



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE LUZ SOLAR Y EDAD
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METILXANTINAS
PRESENTES EN HOJAS DE *ILEX GUAYUSA*.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MATEO ANDREI FERNÁNDEZ VALVERDE

TUTORA: PhD. ZULAY MARINA NIÑO RUIZ

COTUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON

Napo-Ecuador

2024

UNIDAD DE TITULACIÓN
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y
RESPONSABILIDAD

Tena, 1 de marzo de 2024

De mi consideración:

Yo, Mateo Andrei Fernández Valverde con documento de identidad 1725303059 declaro que los resultados 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 de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo a usted,

Atentamente

.....
Mateo Andrei Fernández Valverde
C.I: 1725303059

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Mateo Andrei Fernández Valverde, con documento de identidad N° 1725303059, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE LUZ SOLAR Y EDAD SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METILXANTINAS PRESENTES EN HOJAS DE *ILEX GUAYUSA*, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÓRGANICO 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.

Tena, 1 de marzo de 2024

Atentamente

.....
Mateo Andrei Fernández Valverde
C.I: 1725303059

UNIDAD DE TITULACIÓN
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación: “EFECTO DE LAS CONDICIONES DE LUZ SOLAR Y EDAD SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METILXANTINAS PRESENTES EN HOJAS DE ILEX GUAYUSA” en la modalidad de: tesis, fue realizado por Mateo Andrei Fernández Valverde, 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

Tena, 1 de marzo de 2024

.....

Zulay Marina Niño Ruiz

C.I: 1157560303

.....

Noroska Gabriela Salazar Mogollón

C.I: 1757494453

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Tía Miriam y mi Tío Cesar como también a mis hermanos Liliana, Natalia y Kevin que me han apoyado desde que tengo memoria y que siempre están pendientes de mí. Además, se la dedico a Chavo mi fiel compañero y amigo que ha sido una de las mayores alegrías en mi vida y ha llenado de amor mi corazón. Por otra parte, se la dedico a Rena mi sobrina y hermana quien es de las personas que más amo en mi vida, es más, me gustaría que esta tesis sirva de inspiración para que ella tenga la seguridad de que todo lo que te propongas se puede cumplir y que cuando algo te gusta no importa que tan difícil sea porque lo disfrutaras. Por último, se la dedico a mi padre Antonio quien desde muy pequeño me apoyo en mi afán por conocer el mundo a través de la ciencia comprándome mi primer microscopio y siempre está motivándome a seguir adelante y a dar lo mejor de mí con su frase que siempre repito en mi mente “en lo que sea, pero el mejor”.

AGRADECIMIENTO

Extiendo un gran agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, a la Sociedad Alemana de Cooperación Internacional (GIZ) y a la empresa ADIMAQ quienes financiaron este proyecto de investigación. También agradezco a Kallari que nos ayudó con la logística para la recolección de muestras. De la misma manera, me gustaría agradecer a Giovanni Grefa quien nos ayudó con el contacto con los agricultores y que compartió sus historias, mitos y saberes ancestrales conmigo. De igual forma, les extiendo mis agradecimientos a las agricultoras Lupita Grefa, Ibeth Andy y Carola Grefa quienes eran dueñas de las chakras y nos enseñaron sus métodos de cultivo, sus saberes ancestrales y que siempre nos recibieron con mucha hospitalidad.

También extiendo mis agradecimientos al grupo Valorización de *Ilex guayusa*. Un acercamiento metabolómico, funcional y aplicativo del cual formo parte y al Laboratorio de Productos Naturales donde desarrolle mi tesis. Es así que, me gustaría agradecer a M.Sc. Evencio Joel Medina, M.Sc. Nina Espinosa de los Monteros, Ing. Melanie Ochoa y el Ing. Jefferson Pastuña quienes me han apoyado activamente en el desarrollo de mi tesis y sin duda forman parte fundamental del éxito de este trabajo.

Por último, me gustaría agradecer a mis compañeros en este proyecto y muy cercanos amigos Tomás Garzón y Denice Arias con quienes iniciamos en conjunto nuestros proyectos de investigación y, nos hemos apoyado mutuamente en el transcurso de nuestros trabajos siempre de la forma más amena y solidaria que caracteriza nuestra amistad. De igual manera, les extiendo un enorme agradecimiento a mi tutora PhD. Zulay Niño y mi cotutora PhD. Noroska Salazar quienes me han guiado paso a paso desde muy temprano en mi educación universitaria y que han motivado mi aprendizaje en gran medida, además, juntos hemos compartido buenos momentos, enseñanzas y pláticas de las que estoy muy agradecido y que siempre llevaré conmigo.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLA.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS O FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
Antecedentes	1
Planteamiento del problema.....	4
Justificación de la investigación.....	5
Objetivos de la investigación.	6
<i>Objetivo general</i>	6
<i>Objetivos específicos</i>	6
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	7
Diseño experimental.....	7
Recolección de material vegetal.....	7
Secado y triturado de las hojas.	8

Análisis de muestras por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	8
<i>Preparación de muestra</i>	8
<i>Preparación de estándares</i>	8
<i>Cuantificación de las principales metilxantinas</i>	9
Análisis estadístico	9
Caracterización del perfil de metilxantinas por cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem.....	10
<i>Preparación de muestras</i>	10
<i>Preparación de estándares</i>	10
<i>Caracterización del perfil de metilxantinas por UPLC-MS/MS</i>	10
<i>Tratamiento de datos</i>	11
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADO	13
Recolección de material vegetal	13
Cuantificación de metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV-vis)	13
Análisis estadístico	15
Caracterización de metabolitos en muestras de <i>Ilex guayusa</i>	23
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	25
Cuantificación de metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV-vis)	25
Análisis estadístico	25
Caracterización de metabolitos en muestras de <i>Ilex guayusa</i>	28
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
REFERENCIAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Diseño experimental factorial de niveles mixtos.	7
Tabla 2. Gradiente de trabajo fase móvil A ácido fórmico 0.1%, fase móvil B acetoneitrilo.	9
Tabla 3. Gradiente utilizado para la identificación de metilxantinas por UPLC-MS/MS	11
Tabla 4. Contenido de metilxantinas en hojas secas de <i>Ilex guayusa</i> por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	14
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de cafeína	15
Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de teobromina.	19
Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de teofilina.....	23
Tabla 8. Estándares de las principales metilxantinas para la identificación	23
Tabla 9. Metabolitos con nivel 1 y 2 de identificación, además, de metabolitos encontrados <i>en silico</i>	24

ÍNDICE DE GRÁFICOS O FIGURAS

Figura 1. Gráficos de caja de las concentraciones de cafeína en muestras de <i>Ilex guayusa</i>	16
Figura 2. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las diferentes chakras y las condiciones de luz.....	17
Figura 3. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las diferentes chakras y períodos de edad.	18
Figura 4. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las condiciones de luz y los diferentes periodos de edad.	19
Figura 5: Gráficos de caja de las concentraciones teobromina en muestras de <i>Ilex guayusa</i>	20
Figura 6: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las diferentes chakras y las condiciones de luz.	21
Figura 7: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las diferentes chakras y periodos de edad.....	21
Figura 8: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las condiciones de luz y los diferentes periodos de edad	22

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** 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 2.** 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 3.** 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 4.** Identificación de nivel 2 mediante la Global Natural Products Social Molecular Networking
- Anexo 5.** Identificación de nivel 1 mediante estándares de cafeína y teobromina en el Cromatograma de iones extraídos (EIC, por sus siglas en inglés)
- Anexo 6.** Identificación mediante la herramienta de fragmentación *in silico* UNIFI .
- Anexo 7.** Valores de los supuestos del análisis de la varianza (ANOVA)

RESUMEN

Ilex guayusa, un árbol nativo de la Región Amazónica (Colombia, Perú, Ecuador), ha despertado interés debido a sus compuestos fitoquímicos, especialmente las metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina) presentes en sus hojas. Aunque la literatura sobre la guayusa es limitada, varios estudios han explorado el contenido de metilxantinas en sus hojas, pero aún falta investigación que vincule su producción con condiciones ambientales, especialmente en el sistema indígena agroforestal conocido como chakra, donde se cultiva esta planta. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la variación de luz solar, edad y ubicación en la producción de metilxantinas presentes en hojas de *Ilex guayusa* de diferentes chakras. Se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector UV-vis (HPLC-UV-vis) para cuantificar las principales metilxantinas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las variables en las concentraciones. Además, se empleó Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (UPLC-MS) para detectar otras posibles metilxantinas o compuestos afines. Los resultados indicaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de metilxantinas en condiciones de luz, edad y chakra. Las plantas en sombra y las de 8 a 10 años mostraron mayor concentración. Las condiciones ambientales en las chakras demostraron un mayor efecto en conjunto que individual en la producción de metilxantinas. Por último, se identificaron 9 moléculas, destacando la detección de metil-liberina, un metabolito vinculado a la síntesis y catabolismo de las metilxantinas.

Palabras clave: *Ilex guayusa*, HPLC-UV-VIS, UPLC-MS, metilxantinas, luz solar, edad, chakra.

ABSTRACT

Ilex guayusa, a tree native to the Amazon Region (Colombia, Peru, Ecuador), has aroused interest due to its phytochemical compounds, especially the methylxanthines (caffeine, theobromine, theophylline) present in its leaves. Although the literature on guayusa is limited, several studies have explored the content of methylxanthines in its leaves, but there is still a lack of research linking its production to environmental conditions, especially in the indigenous agroforestry system known as chakra, where this plant is cultivated. The objective of this study was to determine the effect of varying sunlight, age and location on the production of methylxanthines present in *Ilex guayusa* leaves from different chakras. High Performance Liquid Chromatography with UV-vis detector (HPLC-UV-vis) was used to quantify the main methylxanthines. Analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effect of variables on concentrations. In addition, Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS) was used to detect other possible methylxanthines or related compounds. The results indicated significant differences ($p < 0.05$) in methylxanthine concentrations under light, age and chakra conditions. Plants in shade and those 8 to 10 years old showed higher concentrations. Environmental conditions in chakra showed a greater overall than individual effect on methylxanthine production. Finally, 9 molecules were identified, highlighting the detection of methyl-liberin, a metabolite linked to the synthesis and catabolism of methylxanthines.

Keywords: *Ilex guayusa*, HPLC-UV-VIS, UPLC-MS, methylxanthines, sunlight, age, chakra.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Antecedentes

Ilex guayusa (*I. guayusa*), es un árbol amazónico con un gran valor ancestral y etnobotánico ya que en los mitos culturales se menciona que mucho antes de ser una planta sagrada, la guayusa era un ser divino de gran fuerza física y potencial genético, infundía ánimo y levantaba el espíritu; un paradigma de fertilidad, así es como los indígenas la visualizaban en sus mitos quichua-amazónico [1]. Es así como los indígenas de la región evidenciaban y explicaban a través de sus mitos los beneficios que estos sentían al consumirla. Años después, con la llegada de los sacerdotes en las misiones cristianas en la amazonia describieron el uso de la guayusa como un energizante, un remedio para enfermedades venéreas y en caso de las mujeres para aumentar su fertilidad [2].

Ilex guayusa Loes. es el nombre científico actualmente aceptado, sin embargo, en la Amazonía ecuatoriana existen varios nombres: Huayusa o wayusa en el kichwa; wayus, wais o weisa para los shuar, guayusa para los secoya y algunas variantes en las diferentes culturas en el territorio de la Amazonía [3]. La guayusa es un árbol perenne, sus hojas son ovaladas o elípticas con alrededor de 7-22 cm de largo y 2.5-7 cm de ancho, con un margen aserrado o dentado [3,4]. Los árboles de guayusa pueden crecer una altura promedio de 10 m de altura y presentar tallos que miden de 2 a 15 cm a la altura del pecho. Originalmente consumida en el occidente del Amazonas como infusión de sus hojas [2]

Principalmente, la guayusa es un producto de sistemas agroforestales indígenas, estos colectivos suelen emplear prácticas agrícolas de bajo rendimiento, cultivando guayusa sin el uso de fertilizante, pesticidas o maquinaria pesada. El pueblo kichwa amazónico denomina a estas parcelas hortícolas como chakras [2,3]. La chakra amazónica combina el cultivo de alimentos básicos, árboles de madera, frutales, plantas ornamentales y medicinales principalmente representados por la yuca, el plátano y la chonta, aunque con el tiempo otras especies con valor comercial se han integrado como el cacao, el café y la guayusa [5].

Las chakras son sistemas complejos que se adaptan y resienten los efectos del cambio climático permitiendo el uso sostenible de los bosques capturando así altos niveles de carbono en comparación con otras formas de usos de tierra [6]. La chakra amazónica es un sistema de policultivo con un alto nivel de biodiversidad donde se han identificado más de 100 especies de plantas ofreciendo una oportunidad para la conservación especies endémicas, vulnerables y amenazadas, todo esto manteniendo un espacio familiar o comunitario productivo conservando patrones que se mimetizan con procesos naturales de sucesión o restauración de bosques [5].

En la actualidad, el interés internacional en hierbas de té y sus propiedades para la salud es fuerte, y comercialmente ha impulsado una tasa de crecimiento anual compuesta del 4.5% en el mercado mundial como pronóstico para el periodo 2018-2024 [3]. La Amazonía ecuatoriana representa una de las zonas con mayor biodiversidad del planeta, esta enorme variedad de plantas frecuentemente se convierte en fuente de interés para el desarrollo de nuevas materias primas para el mercado farmacéutico, cosmético y alimenticio [7].

En Ecuador ya existe un gran mercado de consumo de guayusa siendo la provincia amazónica de Napo la principal fuente de producción [8]. Además, la guayusa no es un alimento nuevo, ya que, en Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y Europa las hojas son comercializadas para infusión y consta en los respectivos registros y leyes de Alimentos de estos países. Consecutivamente, el fuerte y creciente interés internacional, en los últimos años, de las hierbas para tés y sus propiedades [3] que representa un atractivo para la industria nacional e internacional por las hojas de guayusa y sus propiedades fitoquímicas. Las exportaciones de guayusa han crecido a 100 toneladas por año desde el 2007 lo que indica el interés y el desarrollo de una industria en torno a la guayusa [8].

Los mayores exportadores de guayusa de Ecuador obtienen hojas frescas de colectivos agrícolas indígenas utilizando prácticas orgánicas, como producto del policultivo, generalmente se cultiva junto con otras especies comercialmente útiles. Por otra parte, si crece la demanda de guayusa aumentará el riesgo de adoptar prácticas agrícolas de mayor rendimiento que son menos compatibles con la conservación de la biodiversidad y la mitigación del cambio climático [3].

Wise & Santander (2018) [9], en un análisis del historial de usos de la guayusa, reportaron que no existe evidencia de que el consumo de guayusa sea peligroso y que se necesitaría la ingesta en gran cantidad en un corto periodo de tiempo, para que presente toxicidad en el cuerpo. Este estudio concuerda con los análisis de Kapp et al. (2016) [10] que concluyeron en base a experimentos en ratas que no hay evidencia de ningún tipo general o genético de toxicidad en guayusa.

La guayusa es perteneciente al género *Ilex* de cerca de 600 especies de la familia Aquifoliaceae, en algunas especies del género se ha encontrado en sus hojas alcaloides [1,2], específicamente metilxantinas como la cafeína, teobromina y teofilina [7]. No existen demasiados estudios sobre metilxantinas en *Ilex guayusa*, pero los estudios para un familiar cercano *Ilex paraguariensis* son más abundantes [3].

La cafeína es una sustancia psicoactiva con más popularidad en el mundo y, sin duda alguna, es una de las más aceptadas, toleradas y consumidas por la sociedad [7]. Desde bebidas, dulces y otros comestibles hasta medicamentos; la cafeína tiene un gran número de aplicaciones. Químicamente, la cafeína es un alcaloide xantínico (1, 3, 7 trimetilxantina) y presenta una acción farmacológica en el sistema nervioso central, cardiovascular y respiratorio. El contenido de cafeína en hojas de guayusa es bien conocido y ya existen productos como bebidas e infusiones a partir de esta planta [8].

La teobromina es miembro predominante en el cacao, sin embargo, se puede encontrar en pequeñas cantidades en algunas hojas que comúnmente sirven para infusiones, se considera un diurético, un relajante del músculo liso y un estimulante del miocardio y un vasodilatador que a diferencia de la cafeína es muy suave y contiene características antioxidantes [11]. De la misma manera que la cafeína, el uso más común de la teobromina es en bebidas y dulces en particular por ser predominante en el chocolate, por otra parte, esta ha adquirido un rol más importante en el tratamiento del asma [12].

Wise & Santander (2018) [8], describe que existe un mayor número de kilocalorías en 100 g en guayusa que en yerba mate. Además, describen que existe alrededor de 2.72% de cafeína en bolsas de hojas secas de guayusa de 1.5 g. Por otro lado, Lewis et al. (1991) [13] describe que las hojas de guayusa tienen alrededor de un 4% de metilxantinas en sus hojas siendo mayor la cantidad de cafeína y muy poco la de teobromina y otras metilxantinas. Es importante señalar que el contenido de cafeína en guayusa -proveniente de hojas secas- presenta un orden de magnitud por debajo de la dosis que la Comisión Técnica de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria considera como límite superior para las concentraciones de cafeína que "no suscitan preocupación" [8]

En este sentido, se ha buscado extraer la mayor cantidad de compuestos fitoquímicos, en especial de las metilxantinas como la cafeína y teobromina [3]. Lo cual llevaría al desarrollo de nuevos productos [8], y fármacos [7] a partir de esta planta. Por otra parte, en *Ilex guayusa* la cosecha se realiza a partir de los 4 años de edad hasta la muerte de la planta o hasta que este deje de ser útil para el agricultor [7]. Además, en *Ilex paraguariensis* se ha reportado que a diferentes condiciones de luz solar existe una diferencia en la concentración de metabolitos entre ellos las metilxantinas siendo la concentración de cafeína mayor en condiciones de sombra [14]. Por otro lado, en *Ilex guayusa* si bien se conoce la presencia de metilxantinas y valores referenciales de la concentración presentes en sus hojas [8,13], todavía no se conoce el efecto que causa la luz, ni otras variables, a la producción de estas.

Planteamiento del problema

La literatura científica relacionada con *Ilex guayusa* es escasa, siendo los pocos datos fitoquímicos recolectados hasta la fecha su contenido de metilxantinas, presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos [7], sin embargo, no existen estudios que mencionan los factores que afectan la producción de metilxantinas, mucho menos estudios donde se reporten resultados obtenidos dentro del sistema chakra. En otras palabras, la fitoquímica estudiada hasta ahora nos brinda un buen entendimiento de las plantas [3,7], pero la escasez de información de las interacción y respuestas de estos metabolitos frente a las condiciones ambientales, limita el avance en el entendimiento de los componentes de la guayusa y las condiciones de cultivo que pueden afectarlos. Por ejemplo, se ha realizado estudios en torno a las condiciones ambientales en el cultivo de *Ilex paraguariensis*, específicamente, centrados en el efecto que causa la edad, ubicación y luz solar en la producción de metabolitos secundarios resaltando en muchos casos las metilxantinas [14–17]. En este sentido, mejorar la comprensión del efecto de la luz solar, edad y ubicación en la producción de metilxantinas de hojas de guayusa permitirá obtener un mejor rendimiento en el metabolito deseado y dar valor agregado a la comercialización del producto.

Justificación de la investigación

El presente estudio posee un carácter de enfoque investigativo y práctico, centrado en la detección y análisis de variables asociadas a la producción de metilxantinas en la *Ilex guayusa*. Como un ejemplo se encontró en café una relación entre factores climáticos, geográficos y factores de cultivo; entre ellos la localización del cultivo, y sus condiciones de crecimiento [1].

Las condiciones en el sistema de cultivo chakra son totalmente aleatorias, sin embargo, la cantidad de luz que reciben las hojas de algunos árboles, la edad del árbol y el sector de cultivo son factores constantes e importantes que pueden afectar la producción de metilxantinas [2]. Por lo tanto, determinar las condiciones que afectan a la producción de metilxantinas permitirá recolectar mejores hojas para el desarrollo de productos farmacéuticos [3] y la industria alimenticia [4], sin alterar este sistema agroforestal indígena.

Utilizar las variables dentro del sistema chakra para mejor concentración de metabolitos específicos tiene varios beneficios para los productores al aprovechar al máximo los recursos naturales disponibles, optimizar el uso del suelo y agua, y aumentar sus ingresos al ofrecer productos de mayor valor agregado [5]. Además, es necesario aclarar que el conocimiento fitoquímico de la guayusa es limitado [3], por ende, es necesario el estudio de las variables asociadas a la producción de metilxantinas en sistemas agroforestales indígenas facilitando el entendimiento del cultivo y la fitoquímica de la guayusa, además de favorecer la conservación del sistema chakra.

Objetivos de la investigación.

Objetivo general

Determinar el efecto de la variación de luz solar, edad y ubicación en la producción de metilxantinas presentes en hojas de *Ilex guayusa* de diferentes chakras.

Objetivos específicos

Cuantificar las principales metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) presentes en las hojas colectadas a través de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un sistema de detección UV-vis.

Analizar mediante métodos estadísticos los efectos de las variables luz, edad y chakra en la producción de metilxantinas en hojas de *Ilex guayusa*.

Identificar el perfil completo de las metilxantinas presentes en las muestras de hojas por LC/MS.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

Diseño experimental

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**). Las hojas fueron recolectadas en 3 chakras diferentes 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). La exposición a luz solar se dividió en dos condiciones: sombra (-) en un rango de 0 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz (+) en mediciones superiores a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La edad se dividió en 3 diferentes: temprano (0) de árboles entre 4 a 6 años (< 6), medio (1) de árboles entre 6 a 8 años (<8) y tardío (2) de árboles entre 8 a 10 años.

Tabla 1. Diseño experimental factorial de niveles mixtos.

Condiciones de luz		Chakra A		Chakra B		Chakra C	
		+	-	+	-	+	-
Edad	0	A0+	A0-	B0+	B0-	C0+	C0-
	1	A1+	A1-	B1+	B1-	C1+	C1-
	2	A2+	A2-	B2+	B2-	C2+	C2-

Realizado por: Fernández, Mateo; Garzón, Tomás; 2024.

Recolección de material vegetal

Los agricultores de las diferentes chakras al formar parte de la Asociación Kallarí llevan un registro y control de productos, uno de estos es la edad lo cual facilitó la selección de árboles en los diferentes períodos de edad. Posterior, se visualizó si la posición en que se encuentra el árbol está en condiciones de luz o sombra, para esto se realizaron varias mediciones de PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) tomadas a la altura del pecho con un sensor de fotoperiodo para determinar si cumple con la condición. Las hojas fueron recolectadas bajo el mismo principio etnobotánico con el cual recolectan los agricultores, el cual consiste en seleccionar las ramas que no tengan “gogoyos”, es decir, hojas pequeñas de un color rojizo en la punta que indica que la rama es joven; solo se recolectaron hojas de un color verde oscuro ya que los agricultores mencionan que la hoja madura es oscura y buena para el secado a diferencia de la joven de color

más claro que muchas veces no seca y se llega a dañar por su alto contenido de humedad. Las hojas recolectadas fueron envueltas en hojas de papel periódico, debidamente etiquetadas con sus tipos de variable y guardadas en una hielera con geles fríos.

Secado y triturado de las hojas.

Las hojas recolectadas fueron lavadas con agua destilada o Tipo II y sometidas a un proceso de secado en horno con marca ESCO Isotherm modelo OFA-54-9 de 15 a 17 h a 45°C. Posteriormente, las hojas fueron trituradas y almacenadas para su análisis.

Análisis de muestras por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Preparación de muestra

Para la preparación de la muestra inicialmente se pesaron 200 mg de muestra por triplicado en vasos de precipitados de 50 ml, luego, se colocó 50 ml de agua ultrapura (Tipo I) medida en una probeta de la misma cantidad. Seguidamente, se colocaron en una plancha de agitación Fisherbrand isotherm a una temperatura de 200°C con una agitación de 200 rpm por 10 min, en promedio, la temperatura del vaso de precipitación fue de 70 °C. Una vez transcurrido los 10 minutos se retiró de la plancha y se enfrió la muestra hasta que esté a temperatura ambiente, luego se colocó en un matraz aforado de 50 ml hasta enrasar. Finalmente, se homogeneizó y filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y se colocaron en viales de 1 ml para su posterior análisis.

Preparación de estándares

Se preparó 100 ml de una solución madre de cafeína, teobromina y teofilina (SupelcoPharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material) a una concentración de 200 mg/L, 20 mg/L y 20 mg/L respectivamente. El rango de trabajo fue del 5% al 100% de la concentración de la solución madre, con el fin de evaluar los intervalos de linealidad del procedimiento analítico.

Cuantificación de las principales metilxantinas

La cuantificación de las principales metilxantinas se realizó a través de un cromatógrafo marca Waters, modelo 1525 para el módulo de Bombas binarias, 2489 detector UV/Visible y 2707 autosampler. Para la separación cromatográfica se empleó una columna Marca Phenomex Gemini C18 (150 x 2 mm), 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% como solvente A y acetonitrilo grado HPLC como solvente B. El caudal fue de 1.0 ml/min en modo gradiente descrito en la **Tabla 2**. La longitud de onda para determinación de los eluyentes fue 273 nm. Se trabajó con el área bajo la curva de cada componente, las cuales se procesaron a través del software del equipo (EMPOWER 3).

Tabla 2. Gradiente de trabajo fase móvil A ácido fórmico 0.1%, fase móvil B acetonitrilo.

Tiempo (min)	%Disolvente A	%Disolvente B
0.01	92.5	7.5
8.00	85	15
12.00	10	90
15.00	10	90
17.00	92.5	7.5
23.00	92.5	7.5

Realizado por: Fernández, Mateo; Garzón, Tomás; 2024

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Python versión 3 (Python Software Foundation), específicamente, se utilizó la librería statsmodels versión 0.14.0 (2009-2023, Josef Perktold, Skipper Seabold, Jonathan Taylor, statsmodels-developers). Se realizó el test Shapiro–Wilk, homocedasticidad y el test 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). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA multidireccional) para determinar la significancia ($p < 0,05$) de las diferencias entre las diferentes condiciones de luz, edad y ubicación.

Caracterización del perfil de metilxantinas por cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem

Preparación de muestras

Para la preparación de la muestra inicialmente se pesó 10 mg de hoja seca en un tubo Eppendorf de 2 ml, a continuación, se colocó 1.5 ml de etanol y se sónico por 30 minutos a una temperatura de 30 °C y se centrifugó a 10.000 rpm x 10 minutos. Después, se recogió el líquido sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 ml, posterior, se concentraron las muestras en un concentrador marca Genevac modelo miVac Centrifugal Concentrators por 60 minutos. Por último, se rehidrató con 1 ml de agua ultrapura (Tipo I) y a continuación se combinaron los extractos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, después, se realizó vortex por 3 minutos y se transfirió a un vial para su análisis.

Preparación de estándares

Se preparó 50 ml soluciones madre de cafeína, teobromina y teofilina a una concentración de 20 mg/L. A partir de las cuales se preparó 10 ml de soluciones de estándar de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) a 200 µg/L. Los estándares se usaron para optimizar los parámetros del equipo UPLC MS/MS (caudal, volumen de inyección, energía de colisión, entre otras), para ello se testearon concentraciones entre 10 y 200 µg/L.

Caracterización del perfil de metilxantinas por UPLC-MS/MS

La adquisición de datos se realizó por el equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (UPLC-MS/MS) marca Waters modelo Acquity I-Class para el módulo LC acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo con tiempo de vuelo modelo XEVO G2-XS QTOF. La separación cromatográfica se logró utilizando una columna Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (100 × 2,1 mm), 1,8 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en ácido fórmico 0.1% (Solvente A) y acetonitrilo con ácido fórmico 0.1% (Solvente B) el caudal fue de 0,5 mL/min en modo gradiente (**Tabla 3**). El volumen de inyección fue de 10 µl. La ionización por electro-pulverización (ESI) se realizó en modo positivo para las adquisiciones de datos MS. Las condiciones de análisis MS/MS se realizaron en modo de adquisición dependiente de datos (DDA) con un rango de barrido entre m/z 100 -

1200 con tres energías de colisión 10 - 20 y 40 eV, el voltaje capilar se mantuvo a 0.5 kV, la temperatura de la fuente fue de 120 °C, una temperatura de desolvatación de 450 °C y un caudal de gas de desolvatación de nitrógeno de 900 L h⁻¹, el flujo de gas de cono se mantuvo a 0 L h⁻¹, argón fue utilizado como gas de colisión, el rango de escaneo 100–1200 m/z unidades.

Tabla 3. Gradiente utilizado para la identificación de metilxantinas por UPLC-MS/MS

Tiempo (min)	%Disolvente A	%Disolvente B
0.01	99.0	1.0
1.00	99.0	1.0
12.00	0.0	100
14.00	0.0	100
14.50	99.0	1.0
16.50	99.0	1.0

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Tratamiento de datos

Para la identificación sin estándar de metabolitos (nivel 2) se usó la biblioteca de Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) ([GNPS Documentation \(ccms-ucsd.github.io\)](https://ccms-ucsd.github.io/GNPS_Documentation)) resultando en archivos. mgf o. mzML que se convirtieron a partir de los conjuntos de datos sin procesar de Waters de acuerdo con las instrucciones en línea ([Mass Spectrometry File Conversion - GNPS Documentation \(ccms-ucsd.github.io\)](https://ccms-ucsd.github.io/GNPS_Documentation/Mass_Spectrometry_File_Conversion)). La tolerancia de masa del ion precursor como la del ion fragmento se fijó en 0,02 Da. Posteriormente, se estableció una red molecular en la que se filtraron los bordes para que tuvieran más de 3 fragmentos coincidentes y una puntuación de coseno superior a 0.70.

Los datos fueron tratados con antelación en el software MZmine versión 3.9.0 ([MZmine 3 Documentation](https://mzmine.github.io/MZmine3_Documentation)) para metabolómica no dirigida de datos del tipo DDA. Algunos de los parámetros usados en el software fueron, altura mínima del pico MS1 de 100 amplitud, corte de abundancia de MS/MS de 18 amplitud, corte del puntaje de identificación de 80 ppm y se eliminaron los picos del blanco presentes en las muestras.

La identificación de nivel 1 a partir de estándares se realizó mediante la verificación del tiempo de retención (RT) con el estándar de referencia (cafeína, teobromina y teofilina), así como su ion molecular. Por último, se analizaron e identificaron las estructuras químicas de moléculas mediante la herramienta de fragmentación *in silico* UNIFI ([Sistema de información científica UNIFI | Waters](#)) buscando en la base de datos estructural ChemSpider (chemspider.com). El análisis de datos se realizó en primer lugar confirmando la composición de los fragmentos MS/MS correspondientes a los iones precursores. En segundo lugar, se buscaron los posibles nombres químicos y estructuras utilizando la fórmula molecular o la masa exacta en la base de datos de estructuras de metilxantinas cargada en UNIFI. Por último, se confirmó la autenticidad y la fiabilidad del compuesto en la data comparando los iones MS y MS/MS.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADO

Recolección de material vegetal

Mediante varias visitas se seleccionaron las chakras para el estudio, su localización y descripción son las siguientes: Talag (1°04'59.5"S 77°53'24.6"W, 504 msnm), en este cultivo si bien se plantan variedad de alimentos y especies cada una tiene su sección, es decir, existen parcelas destinadas para el cultivo de una sola especie de planta incluyendo la guayusa (**Anexo 1**). Alto Pano (1°00'08"S 77°53'36"W, 665 msnm), en este cultivo los árboles de guayusa se encuentran con árboles de cacao (*Theobroma cacao*) y palmeras de chonta (*Bactris gasipaes*) pero se encuentra a una distancia aproximada de un metro por árbol, aun así, algunas palmeras de chonta generan sombra sobre los árboles de guayusa (**Anexo 2**). Alto Tena (0°56'21.4"S 77°52'31.1"W, 660 msnm) en este cultivo las plantas de guayusa se encuentran en competencia con varios árboles y palmeras, sin embargo, hay una separación irregular entre cada árbol o palmera de entre uno y tres metros, además de tener competencia con algunos arbustos (**Anexo 3**). Se recolectó en total muestras de hojas de 54 árboles de guayusa que cumplían las condiciones (luz y edad) en las diferentes chakras, estas muestras fueron etiquetadas y posteriormente se realizó un pool de cada combinación de variables.

Cuantificación de metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV-vis)

Las inyecciones en el equipo se realizaron en 3 grupos, para cada grupo se preparó una curva de calibración, las ecuaciones de la recta para cada curva fueron las siguientes:

Cafeína: $Y = 1.80e^{004} X + 1.44e^{004}$, $R^2 = 0.999656$; $Y = 1.75e^{004} X + 8.67e^{004}$, $R^2 = 0.994052$; $Y = 1.81e^{004} X + 4.62e^{004}$, $R^2 = 0.999162$.

Teobromina: $Y = 1.54e^{004} X + 3.08e^{003}$, $R^2 = 0.998960$; $Y = 1.46e^{004} X - 6.96e^{002}$, $R^2 = 0.994471$; $Y = 1.84e^{004} X + 4.09e^{003}$, $R^2 = 0.998719$.

Teofilina: $Y = Y = 1.72e^{004} X + 7.62e^{002}$, $R^2 = 0.999656$; $Y = 2.24e^{004} X + 1.43e^{004}$, $R^2 = 0.995608$; $Y = 2.07e^{004} X + 1.72e^{004}$, $R^2 = 0.997902$.

El límite inferior de la curva para teobromina y teofilina fue de 1 mg/L ya que una concentración menor a esta dificulta la integración de picos cromatográficos al confundirse con el ruido, sin embargo, mediante la interpolación de las curvas de calibración se encontró en las muestras concentraciones menores a este límite en los casos que se logró detectar un pico cromatográfico.

Tabla 4. Contenido de metilxantinas en hojas secas de *Ilex guayusa* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Chakra	Condición de luz	Periodo de edad	Contenido de metilxantinas (media $\pm$ DS, mg g ⁻¹ de hoja seca)		
			Cafeína	Teobromina	Teofilina
A	+	0	25.851 $\pm$ 0.892	0.167 $\pm$ 0.009	
A	-	0	28.664 $\pm$ 0.39	0.029 $\pm$ 0.002	
A	+	1	23.055 $\pm$ 0.711	0.187 $\pm$ 0.009	
A	-	1	25.602 $\pm$ 0.527	0.06 $\pm$ 0.004	0.076 $\pm$ 0.013
A	+	2	38.755 $\pm$ 0.73	0.344 $\pm$ 0.013	
A	-	2	30.532 $\pm$ 1.115	0.119 $\pm$ 0.007	0.063 $\pm$ 0.01
B	+	0	34.462 $\pm$ 2.744	0.452 $\pm$ 0.037	1.881 $\pm$ 0.677
B	-	0	33.505 $\pm$ 1.593	0.502 $\pm$ 0.036	1.645 $\pm$ 0.42
B	+	1	24.764 $\pm$ 2.136	0.389 $\pm$ 0.074	1.44 $\pm$ 0.381
B	-	1	37.533 $\pm$ 1.899	0.571 $\pm$ 0.071	1.619 $\pm$ 0.159
B	+	2	29.511 $\pm$ 1.625	0.389 $\pm$ 0.017	1.291 $\pm$ 0.573
B	-	2	46.745 $\pm$ 2.383	0.773 $\pm$ 0.243	1.667 $\pm$ 0.537
C	+	0	28.41 $\pm$ 1.385	0.453 $\pm$ 0.087	0.096 $\pm$ 0.00
C	-	0	28.958 $\pm$ 0.695	0.229 $\pm$ 0.006	
C	+	1	25.387 $\pm$ 0.905	0.211 $\pm$ 0.021	
C	-	1	40.497 $\pm$ 0.425	0.208 $\pm$ 0.085	
C	+	2	39.549 $\pm$ 0.38	0.311 $\pm$ 0.001	
C	-	2	37.195 $\pm$ 1.134	0.371 $\pm$ 0.022	

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

La mayor concentración de metilxantinas se encontró en las plantas en período tardío de Alto Pano que se encontraban en la sombra (B2-). Estas tienen el contenido más alto de cafeína con 46.745 $\pm$ 2.383 mg/g_{hoja seca} (Tabla 4) y teobromina con 0.773 $\pm$ 0.243 mg/g_{hoja seca} (Tabla 4), sin embargo, la mayor concentración de teofilina se encontró en

las plantas en el período temprano de Alto Pano que recibían abundante luz solar (B0+) presentando una concentración de 1.881 ± 0.677 mg/g_{hoja seca} (**Tabla 4**). Por otro lado, no se logró cuantificar la concentración de teofilina de todas las muestras, siendo la chakra de Alto Pano (B) la única que presenta concentración en todas sus muestras y pocas excepciones en las chakras de Talag (A) y Alto Tena (C), no obstante, esto no niega la existencia de teofilina en las otras muestras ya que la concentración puede ser tan baja que el pico cromatográfico se confunde con el ruido.

Análisis estadístico

Los valores de las pruebas paramétricas para comprobar los supuestos del ANOVA fueron correctos (**Anexo 6**), en este sentido, en la **tabla 5** se puede apreciar el análisis de varianza (ANOVA) con respecto a cafeína, esto con la finalidad de observar que concentraciones obtenidas presentan una diferencia significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de cafeína.

	df	sum_sq	mean_sq	F	PR(>F)
Chakra	2	326.8597	163.4298	84.3284	$2.6E^{-14}$
Condición de luz	1	259.8745	259.8745	134.0930	$1.07E^{-13}$
Período de edad	2	645.9563	322.9781	166.6540	$6.32E^{-19}$
Chakra: Condición de luz	2	254.5594	127.2797	65.6752	$9.73E^{-13}$
Chakra: Período de edad	4	123.9360	30.9840	15.9874	$1.3E^{-07}$
Condición de luz: Período de edad	2	228.0676	114.0338	58.8404	$4.51E^{-12}$
Chakra: Condición de luz: Período de edad	4	423.2477	105.8119	54.5980	$8.52E^{-15}$
Residual	36	69.7685	1.9380		

Realizado por: Fernández, Mateo; 2022

En este sentido, se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de las concentraciones de cafeína (Tabla 4) entre las diferentes condiciones de luz, edad y ubicación (**Tabla 5**). Además, exhiben una mayor concentración media mayor a 30 mg/g_{hoja seca} en las chakras de Alto Pano y Alto Tena en comparación con la chakra de Talag (**Figura 1**). Por otro lado, se encontró una mayor concentración media de cafeína en las plantas que crecen en sombra a diferencias de las que crecen en luz con una media de 27 mg/g_{hoja seca} (**Figura 1**). Por último, la concentración media más alta la presentan las plantas de 8 a 10 años con 39 mg/g_{hoja seca}, seguidas de las plantas de 4 a 6 años con 29 mg/g_{hoja seca} y con la concentración media más baja las plantas de 6 a 8 años (**Figura 1**).

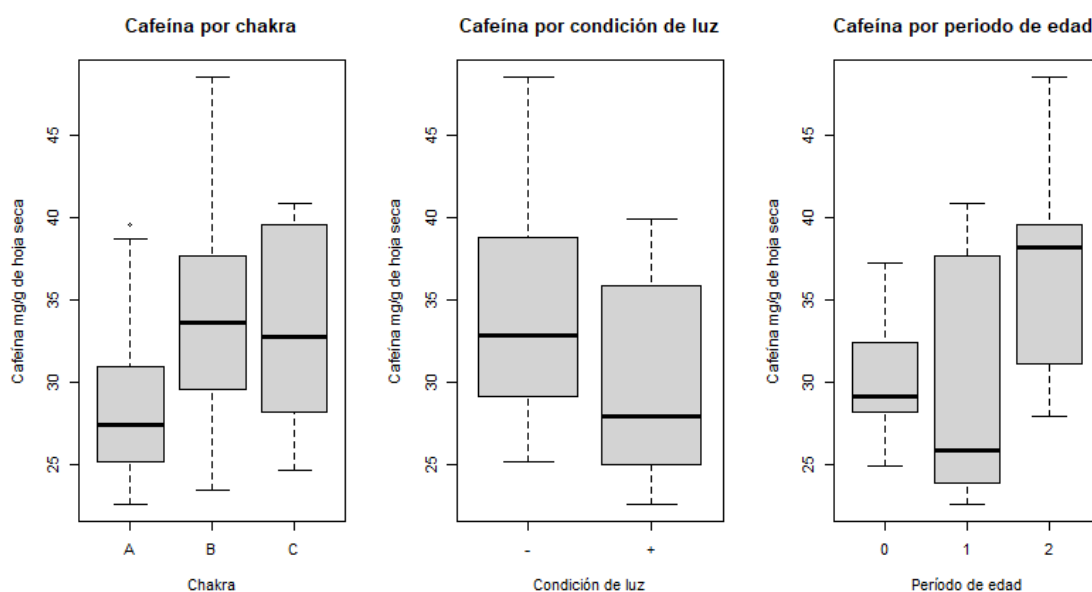


Figura 1. Gráficos de caja de las concentraciones de cafeína en muestras de *Ilex guayusa*. Realizado por: Fernández, Mateo; 2024.

Por otra parte, al contrastar el efecto en la concentración de cafeína en las diferentes chakras con relación a las condiciones de luz (**Figura 2**) podemos visualizar un aumento de cafeína en las condiciones de sombra en las chakras de Alto Pano y Alto Tena mostrando una concentración superior en 34.48% y 12.90% respectivamente en sombra con respecto a la luz. Sin embargo, la chakra de Talag no presenta una diferencia entre condiciones de luz en las concentraciones de cafeína, además, está chakra presenta las concentraciones más bajas de cafeína de todas las chakras estudiadas.

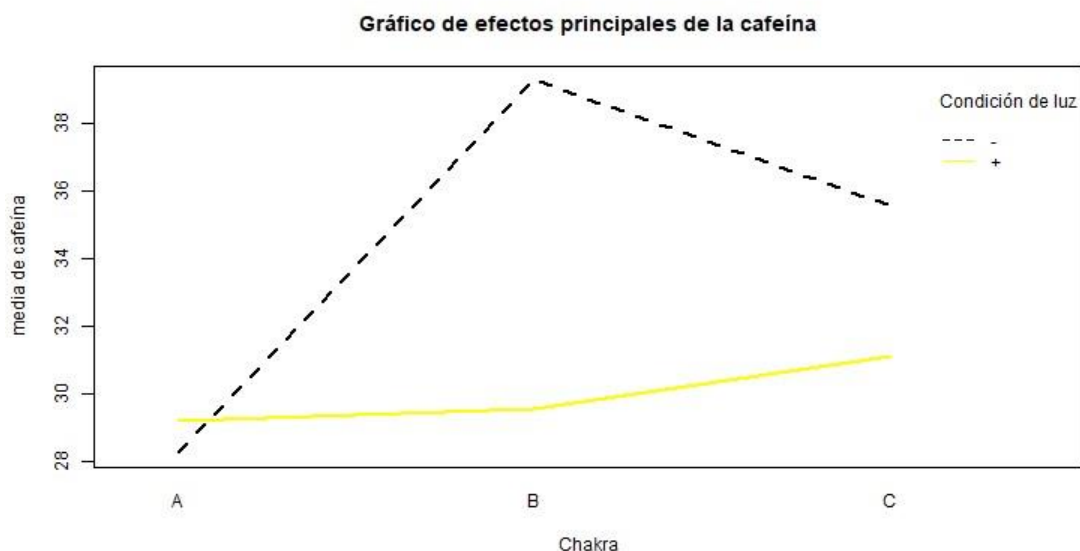


Figura 2. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las diferentes chakras y las condiciones de luz.

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024.

De la misma manera, el efecto en la concentración de cafeína al contraponer las diferentes chakras con relación a los periodos de edad (**Figura 3**) podemos visualizar una diferencia significativa en el periodo tardío con concentraciones superiores a 35 mg/g_{hoja seca} en todas las chakras en comparación con los períodos temprano y medio. Además, es posible visualizar que el periodo de medio presenta una concentración menor en aproximadamente un 13% a la concentración del periodo temprano, este comportamiento es igual en las chakras de Talag y Alto Pano, sin embargo, este comportamiento cambia en la chakra de Alto Tena donde la concentración en el periodo medio aumenta en un 14.28% con respecto a la concentración en el período temprano.

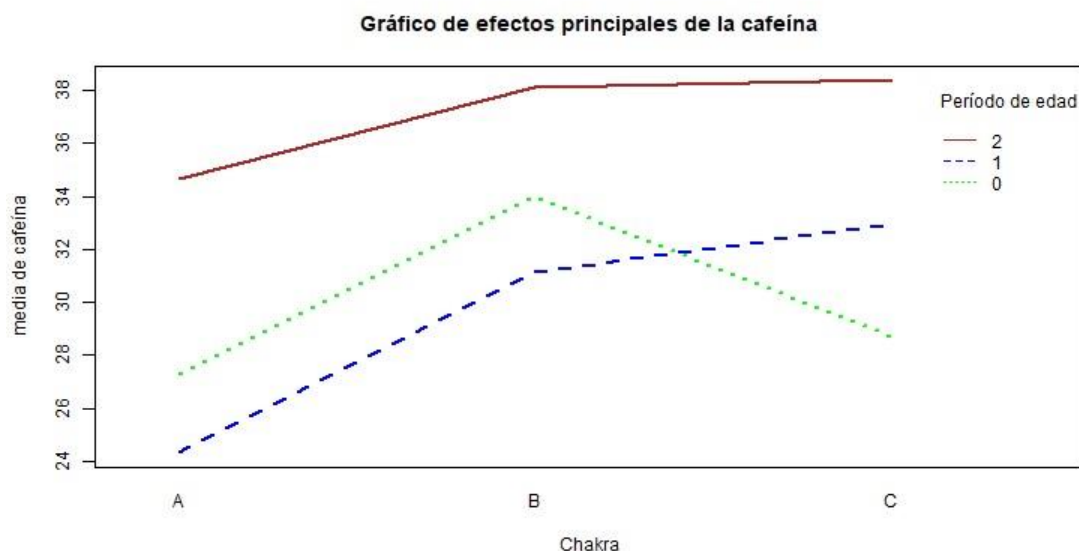


Figura 3. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las diferentes chakras y períodos de edad.

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024.

Por otra parte, comparando el efecto entre las diferentes condiciones de luz y edad en la concentración de cafeína (**Figura 4**) podemos visualizar una diferencia significativa en el periodo tardío con concentraciones superiores a 35 mg/g_{hoja seca}. Además, en el periodo medio disminuye la concentración un 11% en la condición de sombra y un 50% en la condición de luz con respecto al periodo tardío. Por otra parte, la concentración tanto en luz como en sombra es mayor en el período tardío en alrededor de un 25% en comparación al período temprano.

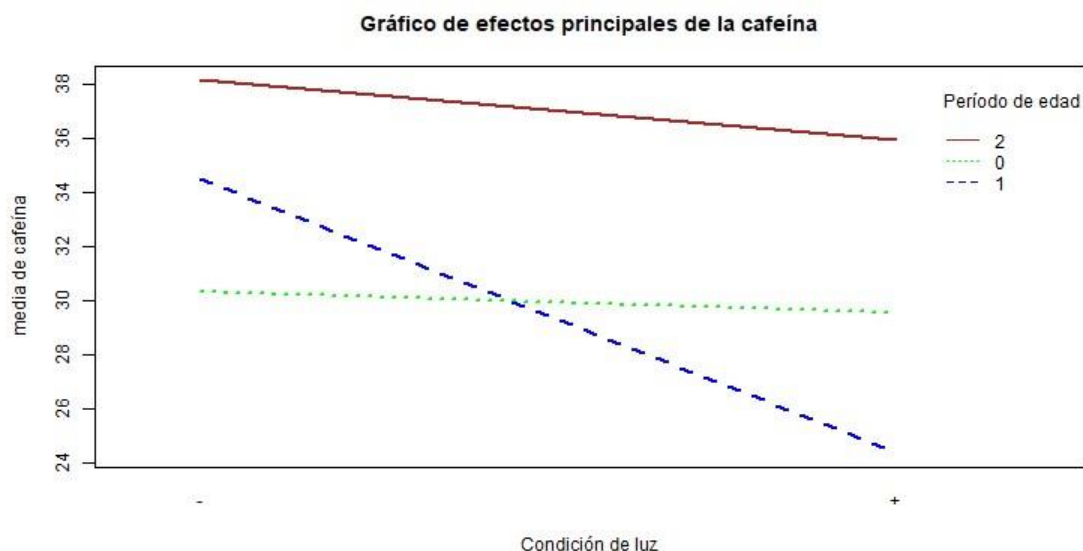


Figura 4. Gráficos de efectos principales en las concentraciones de cafeína entre las condiciones de luz y los diferentes periodos de edad.

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024.

A continuación, los valores de las pruebas paramétricas para comprobar los supuestos del ANOVA fueron correctos (**Anexo 6**), en este sentido en la **tabla 6** se puede apreciar el análisis de varianza (ANOVA) con respecto a teobromina, esto con la finalidad de observar que concentraciones obtenidas presentan una diferencia significativamente ($p < 0,05$)

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de teobromina.

	df	sum_sq	mean_sq	F	PR(>F)
Chakra	2	1.1927	0.5963	121.0015	1.05E ⁻¹⁶
Condición de luz	1	0.0002	0.0002	0.0554	0.815214
Período de edad	2	0.1220	0.0610	12.3843	8.08E ⁻⁰⁵
Chakra: Condición de luz	2	0.3234	0.1617	32.8155	7.71E ⁻⁰⁹
Chakra: Período de edad	4	0.0497	0.0124	2.5246	0.0576
Condición de luz: Período de edad	2	0.0736	0.0368	7.4735	0.0019
Chakra: Condición de luz: Período de edad	4	0.0866	0.0216	4.3954	0.0053
Residual	36	0.1774	0.0049		

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024.

De esta forma, se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de las concentraciones de teobromina (**Tabla 4**) entre las diferentes chakras y periodos de edad (Tabla 6), sin embargo, no existe una diferencia significativa entre las condiciones de luz. Además, exhiben una mayor concentración media las chakras de Alto Pano con una media de 0.5 mg/g_{hoja seca}, seguida por la chakra de Alto Tena con una media de 0.3 mg/g_{hoja seca} y por último la chakra de Talag con una media de 0.1 mg/g_{hoja seca} (**Figura 5**). Aparte, se encontró mayor concentración de teobromina en las plantas que crecen en sombra, no obstante, no hay una diferencia significativa en las medias de ambas condiciones (**Figura 5**). Por último, la concentración media más alta la presentan las plantas en periodo tardío, seguidas de las plantas en periodo temprano y con la concentración media más baja las plantas en periodo medio al igual que sucede con las concentraciones de cafeína (**Figura 5**).

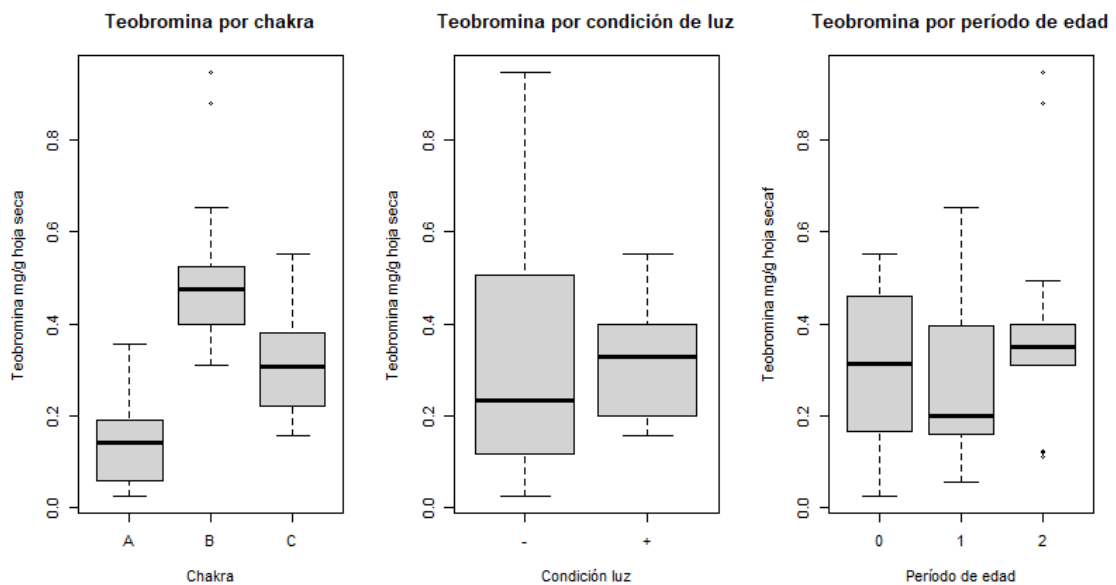


Figura 5: Gráficos de caja de las concentraciones teobromina en muestras de *Ilex guayusa*.
Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

De igual manera, al contrastar el efecto en la concentración de teobromina en las diferentes chakras con relación a las condiciones de luz (**Figura 6**) podemos visualizar un aumento aproximadamente en un 50% entre las condiciones de sombra con respecto a la luz en la chakra de Alto Pano. Por el contrario, existe una interacción en las chakras de Talag y Alto Tena presentando una menor concentración las plantas que se encuentran en sombra con respecto a las plantas que se encuentran en luz.

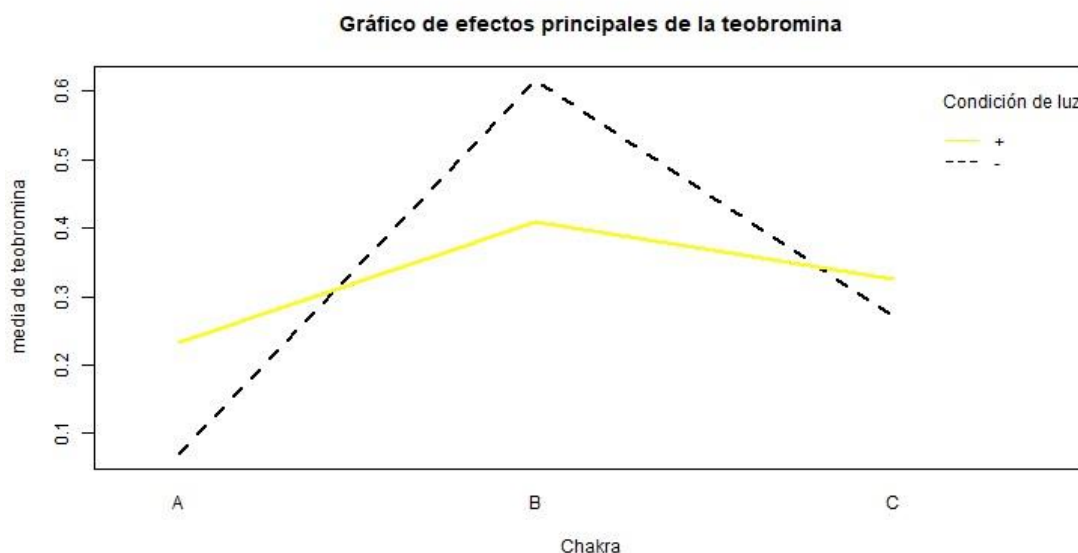


Figura 6: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las diferentes chakras y las condiciones de luz.

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Por otro lado, el efecto en la concentración de teobromina al contraponer las diferentes chakras con relación a los periodos de edad (**Figura 7**) podemos visualizar un aumento en la concentración aproximadamente en un 20 a 40 % en el período tardío con respecto a los periodos temprano y medio en las chakras de Talag y Alto Pano. Sin embargo, en la chakra de Alto Tena la concentración en el periodo temprano y tardío es superior en un 50% con respecto al periodo medio.

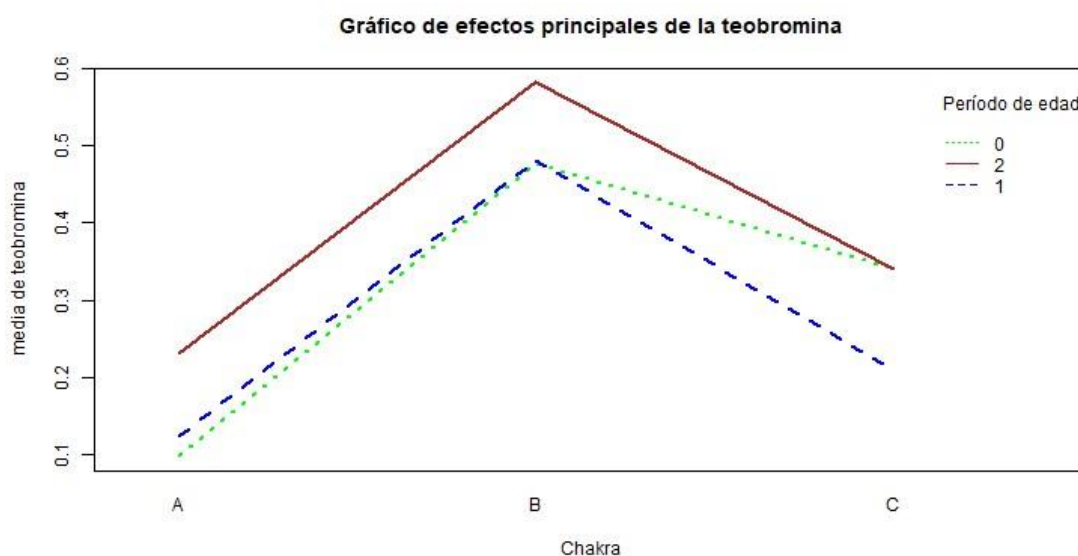


Figura 7: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las diferentes chakras y periodos de edad.

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

De la misma manera, comparando el efecto entre las diferentes condiciones de luz y edad en la concentración de teobromina (**Figura 8**) podemos visualizar una mayor concentración en la sombra con respecto a la luz en los periodos de medio y tardío, sin embargo, en el periodo temprano existe una mayor concentración en la luz con respecto a la sombra. Por otra parte, la concentración en las plantas en sombra tiende a aumentar de acuerdo con la edad presentado en periodo tardío un aumento en la concentración de un 80% con respecto a los periodos temprano y medio, en cambio, en luz el comportamiento no es igual ya que presenta una interacción en las concentraciones de los periodos temprano y tardío siendo ambos mayores aproximadamente en un 40%.

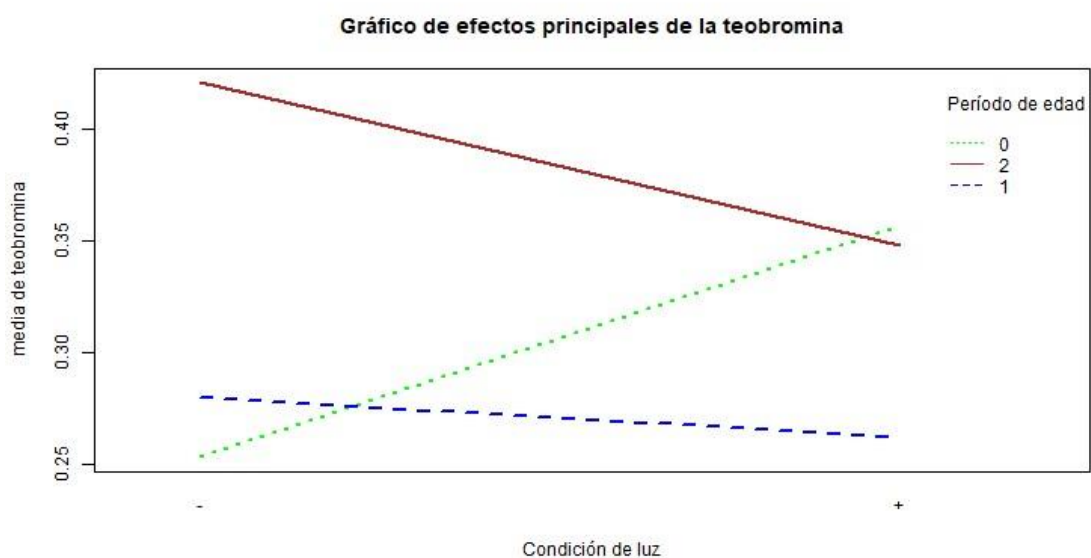


Figura 8: Gráficos de efectos principales en las concentraciones de teobromina entre las condiciones de luz y los diferentes periodos de edad.
Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Por último, los valores de las pruebas paramétricas para comprobar los supuestos del ANOVA fueron correctos (**Anexo 6**), pero no fue posible determinar el efecto de las diferentes ubicaciones en la concentración de teofilina, sin embargo, se realizó un ANOVA en la chakra de Alto Pano donde se logró cuantificar la concentración en todas sus muestras, pero no se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las diferentes condiciones de luz y edad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) con respecto al contenido de teofilina

	df	sum_sq	mean_sq	F	PR(>F)
Condición de luz	1.0	0.1110	0.1110	0.4861	0.5001
Período de edad	2.0	0.1947	0.0973	0.4263	0.6632
Condición de luz: Período de edad	2.0	0.4790	0.2395	1.0485	0.3829
Residual	11.0	2.5125	0.2284	NaN (Not a Number)	NaN (Not a Number)

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Caracterización de metabolitos en muestras de *Ilex guayusa*

Se encontraron 7 metabolitos en total con nivel 2 de identificación (**Anexo 4**), 2 metabolitos con nivel 1 de identificación (**Anexo 5**) y 3 metabolitos con la identificación *in silico* (**Anexo 6**). Se verificó la detección de masa a través de los estándares con una concentración de 200 µg/L (**Tabla 8**). Además, se comprobó la coincidencia de fragmentos de todos los metabolitos identificados en nivel 2 en conjunto con su respectivo Cromatograma de iones extraídos (EIC por sus siglas en inglés) superior a 300 unidades de intensidad. La cafeína fue identificada en todos los tipos de identificación (nivel 1 y 2, identificación *in silico*), por otra parte, la teobromina solo fue identificada en nivel 1 e *in silico* (**Tabla 9**). Por último, la teofilina no logró ser identificada por software debido a su bajo límite de detección.

Tabla 8. Estándares de las principales metilxantinas para la identificación

Estándar	RT (min)	Masa Mono-isotópica (m/z)	Masa detectada (m/z)	ppm
Cafeína	3.47	195.087659	195.0888	5.8486
Teobromina	2.75	181.072004	181.0739	10.4709
Teofilina	3.02	181.072004	181.0735	8.2619

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Una vez realizada la lectura de los estándares y una vez establecida la sensibilidad del espectrómetro de masas el cual arrojó un error de menos de 10 ppm, se procedió a la identificación. En esta se lograron identificar un aceto-ácido (ácido p-hidroxifenilpirúvico), un ácido hidroxicinámico (ácido cafeico) y un ácido salicílico (ácido cresotínico). Además, se identificó un sesquiterpeno (alismol), una amina aromática (N-fenil-1-naftalenamina) y un alcaloide tropano (atropina). Las metilxantinas identificadas

fueron la cafeína y la teobromina, por otro lado, se identificó *in silico* el ácido metilúrico (metil-liberina/teacrina) que conjunto con las metilxantinas son alcaloides de purina (Tabla 9).

Tabla 9. Metabolitos con nivel 1 y 2 de identificación, además, de metabolitos encontrados *in silico*.

Metabolito	Fórmula	RT (min.)	Masa experimental (mz) [M-H] + MS2	Masa experimental (mz) [M-H] + MS1	ppm
Metabolitos identificados con nivel 2					
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	3.45	195.0747	195.0898	10.9745
Ácido p- hidroxifenilpirúvico	C ₉ H ₈ O ₄	2.97	163.0275	181.0514	10.3397
Alismol	C ₁₅ H ₂₄ O	9.46	203.1648	221.192	9.1098
N-fenil-1- naftalenamina	C ₁₆ H ₁₃ N	9.26	220.0968	220.1132	5.1201
Atropina	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	3.75	290.1527	290.1754	1.1648
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	2.98	163.0272	181.0506	5.9210
Ácido cresotínico	C ₈ H ₈ O ₃	9.35	135.0344	153.056	8.9902
Metabolitos identificados con nivel 1					
Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	2.75	181.0733	181.0733	7.1573
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	3.47	195.098	195.098	11.9997
Metabolitos identificados <i>in silico</i>					
Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	2.75	181.0733	181.0733	7.1573
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	3.47	195.098	195.098	11.9997
Metil-liberina /Teacrina	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	3.24	225.0922	225.0929	23.6252

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Cuantificación de metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV-vis)

Durante la cuantificación se encontró una concentración de cafeína del 2.48 % al 4.7% y una concentración de teobromina del 0.003% y 0.77% en las muestras estudiadas. Estas concentraciones son similares a las encontradas por Lewis et al. (1991) [6] en hojas de *Ilex guayusa*, con una concentración del 1.73% al 3.48% de cafeína y 0.02% al 0.12% de teobromina, sin embargo, en su estudio no se logró cuantificar teofilina. Por otra parte, Negrin et al (2019) [7] en su estudio encontró en *Ilex guayusa* una concentración del 1.91% al 2.62% de cafeína y 0.008% al 0.025% de teobromina, sobre todo, utilizando algunos métodos de separación y concentración logró cuantificar teofilina en una concentración de 0.002 a 0.005 mg/g_{hoja seca} mucho menores a las encontradas en este estudio que rondan de 0.076 a 1.67 mg/g_{hoja seca} (**Tabla 4**).

Análisis estadístico

Mediante el análisis de varianza (Anova) se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las condiciones de luz (+) y sombra (-) en las concentraciones de cafeína (**Tabla 5**) siendo mayores en las de plantas en sombra (**Figura 1**). De la misma manera, Riachi et al. (2018) [2] en su ensayos realizados en *Ilex paraguariensis* con el fin de conocer el efecto de la intensidad de luz encontró de la misma manera una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las condiciones de luz y sombra siendo las plantas en sombra las que presentaban una mayor concentración de cafeína. Sin embargo, el gráfico de efectos principales entre las chakras y las condiciones de sombra (**Figura 2**) muestra que el efecto de las condiciones de luz no es constante en todas las chakras, es decir, no en todas las chakras estudiadas la mayor concentración de cafeína se encontraba en las plantas en sombra. De igual forma, el gráfico de efectos principales entre las condiciones de sombra y los periodos de edad (**Figura 4**) muestra concentraciones mayores en sombra que disminuyen conforme se acercan a la condición de luz, no obstante, en el periodo medio que comprende de 4 a 6 años (0), que es por lo general el tiempo donde los agricultores más suelen cosechar este árbol [8], no presenta una variación significativa entre las condiciones de luz.

Por el contrario, no se encontró diferencia ($p < 0,05$) entre las condiciones de luz (+) y sombra (-) en las concentraciones de teobromina (**Tabla 6**), ahora bien, las plantas en sombra presentan las concentraciones más altas de teobromina (**Figura 5**) de la misma manera que ocurre con la cafeína. Por otro lado, Coelho et al. (2007) [9] encontró en sus experimentos para determinar el efecto de la intensidad de la luz sobre el contenido de metilxantina en *Ilex paraguariensis* que el contenido de teobromina presenta una diferencia significativa ($p < 0,05$) en condiciones de extrema sombra (5% de la luz solar), sin embargo, en una sombra natural intermedia (41% de la luz solar) no existía una diferencia significativa ($p < 0,05$) pero sí existía una mayor concentración en las plantas en sombra. En cambio, el gráfico de efectos principales entre las chakras y las condiciones de sombra (**Figura 6**) muestra que en solo una chakra (B) la concentración de teobromina es superior en sombra, no obstante, las otras chakras analizadas (A y C) la concentración de teobromina no es superior en sombra con respecto a las plantas en luz. Además, las concentraciones de teobromina son mayores en la sombra y disminuyen en la luz en los periodos de edad media (1) y tardía (2), por el contrario, la concentración de teobromina en el periodo temprano (0) donde la concentración es más alta en luz con respecto a la sombra.

De esta forma, las concentraciones de metilxantinas (cafeína y teobromina) tiende a aumentar en plantas que se encuentran en sombras. Es más, este comportamiento puede hacer referencia a la teoría del carbono/nutrientes que propone un aumento en compuestos de defensa que contienen nitrógeno (alcaloides, glucósidos cianogénicos, entre otros) como respuesta al estrés del carbono producido por la reducción de luz [9]. De igual manera, puede hacer referencia a la teoría de la defensa que manifiesta que la producción de metilxantinas está ligada a la acción de defensa en contra de animales herbívoros, insectos y microorganismos, a su vez, puede hacer referencia a la teoría alopatía que proclama la producción de metilxantinas como una acción defensiva contra plantas que no produzcan estos compuestos por competencia de espacio, luz y nutrientes [10]. En este sentido, podemos intuir que el aumento de la concentración en sombra puede ser el efecto del estrés generado por la reducción de luz y la competencia por esta con otras especies, sumado al aumento de plagas en estas condiciones obligando a la planta a generar compuesto de defensa para garantizar su supervivencia.

Además, se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los diferentes periodos de edad con respecto a las concentraciones de cafeína (**Tabla 5**) y teobromina (**Tabla 6**), siendo las mayores concentraciones de cafeína en el periodo tardío (2) (**Figura 1**) y ligeramente mayores las concentraciones de teobromina en el periodo temprano las concentraciones de teobromina (**Figura 5**). No obstante, las concentraciones de cafeína del periodo temprano son mayores a las del periodo medio, sin embargo, este comportamiento no es constante en todas las chakras; superando en la chakra de Alto Tena (C) las concentraciones en el periodo medio (**Figura 3**). Por otro lado, la teobromina presenta un comportamiento igual en las chakras de Talag (A) y Alto Pano (B) aumentado conforme la edad, en cambio, en la chakra de Alto Tena las concentraciones en el periodo temprano (0) y tardío (2) son similares y ambas son superiores a las concentraciones del periodo medio (1).

La influencia de la edad en la concentración de metabolitos secundarios en *Ilex guayusa* aún no ha sido demostrado, sin embargo, en otras plantas del género *Ilex* se ha evaluado la edad foliar de la planta [11,12]. No obstante, se ha demostrado por varios autores para diferentes especies la influencia de la edad en el contenido de metabolitos [13–16]. En este sentido, Bowers & Stamp (1993) [13] en su estudio de efectos relativos de la edad de la hoja, la edad de la planta, en genotipo de la planta, y la herbivoría en la química defensiva de *P.lanceolata*, manifiesta que la edad de la planta y de la hoja tiene un mayor impacto en la química defensiva. De igual manera, Höft et al. (1998) [16], en su análisis del contenido de alcaloides foliares de *Tabernaemontana pachysiphonin* influenciado por factores endógenos y ambientales en el hábitat natural, expresa que los alcaloides presentes en las hojas de árboles de entre 1 a 3 años y de 3 a 5 años que crecían bajo las mismas condiciones de luz presentan en general un contenido ligeramente menor de metabolitos. Además, cabe recalcar que se ha descrito las posibles relaciones entre la edad de la planta y la producción de metabolitos de defensa, sin embargo, no existe una conclusión que se aplique a todas las especies vegetales [11].

Igualmente, se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las diferentes chakras estudiadas en las concentraciones de cafeína (**Tabla 5**) y teobromina (**Tabla 6**). No obstante, la variación en las diferentes concentraciones de cafeína (**Figura 1**) no es tan notoria como lo es en las concentraciones de teobromina (**Figura 5**). Además, se visualizó que la chakra causaba un efecto considerable en el comportamiento de las metilxantinas (cafeína y teobromina) con respecto a las condiciones de luz (**Figura 2 y**

6) y los diferentes periodos de edad (**Figura 3 y 7**). En este sentido, el efecto resultante en las diferentes chakras se ve influenciado por innumerables variables entorno al cultivo de guayusa, es más, estas variables incluyen la ubicación geográfica, las precipitaciones, la temperatura, la elevación, la exposición al sol, la composición del suelo y otras muchas más [17]. Adhikari, et al. (2022) [18], en su estudio sobre Influencia de la altitud en los metabolitos secundarios, antioxidantes y actividades antimicrobianas del tejo del Himalaya (*Taxus wallichiana*), describe que la altura en la que se desarrolla la especie influye en la producción de metabolitos, encontrado que a mayor altura las plantas tienen a priorizar la producción de metabolitos secundarios en respuesta al estrés abiótico. De esta manera, las chakras estudiadas están ubicadas a diferentes alturas como se describió en un inicio, es así que, podemos intuir que la chakra de Alto Pano (B) y Alto Tena (C) priorizan la producción de metabolitos secundarios y es por eso que están presentan una mayor concentración de metilxantinas que la chakra de Talag (A) que se encuentra a menor altura (**Figura 1 y 5**). Ahora bien, la densidad vegetal también es diferente en las chakras y la cantidad de especies vegetales con las que compite, como la separación de cada árbol pueden influir en la producción de metabolitos [19]. Es así, que cabe recalcar la teoría alopatía que proclama la producción de metilxantinas como una acción defensiva contra plantas que no produzcan estos compuestos [10], en base a esto podríamos intuir que las menores concentraciones (**Figura 1 y 5**) también se encuentran en la chakra de Talag (A), ya que en su parcela interactúa únicamente con otros ejemplares de *Ilex guayusa* a diferencia de las otras chakras estudiadas que interactúan con otras especies.

Caracterización de metabolitos en muestras de *Ilex guayusa*

Se identificaron un total de 9 metabolitos por UPLC-MS/MS. En este sentido, se identificó al ácido p-hidroxifenilpirúvico el cual ha sido reportado en varias especies de plantas [20–24], sin embargo, no se tiene reporte en el género *Ilex* aunque se sabe que este compuesto se encuentra en los cloroplastos de muchas especies de plantas y es un precursor importante en la biosíntesis de tocoferoles [25]. Es así, los tocoferoles ya se han identificado en *Ilex guayusa* [26], por añadidura, el ácido p-hidroxifenilpirúvico y los tocoferoles funcionan como respuesta de las plantas al estrés ocasionado por luz de alta intensidad [25,27]. Por otro lado, el ácido cresotínico ha sido reportado en algunas especies de plantas [28–30] pero no se ha reportado en plantas del género *Ilex*, sin embargo, forma parte de los ácidos salicílicos que ya han sido reportados en varias especies de plantas en las que se usan sus hojas en infusiones o tés incluyendo *Ilex*

guayusa, es más, estos compuestos son considerados reguladores de expresión de genes de compuestos que son controlados por la intensidad de luz como por ejemplo la teanina [31]. Así mismo, el ácido cafeico es uno de los más identificados en *Ilex guayusa* y que está ligado a la actividad antioxidante y antiinflamatoria encontrada en *guayusa* [26,32–34].

Análogamente, se identificó alismol que es un sesquiterpeno que conjunto a otros terpenos los cuales ya se han identificado en *Ilex guayusa* [26], es más, los sesquiterpenos y otros compuestos de las plantas medicinales ecuatorianas han atraído un gran interés por su gran potencial en productos para diferentes propósitos y aplicaciones [35]. La N-fenil-1-naftalenamina no ha sido reportada en plantas del género *Ilex* pero ha sido reportada en otras especies de plantas [36–38], incluso, se conoce de la actividad antioxidante de esta molécula por simulaciones moleculares [39]. Además, se identificó atropina que es un compuesto ya identificado en plantas del género *Ilex* [40,41] incluso se ha detectado en muestras de *Ilex paraguariensis*, no obstante, se cree que este compuesto no es propio de esta planta sino que esta ha sido transferida por el suelo a la planta [42], ya que la atropina es más comúnmente encontrada en plantas de la familia de las *Solanaceae* [43].

Por otra parte, se identificó cafeína y teobromina que son algunos de los compuestos que más se han encontrado en *Ilex guayusa* [7,8,33,34,44–48], de hecho, estos compuestos son los que han generado un gran atractivo hacia esta planta ya que su alto contenido de cafeína puede favorecer a la generación de nuevos productos [4,49]. De igual manera, se identificó *in silico* Metil-liberina y Teacrina en un mismo Cromatograma de corriente iónica total (TIC), ya que ambos comparten el mismo peso molecular, sin embargo, Negrin et al., (2019) [7], en su estudio realizado en plantas de la especie *Ilex* no logró cuantificar Teacrina en muestras de *Ilex guayusa*. Es así que podemos intuir que la identificación corresponde a la Metil-liberina. Específicamente, la Metil-liberina y Teacrina son ácidos metil úricos y estos están ligados a la biosíntesis y catabolismo de las metilxantinas [10,50].

Agregado a lo anterior, se encontró que las moléculas de alismol, N-fenil-1-naftalenamina, atropina, ácido cresotínico tienden a tener una abundancia relativa similar en todas las muestras, sin embargo, el ácido p-hidroxifenilpirúvico tiene una abundancia relativa mayor en las muestras de los períodos temprano (0) y medio (1). Por otra parte, las moléculas como el ácido cafeico, cafeína, teobromina y metil-liberina tienen a tener una mayor abundancia relativa en las muestras de plantas que crecen en

sombra (-) y que se encuentran en el periodo tardío (2). De igual forma, la chakra de Alto Pano (B) presenta una mayor abundancia relativa en general de los compuestos identificados, así como las mayores concentraciones de metilxantinas cuantificadas.

Por último, la teofilina fue detectada y cuantificada por HPLC UV-vis en las muestras de Alto Pano (B) y en algunas muestras de las otras chakras, sin embargo, en la combinación de las muestras para la identificación por UPLC-MS/MS no fue detectada. En este sentido, la concentración del metabolito afectó la identificación por LC-MS ya que el equipo tiene una interfaz de Ionización por electropulverización (ESI por sus siglas en inglés), este tiene la característica de comportarse como un dispositivo concentración-dependiente, pues la respuesta es directamente proporcional a la concentración del metabolito que entra en la fuente [51]. De esta manera, la plataforma LC-ESI tiende a favorecer la detección de metabolitos que se encuentran en concentraciones relativamente altas [52], por esta razón, al combinar las muestras se redujo la concentración de teofilina y no logró ser detectada.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se cuantificó cafeína y teobromina en todas las muestras estudiadas, siendo la cafeína la metilxantina que se encuentra en mayor abundancia en las hojas de *Ilex guayusa*, sin embargo, no se logró cuantificar teofilina en todas las muestras estudiadas. Por otra parte, los resultados del análisis de varianza (ANOVA) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las condiciones de luz, edad y ubicación en las concentraciones de cafeína y teobromina. Teniendo una mayor concentración las plantas que se encontraban en sombra y las plantas que tenían una mayor edad, además de mostrar un aumento o disminución según la ubicación, es decir a mayor altitud (chakra Alto Pano) mostraba un aumento significativo en la producción de metilxantinas.

Los gráficos de efectos principales mostraron una estrecha relación entre las variables afectando a la producción de metilxantinas, mostrando así que la producción de metabolitos se ve afectada en mayor medida por la acción en conjunto de las variables que el efecto individual de cada una de ellas ya que en los gráficos de efectos principales existen interacciones entre los factores demostrando que no son independientes el uno del otro. Además, se identificaron un total de 9 metabolitos por UPLC-MS/MS, entre estos se identificaron 2 metilxantinas ya conocidas y cuantificadas (cafeína y teobromina), sin embargo, mediante identificación *in silico* se identificó metil-liberina que es un ácido metil úrico, compuestos que guardan una estrecha relación con la biosíntesis y catabolismo de las metilxantinas.

En conclusión, se determinó que las condiciones de luz, edad y ubicación alteran la producción de metilxantinas en las hojas de *Ilex guayusa*. De esta manera, las condiciones de sombra, una mayor edad de la planta y una correcta ubicación e interacción con otras especies promueve la producción de estos metabolitos. En este sentido, comprender como afectan los factores ambientales a la producción de metabolitos no solo mejora la comprensión en torno a la guayusa, sino también, garantizan una mayor cantidad de estos compuestos dando así un valor agregado a estos productos ayudando así a la conservación de estos sistemas agroforestales indígenas amigables con el medio ambiente.

Recomendaciones

Al momento de la identificación, el contenido alto de cafeína dificultó la identificación de otros metabolitos que se encuentran en menor concentración, no obstante, al querer realizar una identificación de metilxantinas y compuestos afines no es posible realizar una extracción de cafeína o disminuir la concentración en las muestras por el riesgo de extraer compuestos afines a esta o disminuir a su vez la concentración de los mismos. Teniendo en cuenta esto, se recomienda que en un trabajo de identificación de metabolitos en guayusa no centrado en metilxantinas se emplee una metodología que disminuya el contenido de cafeína o que a su vez aumente o favorezca la concentración de otros compuestos de interés.

REFERENCIAS

1. Arias, J. H; Balcazar, A; Hurtado R. Sistemas de producción en Colombia. 2007. Available: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/720>
2. Riachi LG, Simas DLR, Coelho GC, Marcellini PS, Ribeiro da Silva AJ, Bastos de Maria CA. Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in maté extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Food Chem. 2018;266: 317–322. doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.028
3. Radice M, Vidari G. Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. La Granja. 2007;6: 3. doi:10.17163/lgr.n6.2007.01
4. Wise G, E. Santander D. Comparative Composition Analysis of the Dried Leaves of *Ilex guayusa* (Loes.). J Food Nutr Res. 2018;6: 638–644. doi:10.12691/jfnr-6-10-4
5. Wise G, E. Santander D. Assessing the History of Safe Use of Guayusa. J Food Nutr Res. 2018;6: 471–475. doi:10.12691/jfnr-6-7-8
6. Lewis WH, Kennelly EJ, Bass GN, Wedner HJ, Elvin-Lewis MP, W. DF. Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians. J Ethnopharmacol. 1991;33: 25–30. doi:10.1016/0378-8741(91)90156-8
7. Negrin A, Long C, Motley TJ, Kennelly EJ. LC-MS Metabolomics and Chemotaxonomy of Caffeine-Containing Holly (*Ilex*) Species and Related Taxa in the Aquifoliaceae. J Agric Food Chem. 2019;67: 5687–5699. doi:10.1021/acs.jafc.8b07168
8. Radice M, Scalvenzi L, Sablón Cossio N. *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. sciforum.net. 2017. p. 3868. doi:10.3390/mol2net-02-03868
9. Coelho GC, Rachwal MFG, Dedeczek RA, Curcio GR, Nietzsche K, Schenkel EP. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Biochem Syst Ecol. 2007;35: 75–80. doi:10.1016/j.bse.2006.09.001
10. Ashihara H, Mizuno K, Yokota T, Crozier A. Xanthine Alkaloids: Occurrence,

Biosynthesis, and Function in Plants. Progress in the chemistry of organic natural products. Springer, Cham; 2017. pp. 1–88. doi:10.1007/978-3-319-49712-9_1

11. Blum-Silva CH, Chaves VC, Schenkel EP, Coelho GC, Reginatto FH. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. *Rev Bras Farmacogn*. 2015;25: 1–6. doi:10.1016/j.bjp.2015.01.002
12. Dartora N, De Souza LM, Santana-Filho AP, Iacomini M, Valduga AT, Gorin PAJ, et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. *Food Chem*. 2011;129: 1453–1461. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.112
13. Bowers MD, Stamp NE. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. *Ecology*. 1993;74: 1778–1791. doi:10.2307/1939936
14. Doan AT, Ervin G, Felton G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: Seasonal and ontogenetic gradients. *Biochem Syst Ecol*. 2004;32: 117–126. doi:10.1016/S0305-1978(03)00142-X
15. Hendriks H, Anderson-Wildeboer Y, Engels G, Bos R, Woerdenbag HJ. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Med*. 1997;63: 356–359. doi:10.1055/s-2006-957700
16. Höft M, Verpoorte R, Beck E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. *Planta Med*. 1998;64: 148–152. doi:10.1055/s-2006-957393
17. Heck CI, Schmalko M, De Mejia EG. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem*. 2008;56: 8394–8403. doi:10.1021/jf801748s
18. Adhikari P, Joshi K, Singh M, Pandey A. Influence of altitude on secondary metabolites, antioxidants, and antimicrobial activities of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*). *Plant Biosyst - An Int J Deal with all Asp Plant Biol*. 2022;156: 187–195. doi:10.1080/11263504.2020.1845845
19. Alvarado LF, Gómez RZ, Lozano RB, Del Castillo Torres D. Effect of sowing density on the vegetative development of aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) in forest

plantations. *Rev Peru Biol.* 2019;26: 227–234. doi:10.15381/rpb.v26i2.16378

20. Valpuesta M, Díaz A, Suau R. Coulteroberbinone, a quaternary isoquinoline alkaloid from *Romneya coulteri*. *Phytochemistry.* 1999;51: 1157–1160. doi:10.1016/S0031-9422(98)00745-6
21. Maier UH, Rödl W, Deus-Neumann B, Zenk MH. Biosynthesis of Erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*. *Phytochemistry.* 1999;52: 373–382. doi:10.1016/S0031-9422(99)00230-7
22. Díaz JG, Ruiz JG, Herz W. Alkaloids from *Delphinium pentagynum*. *Phytochemistry.* 2004;65: 2123–2127. doi:10.1016/j.phytochem.2004.03.017
23. Chen JH, Du ZZ, Shen YM, Yang YP. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Arch Pharm Res.* 2009;32: 3–5. doi:10.1007/s12272-009-1111-7
24. Martin F, Grkovic T, Sykes ML, Shelper T, Avery VM, Camp D, et al. Alkaloids from the Chinese vine *Gnetum montanum*. *J Nat Prod.* 2011;74: 2425–2430. doi:10.1021/np200700f
25. Chen Y, Zhou B, Li J, Tang H, Tang J, Yang Z. Formation and change of chloroplast-located plant metabolites in response to light conditions. *International Journal of Molecular Sciences.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018. p. 654. doi:10.3390/ijms19030654
26. Chóez-Guaranda I, Viteri-Espinoza R, Barragán-Lucas A, Quijano-Avilés M, Manzano P. Effect of solvent-solvent partition on antioxidant activity and GC-MS profile of *Ilex guayusa* Loes. leaves extract and fractions. *Nat Prod Res.* 2022;36: 1570–1574. doi:10.1080/14786419.2021.1882455
27. Lushchak VI, Semchuk NM. Tocopherol biosynthesis: Chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiologiae Plantarum.* Springer; 2012. pp. 1607–1628. doi:10.1007/s11738-012-0988-9
28. Ali Z, Ahmad VU, Zahid M, Tareen RB. Benzoic acid derivatives from *Stocksia brahuica*. *Phytochemistry.* 1998;48: 1271–1273. doi:10.1016/S0031-9422(98)00124-1

29. Adesina SK. Further Novel Constituents of *Zanthoxylum Zanthoxyloides* Root and Pericarp. *J Nat Prod*. 1986;49: 715–716. doi:10.1021/np50046a035
30. Adesina SK, Akinwusi DD. New constituents of *Zanthoxylum tessmannii*(Engl.) Ayafor root. *J High Resolut Chromatogr*. 1986;9: 412–414. doi:10.1002/jhrc.1240090712
31. Ashihara H. Occurrence, biosynthesis and metabolism of theanine (γ -glutamyl-L-ethylamide) in plants: A comprehensive review. *Nat Prod Commun*. 2015;10: 803–810. doi:10.1177/1934578x1501000525
32. García-Ruiz A, Baenas N, Benítez-González AM, Stinco CM, Meléndez-Martínez AJ, Moreno DA, et al. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric*. 2017;97: 3929–3936. doi:10.1002/jsfa.8255
33. Gan RY, Zhang D, Wang M, Corke H. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018. p. 1682. doi:10.3390/nu10111682
34. Pardau MD, Pereira ASP, Apostolides Z, Serem JC, Bester MJ. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food Funct*. 2017;8: 4601–4610. doi:10.1039/C7FO01067B
35. Armijos C, Ramírez J, Salinas M, Vidari G, Suárez AI. Pharmacology and phytochemistry of ecuadorian medicinal plants: An update and perspectives. *Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021. p. 1145. doi:10.3390/ph14111145
36. Khuzhaev VU, Zhalolov IZ, Levkovich MG, Aripova SF, Shashkov AS. Alkaloids of *Arundo donax* L. 15. A new dimeric indole alkaloid arundarine from the roots of *Arundo donax* L. *Russ Chem Bull*. 2004;53: 1765–1767. doi:10.1007/s11172-005-0033-x
37. Song Y, Wu HY, Yang XH. Extraction and analysis of the chemical constituents of volatile oil from *Albizia* bark. *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications Ltd; 2013. pp. 596–600. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.781-

38. Tao H, ZunXi H, JunJun L, XiangHua T, YueLin M, Bo X. Extraction and analysis on the aromatic components of Pu-erh ripe tea and raw tea. *J Tea Sci.* 2010;30: 336–342.
39. Kong L, Dong K, Li G, Yang C, Lai S, Qu Y. Molecular simulation study on the protective mechanism of three kinds of HTPB propellant antioxidants. *FirePhysChem.* 2022;2: 4–13. doi:10.1016/j.fpc.2022.03.003
40. Peñuelas J, Filella I, Lloret F, Piñol J, Siscart D. Effects of a severe drought on water and nitrogen use by *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Biol Plant.* 2000;43: 47–53. doi:10.1023/A:1026546828466
41. Yang ML, Pang PKT. The vascular effects of *Ilex pubescens*. *Planta Med.* 1986;NO. 4: 262–265. doi:10.1055/s-2007-969147
42. González-Gómez L, Morante-Zarcero S, Pereira JAM, Câmara JS, Sierra I. Evaluation of Tropane Alkaloids in Teas and Herbal Infusions: Effect of Brewing Time and Temperature on Atropine and Scopolamine Content. *Toxins (Basel).* 2023;15: 362. doi:10.3390/toxins15060362
43. Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon LP, Poland RE, et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *J Ethnopharmacol.* 1999;65: 243–256. doi:10.1016/S0378-8741(98)00168-8
44. Cadena-Carrera S, Tramontin DP, Bella Cruz A, Bella Cruz RC, Müller JM, Hense H. Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *J Supercrit Fluids.* 2019;152: 104543. doi:10.1016/j.supflu.2019.104543
45. Intriago BAL, Oleas ACM, Yáñez DSM, Carvajal DJC, Proaño M de LT. Optical aptasensor for in situ detection and quantification of methylxanthines in *Ilex guayusa*. *ACI Av en Ciencias e Ing.* 2022;14. doi:10.18272/ACI.V14I1.2301
46. Kapp RW, Mendes O, Roy S, McQuate RS, Kraska R. General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *Int J Toxicol.* 2016;35: 222–242. doi:10.1177/1091581815625594

47. Paladines-Santacruz G, Orellana-Manzano A, Sarmiento G, Piloza G, Iñiga E, Zaruma-Torres F, et al. Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk. *Toxicol Reports*. 2021;8: 747–752. doi:10.1016/j.toxrep.2021.03.026
48. Sequeda-Castañeda LG, Modesti Costa G, Celis C, Gamboa F, Gutiérrez S, Luengas P. *Ilex guayusa* loes (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. *Pharmacologyonline*. 2016;3: 193–202. Available: <https://www.researchgate.net/publication/311981728>
49. Wise G, Negrin A. A critical review of the composition and history of safe use of *guayusa*: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2020. pp. 2393–2404. doi:10.1080/10408398.2019.1643286
50. Ashihara H, Kato M, Crozier A. Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2011. pp. 11–31. doi:10.1007/978-3-642-13443-2_2
51. Quintela O, Cruz A, Concheiro M, De Castro A, López-Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología*. 2005. pp. 7–14. Available: <https://www.redalyc.org/pdf/919/91922102.pdf>
52. Chetwynd AJ, David A. A review of nanoscale LC-ESI for metabolomics and its potential to enhance the metabolome coverage. *Talanta*. 2018;182: 380–390. doi:10.1016/J.TALANTA.2018.01.084

ANEXOS

Anexo 1. 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



Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Anexo 2. Imagen satelital de la chakra de Alto Pano con coordenadas 1°00'08"S 77°53'36"W perteneciente a la agricultora Ibeth Andy



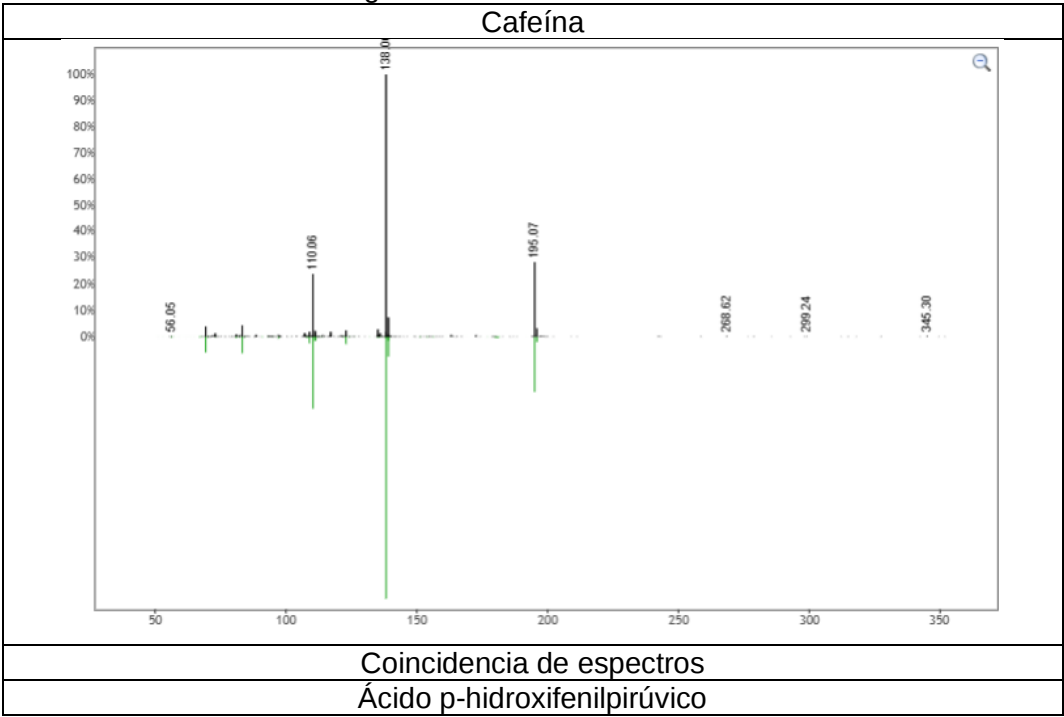
Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

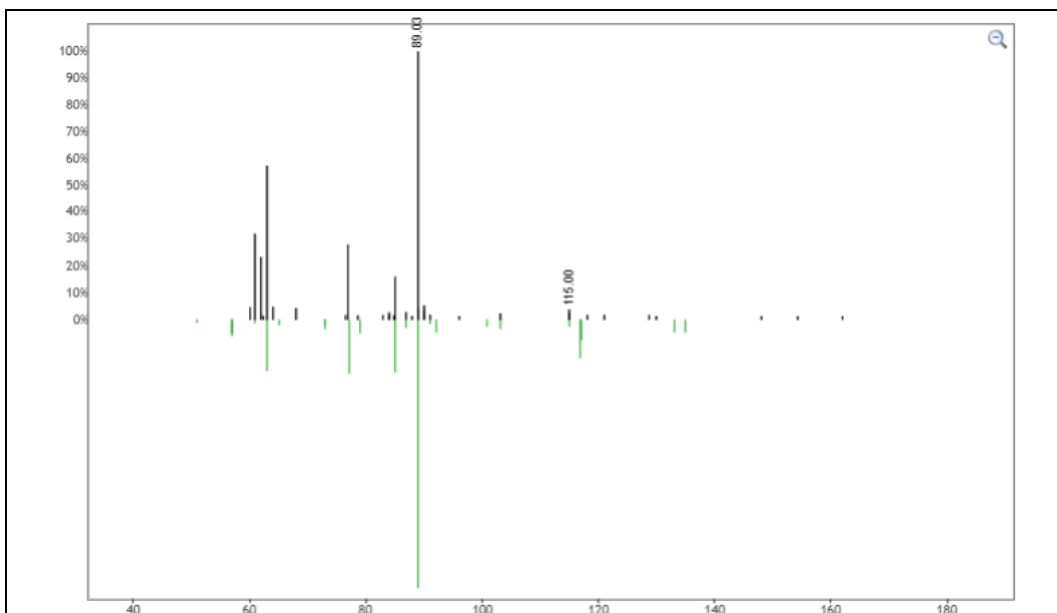
Anexo 3. Imagen satelital de la chakra de Alto Tena con coordenadas 0°56'21.4"S 77°52'31.1"W perteneciente a la agricultora Carola Grefa



Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

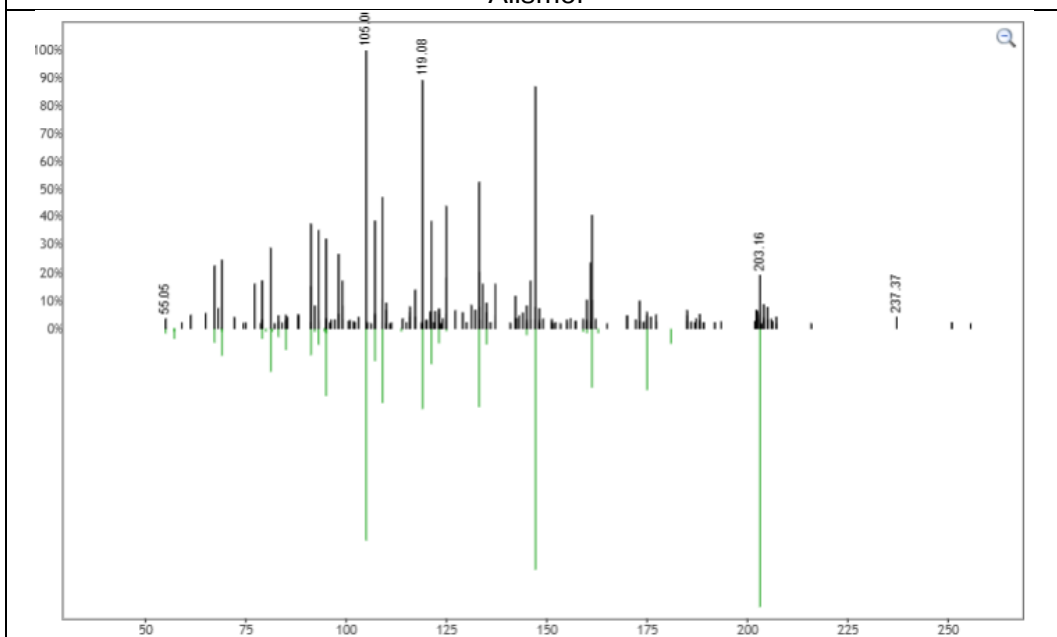
Anexo 4. Identificación de nivel 2 mediante la Global Natural Products Social Molecular Networking.





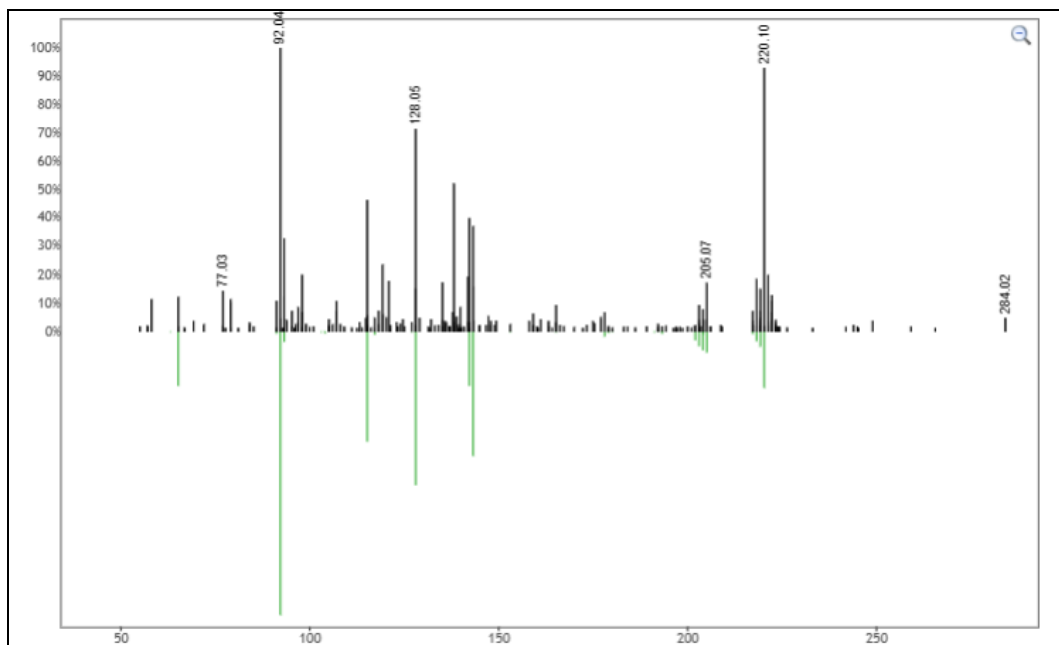
Coincidencia de espectros

Alismol



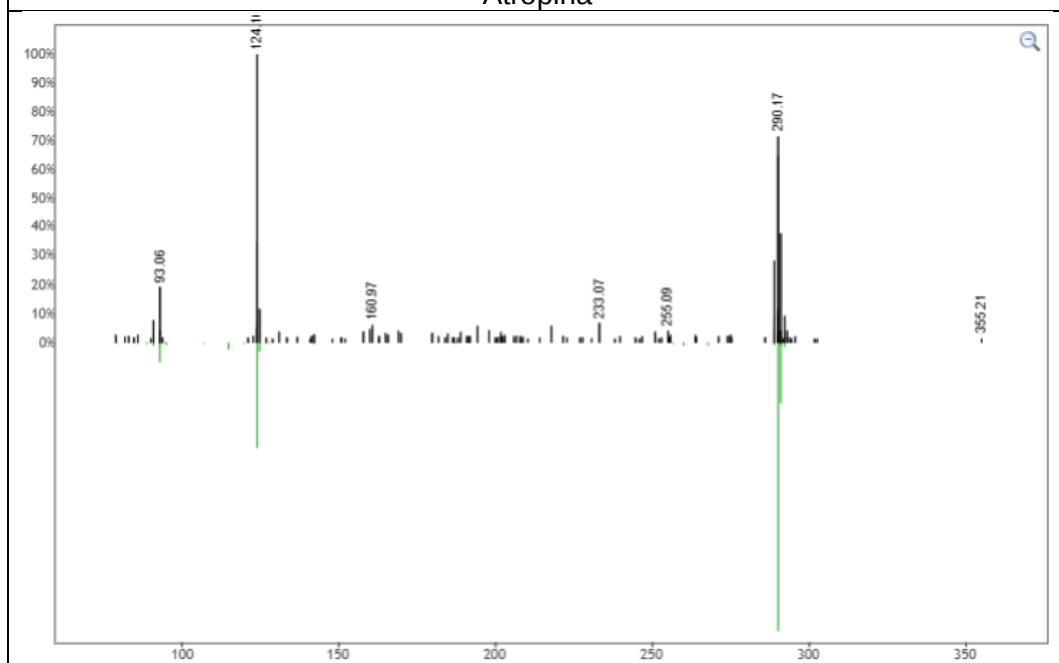
Coincidencia de espectros

N-fenil-1-naftalenamina



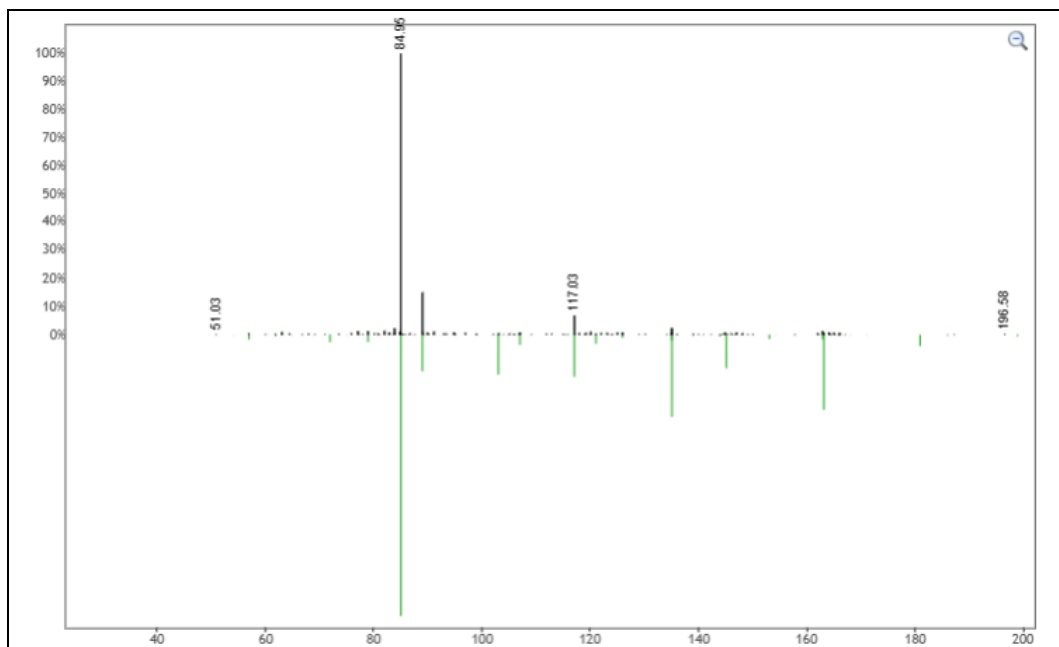
Coincidencia de espectros

Atropina



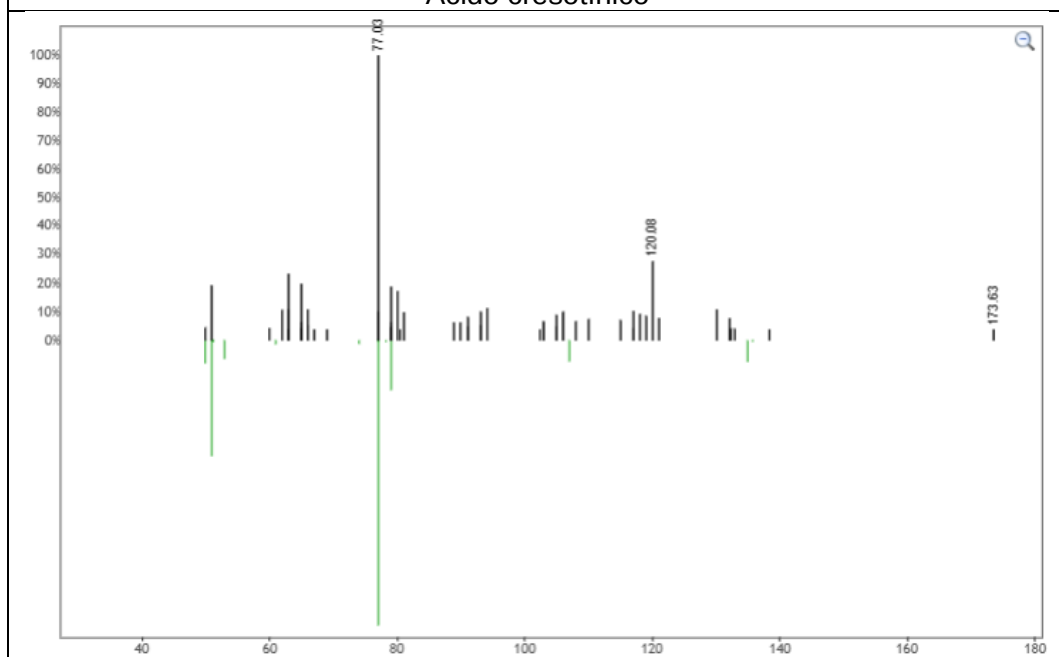
Coincidencia de espectros

Ácido cafeico



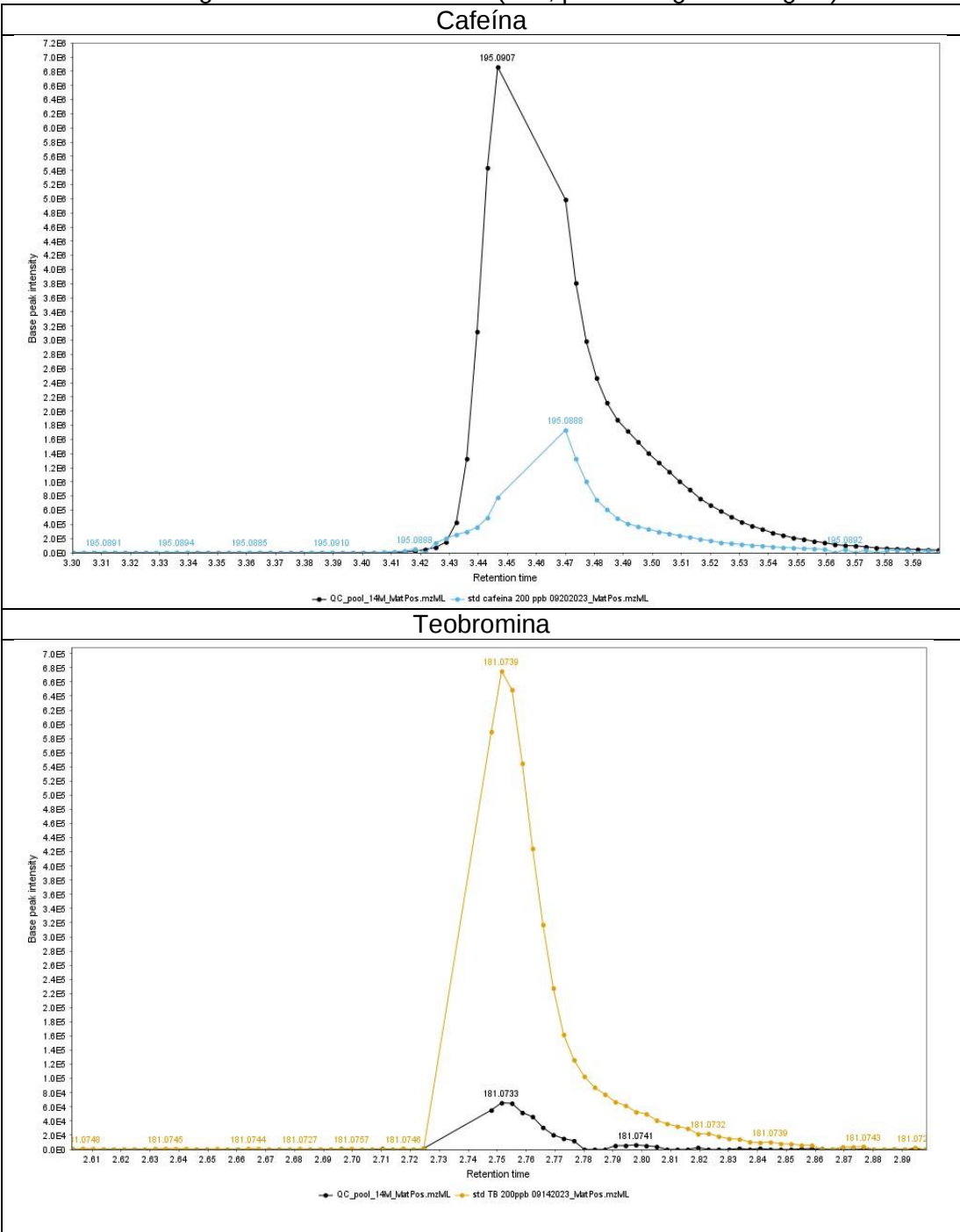
Coincidencia de espectros

Ácido cresotínico

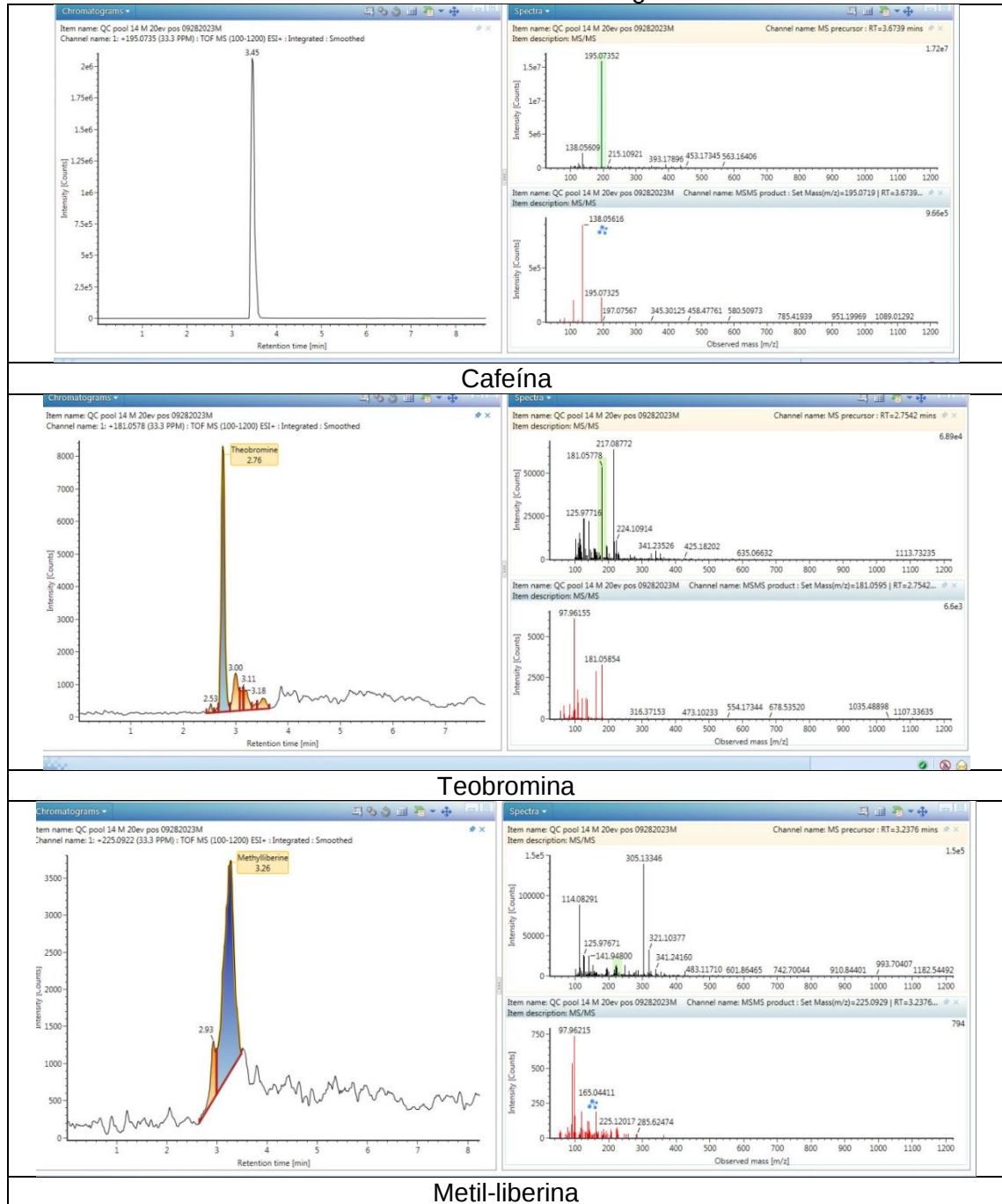


Coincidencia de espectros

Anexo 5. Identificación de nivel 1 mediante estándares de cafeína y teobromina en el Cromatograma de iones extraídos (EIC, por sus siglas en inglés)



Anexo 6. Identificación mediante la herramienta de fragmentación *in silico* UNIFI



Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

Anexo 7. Valores de los supuestos del análisis de la varianza (ANOVA)

	Shapiro–Wilk test	Levene test	Durbin-Watson Test
Cafeína	0.854	0.8618	2.8183
Teobromina	0.766	0.379	2.4576
Teofilina	0.172	0.8843	2.7472

Realizado por: Fernández, Mateo; 2024

