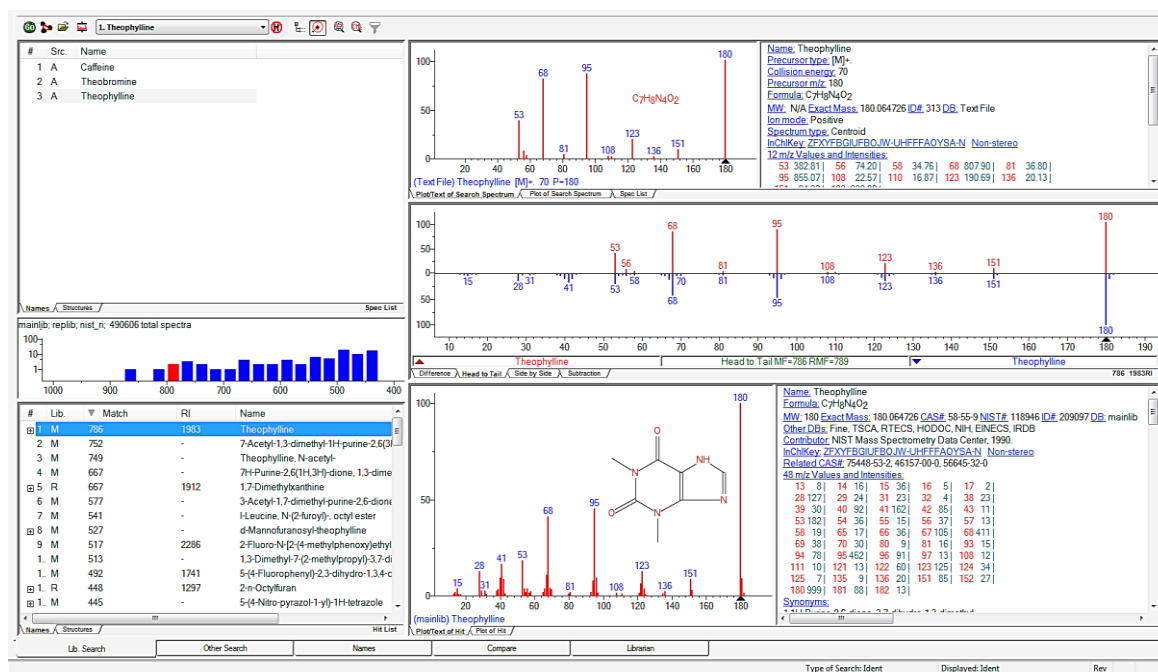
ANEXOS

Anexo A. Registro en Excel de los parámetros utilizados en el software MS-DIAL.

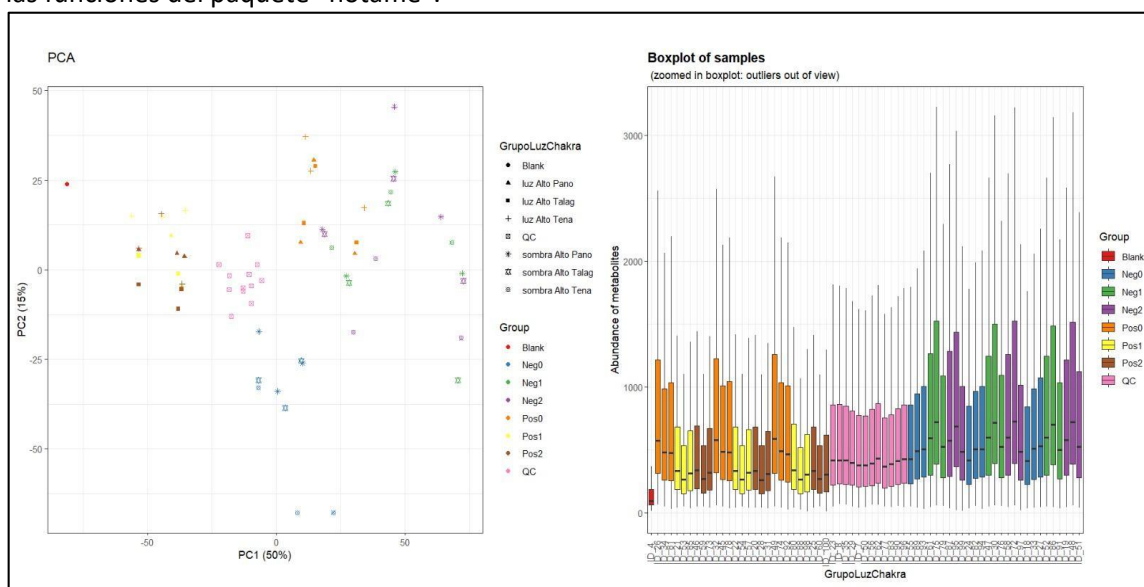
A132										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	MS-DIAL ver. 4.9.221218			#Data processing				#identification		
2				Number of t	1			MSP file		
3	#Data type							RI index file	see last	
4	Data type	Centroid		#Peak detection parameters				Retention t	RI	
5	Ion mode	Positive		Smoothing	LinearWeightedMovingAverage			RI compound	Alkanes	
6	Accuracy t	IsNominal		Smoothing	3			Retention t	0.5	
7	#Data collection parameters			Average pe	5			Retention i	20	
8	Retention t	0		Minimum pe	200			El similarity	70	
9	Retention t	60		Mass slice	0.5			Identificatio	70	
10	Mass range	50		Mass accu	0.5			Use retenti	True	
11	Mass range	500						Use retenti	False	
12								Use quant	False	
13	#MS1Dec parameters			#Filtering setting						
14	Sigma winc	0.5		Peak coun	2.9					
15	Amplitude c	10		N% detecte	0					
16				Remove fe	True					
17	#Alignment parameters setting			Sample ma	5					
18	Reference	F:\Jefferson-Pastuna\Tesis_Guayusa\GC_MS_mzML\alkane-dictionaryok (1).txt		Sample ave	5					
19	Retention t	RT		Keep ident	True					
20	Retention i	20		Keep remo	True					
21	Retention t	0.08								
22	El similarity	95								
23	Retention t	0.5								
24	El similarity	0.5								
25	Identificatio	False								
26	Gap filling t	True								
27	Basepeak t	True								
28										
29	#RI dictionary (analysis file path / ri dictionary file path)									
30	Rfx.Riken.C	F:\Jefferson-Pastuna\Tesis_Guayusa\GC_MS_mzML\alkane-dictionaryok (1).txt								
31	Rfx.Riken.C	F:\Jefferson-Pastuna\Tesis_Guayusa\GC_MS_mzML\alkane-dictionaryok (1).txt								
32	Rfx.Riken.C	F:\Jefferson-Pastuna\Tesis_Guayusa\GC_MS_mzML\alkane-dictionaryok (1).txt								

Anexo B. Verificación de la identidad espectral de los estándares cafeína, teobromina y teofilina en la base de datos NIST 20.





Anexo C. PCA con la corrección del efecto Drift por medio de regresión cúbica integrada entre las funciones del paquete “notame”.



Anexo D. Código de los compuestos volátiles y semivolátiles del extracto acuoso de las hojas de Ilex guayusa

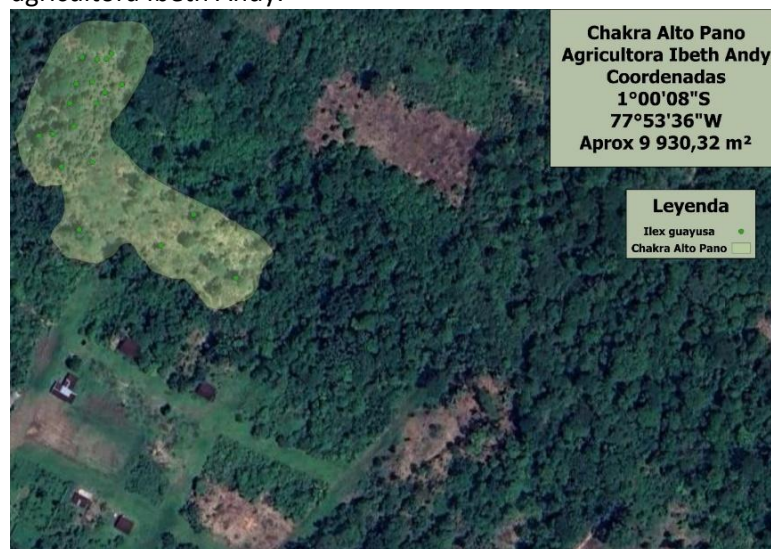
Feature_ID	Metabolite_name	Superclass	Class	Subclass	Nivel	Metabolite _Code
Rxt5_EI_11 0_0514a1_ 660833333 33333	1,2-BENZENODIOL	Fenol	None	None	II	1
Rxt5_EI_10 7_0614a2_ 616333333 33333	Catecol	Fenol	None	None	II	2
Rxt5_EI_10 5_0604a1_ 507	ÁCIDO BENZOICO	Fenol	Ácido monoca rboxílico aromáti co	None	II	3
Rxt5_EI_69 _0487a8_2 771666666 6667	Supraeno	Fenol	None	None	II	4
Rxt5_EI_10 9_0726a1_ 729166666 66667	3-AMINOFENOL	Fenol	None	None	II	5
Rxt5_EI_15 0_0462a2_ 166833333 33333	4-VINILOGUAIACOL	Fenol	None	None	II	6
Rxt5_EI_74 _0385a4_4 928333333 3333	Ácido hexadecanoico, 2- metil-	Ácido carboxílico	Ácido monoca rboxílico	None	II	7
Rxt5_EI_91 _0533a2_2 398333333 3333	ÁCIDO 3- FENILPROPIONICO	Ácido carboxílico	Ácido monoca rboxílico	None	II	8
Rxt5_EI_15 4_0442a2_ 319166666 66667	Fenol, 2,6- dimetoxi-	Fenol	None	None	II	9
Rxt5_EI_20 8_0389a4_ 641333333 33333	Chalcona	Flavonoide	cetona aromáti ca	None	II	10
Rxt5_EI_10 9_0525a1_ 2395	4-METOXIFENOL	Fenol	None	None	II	12
Rxt5_EI_69 _036a5_36	Hidroxiflavona	Flavonoide	Flavonol	monohi droxifla vona	II	13

916666666667						
Rxt5_EI_19_4_0414a3_7105	2-Hidroxi-4-isopropil-7-metoxitropona	None	None	None	II	14
Rxt5_EI_123_0617a2_2726666666667	Resorcinol	None	None	None	II	17
Rxt5_EI_98_0994a1_3943333333333333	1-metilpipecolinato de etilo	None	None	None	II	18
Rxt5_EI_180_0416a3_195	Acetofenona	None	None	None	II	19
Rxt5_EI_137_0536a3_8393333333333333	2,5-Dihidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona	None	None	None	II	20
Rxt5_EI_120_0596a1_74366666666667	Cumarán	None	None	None	II	21
Rxt5_EI_120_0489a3_05866666666667	Purina	Alcaloide	Pseudoalcaloides	alcaloides de pteridina	II	22
Rxt5_EI_156_0485a3_2578333333333333	1-amino-2-metilnaftaleno	None	None	None	II	23
Rxt5_EI_144_0335a4_0855	1H-indol-3-carboxaldehído	Alcaloide	Alcaloides triptófano	None	II	24
Rxt5_EI_255_0138a9_37366666666667	γ-Sitosterol	Fitoesterol	3beta-esterol	3beta-hidroxi-Delta(5)	II	25
Rxt5_EI_194_0314a4_27716666666667	Cafeína	Alcaloide	metilxantina	None	I	26
Rxt5_EI_180_01a4_3073333333333333333	Teobromina	Alcaloide	metilxantina	Purina	I	27
Rxt5_EI_180_0487a4_7605	Teofilina	Alcaloide	metilxantina	Purina	I	28

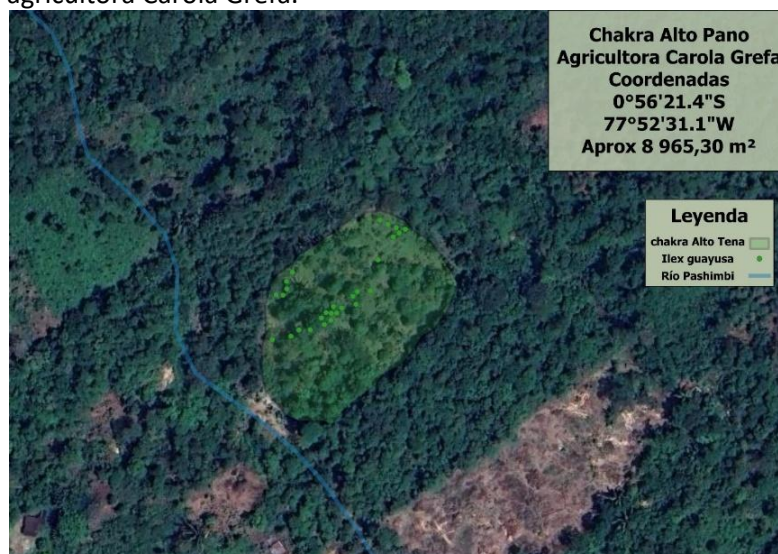
Anexo E. Imagen satelital de la chakra de Talag con coordenadas 1°04'59.5"S 77°53'24.6"W perteneciente a la agricultora Lupita Grefa.



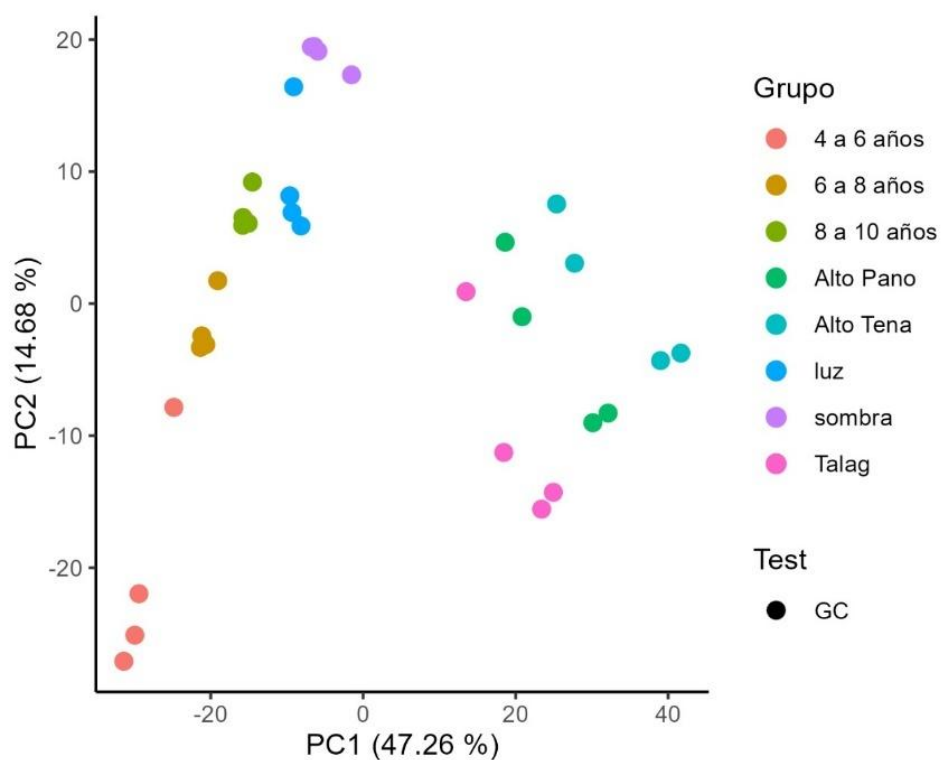
Anexo F. Imagen satelital de la chakra de Alto Pano con coordenadas 1°00'08"S 77°53'36"W perteneciente a la agricultora Ibeth Andy.



Anexo G. Imagen satelital de la chakra de Alto Tena con coordenadas 0°56'21.4"S 77°52'31.1"W perteneciente a la agricultora Carola Grefa.



Anexo H. PCA de los grupos control del extracto acuoso de las hojas de I. guayusa.



Anexo I. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) e interacciones en el análisis ANOVA para el método ABTS.

w=0.9506, p_value=0.0265

OLS Regression Results						
=====						
Dep. Variable:	TEAC_ABTS	R-squared:	0.985			
Model:	OLS	Adj. R-squared:	0.978			
Method:	Least Squares	F-statistic:	141.7			
Date:	Wed, 17 Apr 2024	Prob (F-statistic):	8.36e-28			
Time:	08:30:40	Log-Likelihood:	198.89			
No. Observations:	54	AIC:	-361.8			
Df Residuals:	36	BIC:	-326.0			
Df Model:	17					
Covariance Type:	nonrobust					
=====						
	coef	std err	t	P> t	[0.025	0.975]

Intercept	0.0977	0.004	22.708	0.000	0.089	0.106
Chakra[T.B]	0.1264	0.006	20.776	0.000	0.114	0.139
Chakra[T.C]	0.0877	0.006	14.409	0.000	0.075	0.100
Luz[T.-]	0.0280	0.006	4.609	0.000	0.016	0.040
Edad[T.T1]	0.0923	0.006	15.176	0.000	0.080	0.105
Edad[T.T2]	0.0529	0.006	8.701	0.000	0.041	0.065
Chakra[T.B]:Luz[T.-]	-0.0161	0.009	-1.867	0.070	-0.034	0.001
Chakra[T.C]:Luz[T.-]	-0.0495	0.009	-5.750	0.000	-0.067	-0.032
Chakra[T.B]:Edad[T.T1]	-0.1123	0.009	-13.055	0.000	-0.130	-0.095
Chakra[T.C]:Edad[T.T1]	-0.0808	0.009	-9.385	0.000	-0.098	-0.063
Chakra[T.B]:Edad[T.T2]	-0.0495	0.009	-5.756	0.000	-0.067	-0.032
Chakra[T.C]:Edad[T.T2]	-0.0646	0.009	-7.502	0.000	-0.082	-0.047
Luz[T.-]:Edad[T.T1]	-0.0590	0.009	-6.854	0.000	-0.076	-0.042
Luz[T.-]:Edad[T.T2]	0.0705	0.009	8.193	0.000	0.053	0.088
Chakra[T.B]:Luz[T.-]:Edad[T.T1]	0.0842	0.012	6.922	0.000	0.060	0.109
Chakra[T.C]:Luz[T.-]:Edad[T.T1]	0.0849	0.012	6.973	0.000	0.060	0.110
Chakra[T.B]:Luz[T.-]:Edad[T.T2]	0.0140	0.012	1.151	0.257	-0.011	0.039
Chakra[T.C]:Luz[T.-]:Edad[T.T2]	-0.0126	0.012	-1.032	0.309	-0.037	0.012
=====						
Omnibus:	9.121	Durbin-Watson:	2.179			
Prob(Omnibus):	0.010	Jarque-Bera (JB):	10.793			
Skew:	-0.620	Prob(JB):	0.00453			
Kurtosis:	4.805	Cond. No.	36.5			

Notes:

[1] Standard Errors assume that the covariance matrix of the errors is correctly specified.

Anexo J. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) e interacciones en el análisis ANOVA para el método DPPH.

w=0.9802, p_value=0.5095

OLS Regression Results						
Dep. Variable:	TEAC_DPPH	R-squared:	0.975			
Model:	OLS	Adj. R-squared:	0.964			
Method:	Least Squares	F-statistic:	84.14			
Date:	Thu, 18 Apr 2024	Prob (F-statistic):	7.71e-24			
Time:	23:12:45	Log-Likelihood:	156.27			
No. Observations:	54	AIC:	-276.5			
Df Residuals:	36	BIC:	-240.7			
Df Model:	17					
Covariance Type:	nonrobust					
	coef	std err	t	P> t	[0.025	0.975]
Intercept	0.1571	0.009	16.591	0.000	0.138	0.176
Chakra[T.B]	0.0268	0.013	2.003	0.053	-0.000	0.054
Chakra[T.C]	0.0085	0.013	0.636	0.529	-0.019	0.036
Luz[T.-]	0.0174	0.013	1.302	0.201	-0.010	0.045
Edad[T.T1]	0.0878	0.013	6.554	0.000	0.061	0.115
Edad[T.T2]	0.1426	0.013	10.644	0.000	0.115	0.170
Chakra[T.B]:Luz[T.-]	0.0608	0.019	3.210	0.003	0.022	0.099
Chakra[T.C]:Luz[T.-]	0.0610	0.019	3.222	0.003	0.023	0.099
Chakra[T.B]:Edad[T.T1]	0.0799	0.019	4.218	0.000	0.041	0.118
Chakra[T.C]:Edad[T.T1]	-0.0581	0.019	-3.068	0.004	-0.097	-0.020
Chakra[T.B]:Edad[T.T2]	0.0541	0.019	2.854	0.007	0.016	0.092
Chakra[T.C]:Edad[T.T2]	-0.1222	0.019	-6.453	0.000	-0.161	-0.084
Luz[T.-]:Edad[T.T1]	0.0386	0.019	2.038	0.049	0.000	0.077
Luz[T.-]:Edad[T.T2]	0.0609	0.019	3.214	0.003	0.022	0.099
Chakra[T.B]:Luz[T.-]:Edad[T.T1]	-0.1069	0.027	-3.989	0.000	-0.161	-0.053
Chakra[T.C]:Luz[T.-]:Edad[T.T1]	-0.0782	0.027	-2.920	0.006	-0.133	-0.024
Chakra[T.B]:Luz[T.-]:Edad[T.T2]	-0.0767	0.027	-2.865	0.007	-0.131	-0.022
Chakra[T.C]:Luz[T.-]:Edad[T.T2]	-0.0086	0.027	-0.322	0.750	-0.063	0.046
Omnibus:	0.868	Durbin-Watson:	2.659			
Prob(Omnibus):	0.648	Jarque-Bera (JB):	0.577			
Skew:	0.253	Prob(JB):	0.749			
Kurtosis:	3.005	Cond. No.	36.5			

Notes:

[1] Standard Errors assume that the covariance matrix of the errors is correctly specified.

Anexo K. Análisis estadísticos (ANOVA y TUKEY)) de la capacidad antioxidante equivalente al trolox para los métodos ABTS y DPPH.

Método	Análisis ANOVA y TUKEY
ABTS	https://colab.research.google.com/drive/1MhVB-2LFXOeGXRv_FcR7QeQ9omQ2uFwh?usp=sharing
DPPH	https://colab.research.google.com/drive/1senV5sVq0diq_g-eV7ecX-0tqZO0y-K2?usp=sharing