



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS EN
HOJAS DE *ILEX GUAYUSA* EN DIFERENTES ESTADOS DE
MADUREZ Y EXPOSICIÓN DE LUZ SOLAR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: THOMÁS MATHEO GARZÓN MORENO

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, 01 de Marzo de 2024

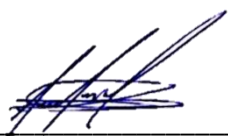
De mi consideración:

Yo, THOMAS MATHEO GARZÓN MORENO con documento de identidad 1723473854, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título ingeniero 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 el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

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

Atentamente,



Thomás Matheo Garzón Moreno

CI: 1723473854

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Yo, Tomás Matheo Garzón Moreno, con documento de identidad N° 1723473854, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **Determinación de ácidos clorogénicos en hojas de *Ilex guayusa* en diferentes estados de madurez y exposición de luz solar**, 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, 01 de Marzo de 2024



Tomás Matheo Garzón Moreno
CI: 1723473854

Unidad de Titulación

Carrera Ingeniería en Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Certifico que el trabajo de titulación: “Determinación de ácidos clorogénicos en hojas de Ilex guayusa en diferentes estados de madurez y exposición de luz solar” en la modalidad de: Tesis, fue realizado por Thomas Matheo Garzon Moreno, bajo mi dirección.

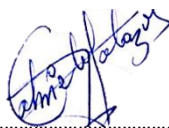
El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 01 de Marzo de 2024



PhD. ZULAY MARINA NIÑO RUIZ

C.I: 1157560303



PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON

C.I: 1757494453

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mis compañeros que me ayudaron a superar etapas difíciles en mi vida universitaria, así como a mis tutores que me guiaron en todo mi desarrollo profesional y a mis padres y hermanos los cuales son la parte más importante de mi vida.

AGRADECIMIENTO

El más sincero agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por darme la oportunidad de obtener una profesión y ser una ayuda para la sociedad. A mi familia por su apoyo y comprensión en cada decisión que tome. A las personas de las chakras que nos dieron la oportunidad de desarrollar la tesis con productos de sus cosechas. A la organización GIZ y Aditmaq por financiar el proyecto y hacer posible esta investigación.

Índice General

Caratula	
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
Índice General	vii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
Antecedentes	1
Planteamiento del problema	7
Justificación de la investigación	8
Objetivos de la investigación	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos.....	10
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	11
Diseño experimental	11
Recolección de las muestras	12
Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-Uv-vis)	12
Tratamiento de muestras.....	12
Verificación del método analítico para la cuantificación de ácidos clorogénicos por HPLC-Uv-vis	13
Desarrollo del método	14
Linealidad	15
Selectividad	15
Límite de detección	16

Límite de cuantificación	16
Precisión	17
Veracidad	18
Análisis estadístico	18
Modelado estadístico.....	19
Verificación de supuestos	19
Pruebas de hipótesis	19
Perfil metabolómico de los CGA	19
Preparación de muestras	20
Tratamiento de Datos y Análisis de Redes Moleculares	21
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	22
Verificación del método.....	22
Linealidad	22
Selectividad	23
Límite de detección	24
Límite de cuantificación	25
Precisión	26
Veracidad	29
Cuantificación de ácido clorogénico 5-CQA	31
Perfil metabolómico de ácidos clorogénicos en extractos de <i>I. guayusa</i>	39
Redes moleculares	42
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	43
Verificación.....	43
Linealidad	43
Selectividad	43
Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).....	44
Precisión	44
Veracidad	45
Análisis de cuantificación del ácido clorogénico (5-CQA) por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC-Uv-vis	45
Cuantificación de CGA.....	45
Supuestos de estadística y métodos de arreglo de datos.....	46
Resultados de incidencia de factores finales	47
Análisis del perfil de ácidos clorogénicos por UPLC-MS/MS.....	49
Identificación de Ácidos clorogénicos.....	49

Redes moleculares	52
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
Conclusiones	54
Recomendaciones	55
REFERENCIAS	
ANEXOS	

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño experimental.....	12
Tabla 2. Gradiente de trabajo a ser usado en HPLC-Uv/vis, solvente A (ácido fórmico al 0.1%) y B (acetonitrilo grado HPLC más ácido fórmico 0.1%)	14
Tabla 3. Objetivos de verificación de métodos.....	14
Tabla 4. Resultados linealidad	22
Tabla 5. Límite de detección	24
Tabla 6. Límite de cuantificación	25
Tabla 7. Resultados Precisión	26
Tabla 8. Resultados Veracidad	30
Tabla 9. Resultados Finales	31
Tabla 10. Concentración (ppm) promedio de 5-CQA en muestra de <i>Ilex guayusa</i> ...	32
Tabla 11. Supuestos del método ajustados	36
Tabla 12. Correlación entre los valores del CGA.....	38
Tabla 13. ANOVA.....	38
Tabla 14. Identificación de metabolitos	40
Tabla 15. Clasificación de compuestos identificados.....	41

Índice de figuras

Imagen 1 Elaboración referencial de Pool para QC	20
Figura 1. Blanco reactivo, eje x tiempo de retención, eje y intensidad del pico	23
Figura 2. Blanco matriz <i>Chamaemelum nobile</i> (manzanilla), eje x tiempo de retención, eje y intensidad del pico.....	23
Figura 3. Blanco matriz <i>Coriandrum sativum</i> (Cilantro), eje x tiempo de retención, eje y intensidad del pico.....	24
Figura 4. Carta control LOD-LOQ, eje x concentración, eje y respuesta de las muestras	25
Figura 5. Carta control precisión valores altos	27
Figura 6. Carta control precisión valores medios	28
Figura 7. Carta control precisión valores bajos.....	29
Figura 8. Carta control veracidad	30
Figura 9. Gráfico Q-Q.....	32
Figura 10. Histograma, distribución de datos.....	33
Figura 11. Gráfico Residuos vs Valores ajustados.....	34
Figura 12. Supuestos del modelo ajustado.....	37
Figura 13. Red molecular.....	42
Figura 14. Talag imagen geográfica	48
Figura 15. Alto Pano imagen geográfica	48
Figura 16. Alto Tena imagen geográfica	48
Figura 17. Cromatograma tiempo de retención vs intensidad, de muestra a 40 ev (Color amarillo), 20 ev (Color verde), iones producto del Ácido Clorogénico	50
Figura 18. Cromatograma tiempo de retención vs intensidad, de muestra a 40 ev (Color amarillo), 20 ev (Color verde), iones producto del Ácido Neoclorogénico	50

Índice de anexos

Tabla 1. Redes moléculas

Tabla 2. Resultados de Dereplicator+, MS2LDA

Tabla 3. Resultados concentración de CGA en muestras de *I. guayusa*

Tabla 4. Porcentaje de recuperación datos crudos

Tabla 5. LOD y LOQ

Tabla 6. Datos precisión

Tabla 7. Cromatogramas-HPLC

Tabla 8. Curvas de calibración

Figura 1. Imagen Del ambiente R studio

Figura 2. Imagen de datos para la selección de rangos de luz

Tabla 9. Identificación de metabolitos 40 ev

Tabla 10. Identificación de metabolitos 20 ev

Tabla 11. Identificación de metabolitos 10 ev

Resumen

La *Ilex guayusa*, una planta amazónica conocida por sus propiedades medicinales y energéticas, es principalmente comercializada como bebida energizante, aunque posee otros beneficios subaprovechados. Sus componentes incluyen a los ácidos clorogénicos, que contribuyen a regular el metabolismo, reducir riesgos de enfermedades cardiovasculares y poseer capacidad antimicrobiana. Este estudio se enfoca en determinar las condiciones óptimas de cosecha para maximizar la concentración de ácidos clorogénicos en la hoja de *Ilex guayusa*, a través de la medición de su concentración y la identificación de distintos tipos de estos ácidos clorogénicos mediante un método analítico preciso que fue verificado, beneficiando a la industria y consumidores. La investigación examina la conexión que tienen los ácidos clorogénicos y las variables como: Edad de la planta, luz solar y ubicación. Se recolectaron muestras de tres chakras en La ciudad de Tena, provincia de Napo, en Ecuador, aplicando un diseño experimental factorial con niveles mixtos para evaluar influencias de los factores seleccionados, identificando los diferentes ácidos clorogénicos mediante LC/MS. Se observó que las hojas jóvenes en condiciones de sombra presentan una concentración ligeramente mayor 12.5 mg/L en relación a lo recopilado en la literatura 8 mg/L. Como resultado, la identificación específica de los ácidos revela que una menor exposición a la luz solar en etapas tempranas de crecimiento podría incrementar la producción de estos compuestos en la *Ilex guayusa*.

Palabras clave: *I. guayusa*, verificación de método, HPLC, LC/MS, planta ancestral amazónica

Abstract

Ilex guayusa, an Amazonian plant known for its medicinal and energy properties, is mainly marketed as an energy drink, although it has other underutilized benefits. Its components include chlorogenic acids, which help regulate metabolism, reduce risks of cardiovascular diseases and have antimicrobial capacity. This study focuses on determining the optimal harvest conditions to maximize the concentration of chlorogenic acids in the *Ilex guayusa* leaf, through the measurement of its concentration and the identification of different types of these chlorogenic acids through a precise analytical method that was verified, benefiting the industry and consumers. The research examines the connection between chlorogenic acids and variables such as: Plant age, sunlight and location. Samples were collected from three chakras in the city of Tena, province of Napo, in Ecuador, applying a factorial experimental design with mixed levels to evaluate influences of the selected factors, identifying the different chlorogenic acids using LC/MS. It was observed that young leaves in shaded conditions have a higher concentration of these acids. As a result, the specific identification of acids reveals that less exposure to sunlight in early stages of growth could increase the production of these compounds in *Ilex guayusa*.

Key words: *I. guayusa*, method verification, HPLC, LC/MS, Amazonian ancestral plan

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Antecedentes

La *Ilex guayusa* (Loes) o guayusa como es su nombre vernáculo [1] es una planta que se encuentra en la selva Amazónica de Colombia, Perú y Ecuador, siendo en Ecuador, específicamente en la provincia del Napo donde se encuentra en mayor cantidad [2]. La *Ilex guayusa* es consumida en forma de infusión por los ecuatorianos, y dada su ubicación geográfica es más popular en el oriente ecuatoriano que en otras regiones del país.

Se reconoce por ser un árbol tropical perenne que crece hasta 30 metros, casi exclusivamente como una planta cultivada, sus hojas son ovaladas, elípticas, oblongas o lanceoladas de 7-22 cm de largo y 2.5-7 cm de ancho, tienen un margen aserrado o dentado [2]. Según Wise & Negrin, 2020 [3]; No existen subespecies; cultivadas o diferentes variedades botánicas reconocidas de guayusa.

Ilex guayusa es una planta nativa de la Amazonía que pertenece a la misma familia que la hierba mate (*Ilex paraguariensis*) [2]. Ambas plantas tienen propiedades estimulantes y antioxidantes debido a su contenido de cafeína y polifenoles [4]. Sin embargo, la guayusa tiene un sabor más suave y dulce que la hierba mate, y se consume principalmente en forma de infusión [1]. Además, la guayusa también tiene un valor cultural y espiritual para los pueblos indígenas que la cultivan y la usan como parte de sus rituales.

Los aborígenes en sus leyendas y mitos cuentan que la guayusa antes de transformarse en árbol era un espíritu robusto y animoso símbolo de fuerza física y fertilidad. Se cree que ya se comercializaba desde el tiempo de los Incas, pero solo se tiene registro de que los primeros comerciantes fueron los jesuitas, quienes la llevaban desde la Amazonía hasta Quito y la vendían como hierba medicinal [5]. Después de los conflictos entre los

quijos y españoles, la Amazonía fue parcialmente olvidada y la guayusa solo se utilizó en la zona [3].

Sus hojas se usan para preparar una infusión con múltiples beneficios para la salud, entre los cuales se destacan la estimulación del sistema nervioso central por su contenido de cafeína y teobromina [6]. También tiene propiedades antioxidantes por su riqueza en compuestos fenólicos y ácidos clorogénicos, que protegen las células del estrés oxidativo y previenen el envejecimiento prematuro [7,8]. Además, ayuda a regular el metabolismo y a prevenir enfermedades cardiovasculares y adicionalmente la guayusa también favorece la salud digestiva, ya que posee un efecto adelgazante por su capacidad de estimular la quema de grasas [1].

Antes de ser comercializada, la guayusa se necesitó un estudio de toxicidad para conocer los riesgos de consumo. Según Wise & Santander (2018) [2], en un análisis al historial de usos de la guayusa, reportó 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 lo reportado por Kapp Jr, R. et al, (2016) [1] quien experimentó en ratas, concluyendo que no hay evidencia de ningún tipo general o genético de toxicidad en guayusa.

En la actualidad, la guayusa se ha convertido en un producto de exportación que genera ingresos y desarrollo para miles de familias campesinas que la cultivan de forma orgánica y sostenible [3]. Según el Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca [9], Ecuador es el principal proveedor mundial de guayusa, con una producción anual de más de 72 toneladas que se comercializan en 25 países. La guayusa se puede encontrar en diferentes presentaciones, como hoja seca, té en bolsitas, bebidas energéticas, cápsulas y polvo. Algunas de las ventajas competitivas de la guayusa son su alto contenido de cafeína natural, así como su equilibrio con otros compuestos como las metilxantinas y los ácidos clorogénicos [3].

Por lo general la *Ilex guayusa* es un producto agrícola de sistemas agroforestales ancestrales, estos sistemas agrícolas tradicionales de bajo rendimiento suelen ser utilizados por colectivos agrícolas indígenas de la región occidental del Amazonas [10]. Como característica especial no se utilizan fertilizantes y pesticidas, la manera en la que es cultivado en Ecuador es utilizando prácticas orgánicas certificadas por USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). La guayusa se cultiva típicamente junto con otras especies comerciales útiles, pero el monocultivo se utiliza cada vez más [2].

Las chakras son sistemas agroforestales que combinan el cultivo de plantas con la conservación del bosque y la biodiversidad. Estos sistemas se han vuelto cada vez más populares en los últimos años debido a su capacidad para proporcionar una fuente sostenible de alimentos y recursos naturales, al mismo tiempo que protegen el medio ambiente [11]. Los kichwa de la Amazonía ecuatoriana han practicado la forma de cultivo en chakra por generaciones, basándose en su conocimiento ancestral, la chakra permite alojar grandes cantidades de variables aprovechables para el estudio de campo y concentraciones de metabolitos entre estos la guayusa, una planta con propiedades estimulantes y antioxidantes [12].

En la actualidad se conoce que la guayusa además de tener algunos compuestos como la cafeína y la teobromina los cuales son mayoritarios, también contiene ácidos clorogénicos, los cuales pertenecen a un grupo de compuestos fenólicos denominados ácidos hidroxicinámicos que son el producto de la unión de un ácido quínico y un derivado cinámico (ácido cafeico, ferúlico o p-cumárico) [13].

Todos estos compuestos poseen acción antioxidante y antiinflamatoria, y se denominan ácidos clorogénicos a los cuales se les atribuye el promover la pérdida de peso mejorando el metabolismo lipídico mediante la reducción de la síntesis de la grasa visceral, colesterol y ácidos grasos [14].

La identificación y cuantificación de estos componentes se realiza a través de técnicas cromatográficas [6]. Estas han sido usadas con éxito en el análisis de yerba mate [3] logrando identificar y cuantificar compuestos como cafeína, metilxantinas y ácidos clorogénicos con estándares puros. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido un protocolo utilizando HPLC-Uv-VIS que considere la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad en la determinación de ácidos clorogénicos en guayusa bajo esas condiciones de trabajo.

Por consiguiente, el establecer un método analítico que proporcione confiabilidad en los resultados obtenidos para la cuantificación de ácidos clorogénicos en *Ilex guayusa* requiere implementar la verificación de diferentes figuras de mérito. Entre estas se incluye la especificidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad, repetibilidad y reproducibilidad, así como veracidad. Estos parámetros se establecerán siguiendo las pautas de Eurachem, 2016 [30], que establece directrices para la calidad en mediciones químicas y analíticas.

Figuras de mérito para el establecimiento de protocolos de determinación analítica:

- Especificidad: garantiza que el método sea capaz de detectar y cuantificar específicamente los ácidos clorogénicos sin interferencias de otros compuestos presentes en la muestra. Se logrará mediante la separación cromatográfica y la confirmación de los picos de ácidos clorogénicos en la muestra.
- Límite de Detección (LOD): Representa la concentración más baja de un analito que puede ser detectado, se determina analizando muestras a concentraciones bajas y calculando la señal respecto al ruido.
- Límite de Cuantificación (LOQ): Es la concentración más baja de un analito que puede ser cuantificado con una precisión aceptable. Generalmente suele

ser superior en concentración al límite de detección, pero en algunos casos puede coincidir.

- Linealidad: Evalúa si la respuesta del método es proporcional a la concentración del analito en un rango específico. Se construye una curva de calibración con muestras de diferentes concentraciones y se verifica que el coeficiente de correlación (r^2) sea cercano a 1.
- Repetibilidad y Reproducibilidad: La repetibilidad mide la variación de resultados obtenidos por un mismo operador, utilizando el mismo equipo y en un corto periodo. La reproducibilidad evalúa la variación de resultados con diferentes operadores y/o equipos. Estos se verifican como el coeficiente de variación en porcentaje (%CV) de las mediciones.
- Veracidad: Permite comparar el valor medido con el valor verdadero o de referencia. Se realiza fortificando muestras con concentraciones conocidas de ácidos clorogénicos y se calcula el porcentaje de recuperación.

Por otro lado, cuando el objetivo es identificar, la metabolómica se vuelve una herramienta atractiva la cual permite identificar el perfil de ácidos clorogénicos presentes en las muestras de guayusa, y de esta manera verificar si los componentes en ella son aprovechables para dar un valor agregado a la misma. Los tres tipos de identificación: La identificación directa de metabolitos mediante espectrometría de masas se realiza comparando el espectro obtenido con una base de datos de espectros conocidos, asignando el nombre del metabolito si hay una coincidencia exacta [16]. La identificación indirecta se basa en información adicional, como la fórmula molecular, la estructura química o el contexto biológico, para inferir el nombre del metabolito a partir del espectro de masas [17]. Por último, la identificación tentativa se basa en la propuesta de una hipótesis sobre el nombre del metabolito basada en el análisis de los fragmentos del espectro de masas, pero sin confirmación experimental [18].

La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un Uv-VIS nos permite detectar y cuantificar moléculas conocidas [17], sin embargo para el descubrimiento de nuevas moléculas se empleó LC/MS [19]

La espectrometría de masas en tándem es una técnica que permite analizar la composición química de una muestra, mediante la separación y medición de la relación m/z de las masas moleculares de los analitos y sus fragmentos, el espectrómetro de masas, donde se ionizan y se miden sus masas en el caso de masas MS (MS1), mientras que una posible fragmentación ocurre en el acople de dos espectrómetros de masas MS/MS (MS2) posibilita la obtención de fragmentos [21].

La combinación de un cuadrupolo y un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en un equipo de espectrometría de masas en tándem ofrece ventajas en el análisis de compuestos complejos. Esta configuración conocida como Q-TOF (cuadrupolo-tiempo de vuelo) [21]. El cuadrupolo se encarga de seleccionar las moléculas con relación m/z en el rango de trabajo seleccionado, y el tiempo de vuelo mide el tiempo que tardan en llegar al detector después de ser aceleradas por un campo eléctrico [17]. De esta forma, se obtiene una alta resolución y precisión en la determinación de las masas

En este sentido, LC/MS proporciona información detallada sobre la presencia de metabolitos presentes en la *Ilex guayusa*, permitiendo la identificación de componentes específicos [18]. De acuerdo a que la cromatografía líquida ha sido utilizada para la identificación, cuantificación y caracterización de ácidos clorogénicos en plantas como en estos estudios [6,22–24], los cuales usan técnicas de cromatografía para el estudio de los ácidos clorogénicos dentro de las plantas de la familia *Ilex*.

La estadística en actividades biológicas de campo, se suelen emplear varios factores que engloban los más presentes en la ubicación del estudio, para ello se opta por varios estudios de modelos experimentales los cuales son la manera de agrupar conjuntos de datos relacionados entre las variables independientes y dependientes, dando lugar a un

sistema funcional que evalúa bajo las variables presentadas un resultado que puede estar siendo afectado por estos factores escogidos.

Para el estudio de diferentes comportamientos bajo ciertas variables de manera estadística se puede diseñar un sistema factorial el cual aproveche dichas variables para el tratamiento de datos extensos los cuales se desarrollarán en la investigación [18]. Este tipo de diseño permite evaluar la influencia de varios factores principales y secundarios, para relacionar sus interacciones de forma eficiente y rigurosa. Los factores principales de interés en el estudio de ácidos clorogénicos son la edad de la planta y la cantidad de luz solar, y como secundario el tipo de chakra. Se emplea una estrategia de bloques, donde se toman muestras de diferentes chakras de condiciones específicas. Los datos obtenidos se someten a un análisis estadístico para identificar las relaciones y tendencias más relevantes.

El análisis de estos datos complejos conduce naturalmente a la aplicación de GLM (Modelos Lineales Generalizados) [25]. Los GLM son útiles debido a su flexibilidad para manejar diferentes tipos de variables de respuesta, ya sea continua, binaria o de conteo [26]. Además, pueden acomodar la no linealidad y las interacciones entre variables, que son aspectos cruciales en estudios biológicos y ambientales [25].

Planteamiento del problema

El estudio de propiedades químicas de *Ilex guayusa* ha estado muy ligado a una especie de la misma familia *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil también denominada como yerba mate que es más conocida internacionalmente [8]. La guayusa al ser de la misma familia se espera que contenga metabolitos similares que la yerba mate, por lo cual ha despertado un gran interés en el análisis de estos compuestos específicos.

En la actualidad la guayusa ha sido comercializada, en supermercados nacionales y extranjeros encontrándose en diferentes presentaciones, bolsas para infusión y algunas bebidas energéticas [2]. Sin embargo, el mercado de comercio puede dirigirse a otros

productos potencialmente medicinales y energéticos fuera de las bebidas tradicionalmente vendidas.

La nula toxicidad de la guayusa causa que se estén impulsando investigaciones para el desarrollo y adecuaciones a nivel industrial [27]. Lo que buscan las empresas es extraer la mayor cantidad de compuestos químicos de interés farmacológico [2]. Esto permitirá el desarrollo de nuevos productos [1], y fármacos a partir de esta planta. Sin embargo, no existe estudio o registro de las mejores condiciones de plantación que permita la recolección de hojas de guayusa de mejor calidad.

Por tanto, necesidad investigativa y comercial de encontrar compuestos como: Los ácidos clorogénicos se ve oportuna, por la concentración que estas hojas presentan las cuales se podría llegar a mejorar en la guayusa con un rendimiento más productivo en las cosechas, dado que estas sustancias actúan como antioxidantes, siendo de importancia en la prevención del envejecimiento prematuro y ciertos tipos de afecciones cardiovasculares

Justificación de la investigación

La importancia de este estudio se centra en la detección y análisis de variables asociadas a la producción de ácidos clorogénicos en *Ilex guayusa*. Por consiguiente, se considera que existe una relación entre factores climáticos, geográficos, crecimiento y de cultivo de la planta [6] con la producción de ácidos clorogénicos. Los cuales son de interés para la comunidad ya que podrían ser controlados de manera que se pueda conseguir un producto de mayor calidad.

En consecuencia, desarrollar un método analítico con alta sensibilidad y selectividad basado en cromatografía líquida con detección Uv-VIS para determinar el contenido de ácidos clorogénicos específicos será una tarea imprescindible en el desarrollo de este trabajo [17] mejorando la manera de cuantificar este analito y ayudando a conseguir nuevos métodos de identificación. El análisis de datos mediante el uso de herramientas

estadísticas permite determinar parámetros ideales de plantación [15] para la selección de los factores que influyen más la concentración de ácidos clorogénicos; al igual que identificar los diferentes ácidos clorogénicos presentes en las diferentes muestras recolectadas, a través, del uso de la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem [20].

El uso de la *I. guayusa* se ha centrado en la cafeína como energizante natural. Sin embargo, pocas aplicaciones han sido encaminadas en cuanto a la productividad de ácidos clorogénicos, considerando que la producción de los mismos puede variar en función de las condiciones de desarrollo de la planta. Por tanto, es importante determinar los parámetros que permitan recolectar hojas con mayor cantidad de ácidos clorogénicos útiles en el desarrollo de productos farmacéuticos, considerando que dichos compuestos presentan actividad antioxidante y antimicrobiana [27], también en la industria de alimentos ya que ayuda a acelerar el metabolismo pudiendo servir como adelgazante natural [19] como resultado el poseer mayor presencia de ácidos clorogénicos ayudaría al metabolismo estimulando la degradación de lípidos y dando un compuesto bioactivo de alta relevancia a la planta de guayusa.

Las cosechas generadas en las chakras con las variables especificadas (Luz, edad, ubicación) para la mejor concentración de metabolitos específicos tienen varios beneficios para los productores [8]. Aprovechar al máximo los recursos naturales disponibles, y diversificando sus ingresos al ofrecer productos de mayor valor agregado [3]. Además, puede favorecer la popularidad de la guayusa y el incremento de las ventas de los agricultores que cosechan.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar el efecto de la luz solar, el estado de maduración y la ubicación de la chakra en la concentración de ácidos clorogénicos (CGA) presentes en *Ilex guayusa*.

Objetivos específicos

Verificar el método basado en cromatografía líquida (HPLC) con detección Uv-vis para la cuantificación de los CGA presentes en hojas de guayusa sometidas a las variables planteadas.

Cuantificar los CGA presentes en las muestras de *Ilex guayusa* que se recolectarán en las diferentes condiciones de luz solar, edad y chakras por cromatografía líquida acoplada a un sistema de detección Uv-vis (HPLC-Uv-vis).

Determinación perfil de CGA mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

Analizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en la cuantificación e identificación de CGA.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

Diseño experimental

La parte estadística del proyecto, se aplicó un diseño experimental factorial con niveles mixtos, utilizando bloques de 3 variables, dos de ellas con tres niveles y una con dos niveles, como se muestra en la **Tabla 1**. Los factores empleados fueron ubicación, edad y luz. El factor ubicación consistió en 3 chakras diferentes ("A"=Talag, B=Alto Pano y C=Alto Tena) las cuales tuvieron alturas de: Talag (Comunidad 5 de enero, Lupita Grefa, -1.083481 S -77.890895 W) 504 m s. n. m. (metros sobre el nivel del mar) Alto Pano (Comunidad Pumayacu, Piedad Ande, -1.004797 S -77.815821 W) 665 m s. n. m. Alto Tena (S/N, Sonia Beatriz Grefa Grefa, -0.950338 S -77.863348 W) 660 m s. n. m. El factor edad se dividió en 3 diferentes niveles: El nivel uno consistió en hojas recolectadas de plantas de edades entre 4 a 6 años (temprana "0"), el nivel dos se usaron hojas de plantas de edades entre 6 a 8 años (media "1") y en el nivel 3 hojas de plantas de edades de 8 a 10 años (tardía "2"). El último factor usado fue la exposición de luz solar que recibían las hojas, el cual fue dividido en 2 niveles (nivel 1 considerado como luz y nivel 2 considerado como sombra), en el primer nivel se recolectaron hojas que tenían una exposición de luz [+] ($300 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o superior) y en el segundo nivel se usaron hojas con exposición de luz [-] ($0 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $200 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) esto de acuerdo a los datos recopilados como se muestra en el **anexo Figura 2**, mediante un luxómetro se recolectaron las mediciones de la intensidad de luz como se lo realizó en el estudio de Liza G. 2018 [70], en donde se realizó un promedio de diferentes datos de intensidad de luz para definir rangos en los cuales recoger las hojas.

Tabla 1. Diseño experimental

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

Realizado por: Tomás Garzón, 2024

Recolección de las muestras

Las muestras se seleccionaron en base a diferentes variables, que incluyen: La cantidad de luz recibida, la edad de la planta y el lugar de recolección.

Se siguió un proceso de recolección al azar y se utilizó el método de Craig A., et al. (2016) [17], adaptándolo al estudio. Las condiciones de luz fueron verificadas con un PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density), los agricultores nos proporcionaron las plantas con las diferentes edades necesarias para cumplir con el diseño experimental.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-Uv-vis)

Tratamiento de muestras

Las muestras fueron tratadas con modificaciones de la metodología de Craig A. et al. (2016) [17].

Se pesó 250 mg de hojas frescas de guayusa en un matraz volumétrico de 500 mL y se agregó 400 mL de diluyente (solución acuosa con ácido fórmico (AF) 2.0%, acetonitrilo (ACN) 10%), seguidamente se sónico por 20 min. Finalmente, se afora al nivel del matraz. Se revolvió el matraz volumétrico para homogeneizar la muestra, posteriormente se sometió a un proceso de filtración utilizando filtros de jeringa de PTFE de 0.45 µm,

preparándola así para su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Verificación del método analítico para la cuantificación de ácidos clorogénicos por HPLC-Uv-vis

La verificación del método de cuantificación de ácidos clorogénicos en hojas de guayusa se realizó en el equipo Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) marca Waters, modelo sistema binario de bombas 1525, detector Uv/Visible 2489 y automuestreador 2707. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna marca Phenomenex Gemini C18 (150 x 2 mm), 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil usada fue ácido fórmico al 0.1% como solvente A y acetonitrilo grado HPLC más ácido fórmico 0.1% como solvente B. El caudal fue de 0.75 mL/min en modo gradiente descrito en la **Tabla 2**. El volumen de inyección estuvo seteado en 10 µL, y la longitud de onda a usar fue de 330 nm. La curva de calibración se realizó a partir de una solución madre 100 mg/L de 5-CQA (Supelco Chlorogenic Acid Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material) de acuerdo a estudios previamente realizados por Craig et al., 2016 [17]. El rango de trabajo empleado para la cuantificación del ácido clorogénico fue de 1.25 mg/L a 25 mg/L con el fin de evaluar la tendencia de la molécula para ser detectada por el equipo y poder analizar la linealidad del método.

Tabla 2. Gradiente de trabajo a ser usado en HPLC-Uv/vis, solvente A (ácido fórmico al 0.1%) y B (acetonitrilo grado HPLC más ácido fórmico 0.1%)

Gradiente general		
Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	80	20
12	80	20
15	95	5
15.1	5	95
16.5	5	95
16.6	95	5
19	95	5

Realizado por: Tomás Garzón, 2024

Desarrollo del método

Para el desarrollo del método analítico se evaluaron parámetros de selectividad, límite de detección y límite de cuantificación del instrumento y del método, repetibilidad y reproducibilidad. Para esto se establecerá los parámetros descritos en la **tabla 3**:

Tabla 3. Objetivos de verificación de métodos.

Linealidad	$r^2 \geq 0.99$
Selectividad	Ausencia de señal en el blanco reactivo y presencia de señal en el blanco matriz
Límite de detección	% de recuperación ≤ 50 %
Límite de cuantificación	% de recuperación 90%-110%
Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	% CV de repetibilidad; ≤ 12 % de precisión intermedia; ≤ 15 %
Veracidad	% de recuperación: 90%-110%

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

A continuación, se detalla la metodología empleada para el desarrollo de parámetros de desempeño del método

Linealidad

La linealidad fue evaluada mediante la revisión primero de 5 curvas de calibración, las cuales posteriormente pasaron por análisis estadístico, esto para poder evaluar la linealidad. Se tomó como criterio único el coeficiente de correlación lineal,

El porcentaje de la linealidad se calculó en base a la curva de calibración que nos da la el r^2 y la desviación estándar de acuerdo a:

$$\% \text{ Linealidad} = \left(\frac{1 - s_b}{b} \right) * 100$$

Siendo:

s_b = Desviación estandar de la pendiente

b = Pendiente

Las curvas de calibración fueron realizadas a partir de lo explicado anteriormente en el apartado **Tratamiento de muestras**.

Selectividad

Para determinar la selectividad se emplearon dos criterios:

- Blanco reactivo: Análisis del diluyente que se usó para la preparación de muestras y estándares.
- Blanco matriz: Análisis de una muestra vegetal con propiedades aromáticas, que contenga CGA.

Límite de detección

El límite de detección se realizó preparando 10 réplicas de soluciones estándares de CGA por debajo del punto más bajo del rango de trabajo: 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1 ppm. Los parámetros de la solución con la concentración más baja que cumpla con los objetivos de verificación propuestos, será establecida como límites de detección y cuantificación del instrumento.

$$LOD = \frac{3s_b}{b}$$

Siendo:

s_b = Desviación de la ordenada en el origen

b = Pendiente de la curva de calibración

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se realizó fortificando una muestra de concentración conocida de CGA con concentraciones conocidas de CGA por debajo del punto más bajo del rango de trabajo de 0.025 a 1 ppm. Cada punto se evaluó 10 veces. Los parámetros de la solución con la concentración más baja que cumplan con los objetivos de verificación propuestos será establecidos como límites de detección y cuantificación del instrumento.

$$LOQ = \frac{3s_b}{b}$$

Siendo:

s_b = Desviación de la ordenada en el origen

b = Pendiente de la curva de calibración

Precisión

Inicialmente, se seleccionaron muestras en tres rangos de concentración distintos: alta, media y baja. Para cada rango de concentración, se prepararon cuatro réplicas, cuidando que fueran lo más idénticas posible en términos de preparación y manipulación.

La segunda etapa del proceso consistió en repetir la medición y la preparación de réplicas durante tres días consecutivos. Este paso fue esencial para evaluar tanto la repetibilidad, es decir, la variación dentro del mismo día, como la precisión intermedia, que se refiere a la variación a lo largo de diferentes días.

Finalmente, en la etapa de análisis de datos, se calculó el coeficiente de variación porcentual (% CV) para cada conjunto de réplicas diarias, lo que permitió evaluar la repetibilidad. Además, se calculó el % CV para cada rango de concentración, combinando los datos de los tres días, para determinar la precisión intermedia. Los valores de % CV obtenidos se compararon con criterios de aceptación previamente establecidos

- Para calcular el %CV para la repetibilidad:

$$Media = \frac{\sum x_i}{n} \longrightarrow (SD) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - Media)^2}{n-1}} \longrightarrow \%CV = \left(\frac{SD}{Media} \right) * 100$$

Media= Es la sumatoria (de todas las muestras del mismo rango.

x_i =Las mediciones individuales

SD= Desviación estándar

- Para calcular %CV para Precisión intermedia: la fórmula es la misma pero destinada no a un solo día, se lo ejecuta a todos los días de un mismo rango.

Veracidad

Se seleccionaron al menos dos niveles de concentración para la fortificación de muestras: bajo 0.4 mg/g, y alto 3.6 mg/g, situándose todos dentro del rango de trabajo del método en estudio, se realizaron 12 determinaciones, y se evaluó el porcentaje de recuperación en el rango establecido en los objetivos de verificación. Se prepararon muestras fortificadas, es decir, se añadió una cantidad conocida del analito de interés a la matriz de muestra en los niveles de concentración previamente seleccionados. Se analizaron las muestras fortificadas usando el método analítico bajo evaluación. Posteriormente, se calculó el porcentaje de recuperación para cada nivel de fortificación, además de una fórmula para poder transformar los datos obtenidos de mg/L a mg/g:

$$\text{Promedio} = \frac{\sum x_i}{n} \text{ -----} \rightarrow x = \text{Promedio} - \text{Concentración CGA conocida}$$

$$\text{mg/g} = \frac{x * \text{Volumen usado en el tratamiento de muestra} * 1000}{250(\text{mg de guayusa usados para cada muestra})} \text{ -----} \rightarrow \% \text{Rec} = \frac{\text{Conc. Obtenida}}{\text{Conc. Real}} * 100$$

Finalmente, se evaluó el rendimiento del método analítico. Esto implicó determinar si el porcentaje de recuperación calculado caía dentro de un rango aceptable. Todo el desarrollo de la verificación del método fue desarrollado según lo indicado por la guía de verificación de métodos analíticos Eurachem, 2005 [30].

Análisis estadístico

Basándonos en la literatura previa y las observaciones preliminares [17], se plantearon las siguientes hipótesis:

- H0: No existen diferencias significativas en las concentraciones de CGA entre los distintos niveles de los factores o variables planteadas
- H1: Existen diferencias significativas en las concentraciones de CGA entre los distintos niveles de los factores o variables planteadas

Modelado estadístico

Se ajustó un Modelo Lineal Generalizado (GLM) utilizando la familia Gaussian y la función de enlace logarítmico para modelar la relación entre las variables independientes y la variable de respuesta transformada.

Verificación de supuestos

Se realizó un diagnóstico del modelo para verificar los supuestos de linealidad, independencia, homocedasticidad y normalidad de los residuos utilizando gráficos de dispersión, gráficos de residuos vs. valores ajustados y Q-Q plots.

Pruebas de hipótesis

Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la influencia de las variables categóricas y sus interacciones en la variable de respuesta. Las diferencias significativas entre las categorías de predictores se exploraron utilizando la prueba poshoc de Tukey HSD.

Perfil metabolómico de los CGA

El perfil completo de CGA realizó en el equipo de LC/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 sonda empleada fue una sonda ESI (ionización por electropulverización), con un análisis de polaridad positiva. La separación cromatográfica se logró utilizando una columna UPLC Waters Acquity BEH C18 (50 × 2,1 mm), 1,7 µm de tamaño de partícula acoplada a una precolumna Waters Acquity UPLC BEH C18 VanGuard (5 × 2,1 mm). Se empleó dos fases: Fase A (Ácido fórmico 0,1%) y Fase B (ACN y 0,1% de Ácido fórmico), con un caudal de 0,5 mL/min. Se optimizaron algunos ajustes; el voltaje capilar 0,5 kV, la temperatura de la fuente y de la solvatación será de 120°C y 450°C respectivamente, el gas de solvatación fue nitrógeno con un

caudal de 900 L h^{-1} , gas que se empleó en el cono se mantiene en 0 L h^{-1} , el gas de colisión empleado será el gas de argón. La separación de los compuestos se realizó a través de un gradiente que se usará de la siguiente manera, 1% B (1 min), 1-20% B (10 min), 20-25% B (10 min) 25-30% B (5 min), 35-50% B (5 min), luego se mantendrá una separación isocrática en 50% por 5 min.

En el modo Fast DDA, el espectrómetro de masas TOF seleccionó los iones precursores basándose en su intensidad para su posterior fragmentación, utilizando energías de colisión de 10 eV, 20 eV y 40 eV.

Preparación de muestras

Las muestras fueron preparadas a partir de la preparación de muestras para HPLC en este caso se prepara una dilución seriada en balones de 50 ml hasta llegar a una concentración de 200 ppb, seguidamente se realizará los blancos de extracción (agua, ACN, AF), idoneidad del sistema (agua tipo 1) y los QC (Quality Control) los cuales fueron un pool de cada variable empleada [28].

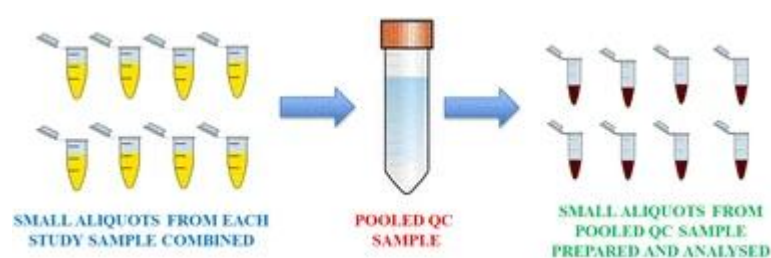


Imagen 1. Elaboración referencial de Pool para QC, Tomado de: Broadhurst D, et al., 2018 [28].

Tratamiento de Datos y Análisis de Redes Moleculares

Tras la adquisición de datos mediante la técnica Fast Data-Dependent Acquisition (DDA), realizada en un sistema UPLC acoplado a un espectrómetro de masas QTOF, se procedió al tratamiento y análisis de estos datos. Los archivos crudos, inicialmente en formato.raw, fueron convertidos a .mzML utilizando el software Mzmine 3.51, lo que permitió la reducir el ruido de las muestras, así como alinear los datos y sustraer los picos cromatográficos del blanco [41].

En la siguiente fase, se desarrolló la construcción de redes moleculares utilizando la plataforma GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) [48]. La herramienta Molecular Networking fue empleada para facilitar la identificación de las moléculas, utilizando un umbral de similitud de coseno de 0.7 y un margen de error de 10 ppm para validar las coincidencias moleculares. Para corroborar las correlaciones dentro de la red molecular, se utilizaron herramientas como MS2LDA, Dereplicator+ y Molnetenhancer.

Se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de las energías de colisión individuales y su combinación, con el fin de optimizar la visualización de las redes en Cytoscape [65]. Este enfoque permitió observar detalladamente las interacciones entre los diferentes clústeres de moléculas, proporcionando una visión más profunda y detallada de las relaciones estructurales y funcionales entre los componentes identificados.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

Verificación del método

A continuación, se presentan los resultados obtenidos, los cuales son cruciales para establecer la verificación del método propuesto y su aplicabilidad en el campo de la biotecnología y áreas relacionadas. Estos resultados son presentados en detalle en las siguientes secciones, con un enfoque en su interpretación y significado en el contexto más amplio de la investigación en ácidos clorogénicos.

Linealidad

La **tabla 4** muestra los resultados obtenidos de las diferentes curvas de calibración recolectadas en el equipo HPLC:

Tabla 4. Resultados linealidad				
Fecha	Ecuación de la curva de calibración	R²	Criterio de aceptación R²	
12-abr	Y = 1.26e ⁺⁰⁰⁴ X - 1.43e ⁺⁰⁰³	0.999854	R²≥0.99	
13-abr	Y = 1.24e ⁺⁰⁰⁴ X - 2.54e ⁺⁰⁰²	0.997125		
18-abr	Y = 1.20e ⁺⁰⁰⁴ X - 1.98e ⁺⁰⁰³	0.998068		
24-abr	Y = 1.12e ⁺⁰⁰⁴ X - 4.86e ⁺⁰⁰²	0.999693		
01-sep	Y = 1.92e ⁺⁰⁰⁴ X - 1.13e ⁺⁰⁰⁴	0.997701		
Realizado por: Thomas Garzon, 2024				

Las curvas de calibración obtenidas muestran que se cumple con el criterio de verificación.

Selectividad

Las siguientes figuras muestran los cromatogramas obtenidos de los dos blancos, tanto el reactivo como el matriz.

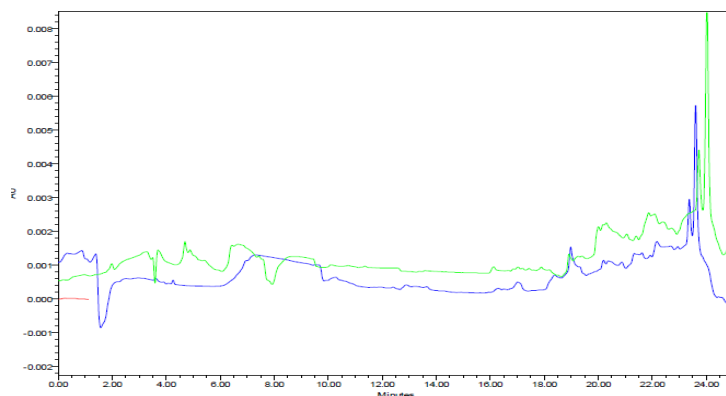


Figura 1. Blanco reactivo, esta imagen corresponde a un cromatograma donde el eje “x” es el tiempo de retención y el eje “y” la intensidad del pico.

En la **figura 1** se observa el blanco reactivo (color verde), sin presencia de CGA. Se puede observar que no existe ninguna absorbancia en el tiempo de corrida del blanco, por la nula presencia del CGA.

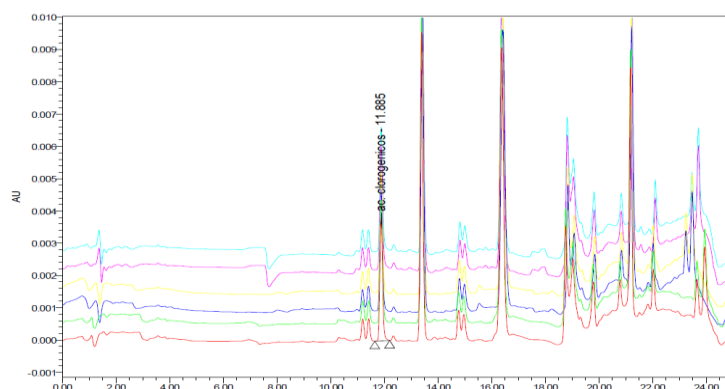


Figura 2. Blanco matriz *Chamaemelum nobile* (manzanilla), esta imagen corresponde a un cromatograma donde el eje “x” es el tiempo de retención y el eje “y” la intensidad del pico.

Presencia de CGA en el cromatograma, se realizaron 6 réplicas, en las 6 réplicas realizadas existe una buena presencia de CGA.

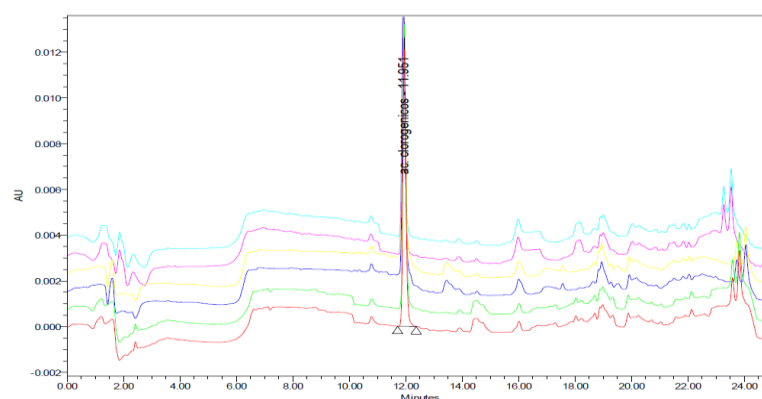


Figura 3. Blanco matriz *Coriandrum sativum* (Cilantro), esta imagen corresponde a un cromatograma donde el eje “x” es el tiempo de retención y el eje “y” la intensidad del pico.

Se observa la presencia de CGA dentro de los RT (tiempos de retención) que se encontraron en guayusa presentes en el cromatograma de la Figura 2.

En las Figuras 2 y 3, se observa la presencia de los CGA por tanto se cumple con el criterio de verificación.

Límite de detección

Tabla 5. Límite de detección

LOD							Criterio de aceptación
Cantidad							
Std 0,05	Std 0,1	Std 0,2	Std 0,25	Std 0,5	Std 1		
%recuperación	47.4	66.1	67.5	110.7	94.6	94.5	%de recuperación ≤50

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

El límite de detección arroja como resultado que el equipo puede detectar una concentración de 0.05 mg/L de ácido clorogénico.

Límite de cuantificación

La siguiente tabla muestra los límites de cuantificación que se obtuvieron:

Tabla 6. Límite de cuantificación							
LOQ							
	Cantidad						Criterio de aceptación
	Std 0,05	Std 0,1	Std 0,2	Std 0,25	Std 0,5	Std 1	
%recuperación	47.4	66.8	67.55	110.73	94.68	94.58	%de recuperación 90-110%
Realizado por: Thomas Garzon, 2024							

La **tabla 6** muestra los porcentajes de recuperación a diferentes concentraciones, por lo tanto, según los criterios establecidos para la verificación del método: 0.25 mg/L es el límite de cuantificación.

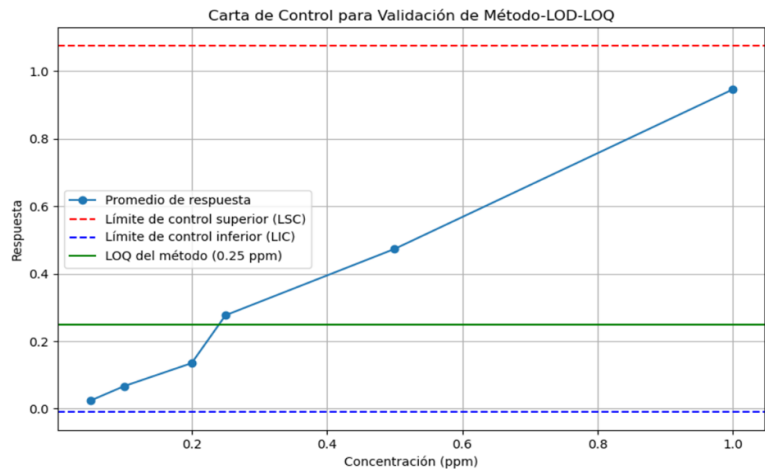


Figura 4. Carta control LOD-LOQ, eje x concentración, eje y respuesta de las muestras

La Figura 4. nos muestra la carta control [29] en la que se puede observar los límites que tiene nuestro HPLC y a que niveles de concentración se puede detectar y cuantificar nuestro analito.

Precisión

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos para la precisión del método:

Tabla 7. Resultados Precisión

Coeficiente de Variación para la Repetibilidad:			
Día	Cantidad	Concentración	Criterio de aceptación
16-ago	Alta	4.12	%CV ≤ 12%
	Media	3.05	
	Baja	5.01	
17-ago	Alta	5.18	
	Media	5.89	
	Baja	5.01	
18-ago	Alta	0.01	
	Media	3.81	
	Baja	28.18	
Coeficiente de Variación para la Precisión Intermedia:			
	Cantidad	Concentración	Criterio de aceptación
	Alta	6.63	%CV ≤ 15%
	Media	5.62	
	Baja	20.63	

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Como se muestra en la **Tabla 7**, el coeficiente de variación para las concentraciones altas y medias se mantiene estable a lo largo del tiempo, demostrando reproducibilidad durante el día. Sin embargo, para las concentraciones bajas, se observa un comportamiento distinto: hay una variación normal el primer día, pero esta aumenta progresivamente, incumpliendo con el criterio de aceptación establecido.

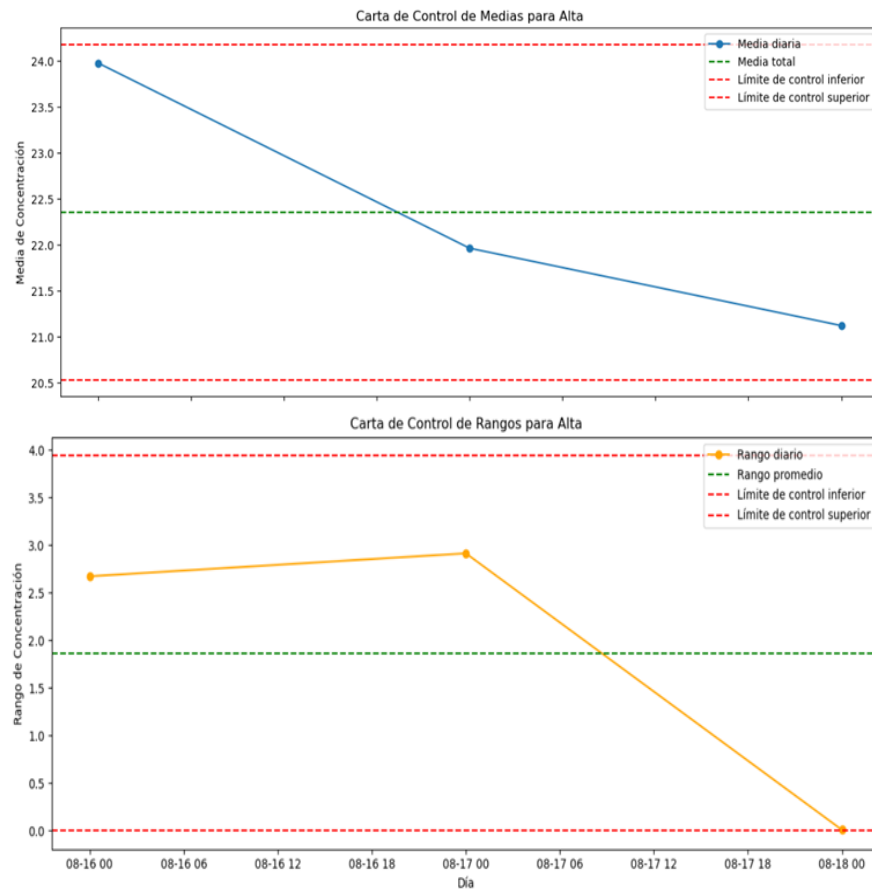


Figura 5. Carta control precisión valores altos, grafico que representa los valores de concentración en medida que pasa el tiempo en valores altos.

Se observa una media y rangos para los valores de concentración alta.

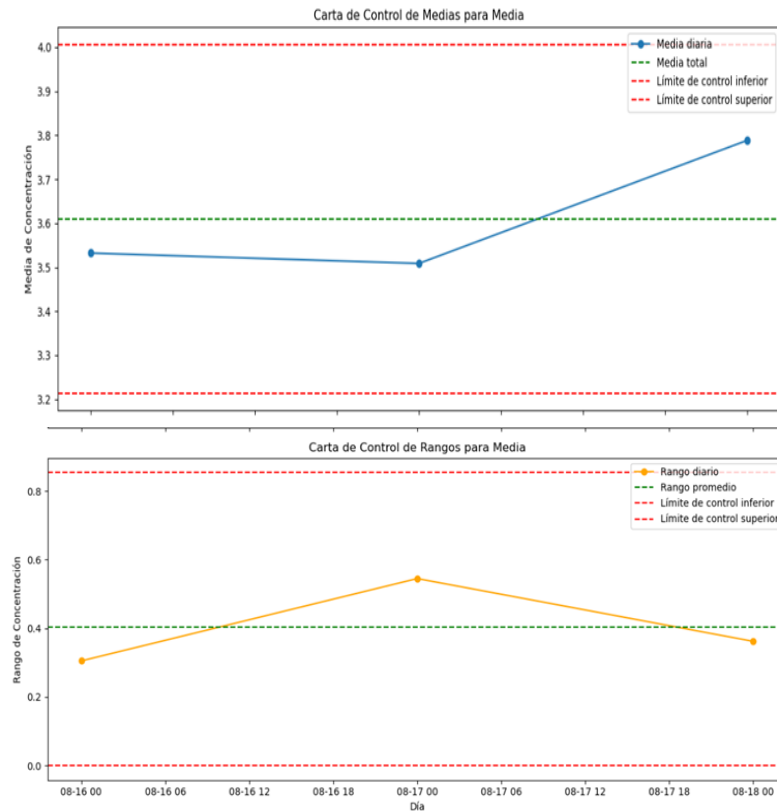


Figura 6. Carta control precisión valores medios, grafico que representa los valores de concentración en medida que pasa el tiempo en valores medios.

Se observa una medida de valores promedio y rangos para los valores de concentración medio.

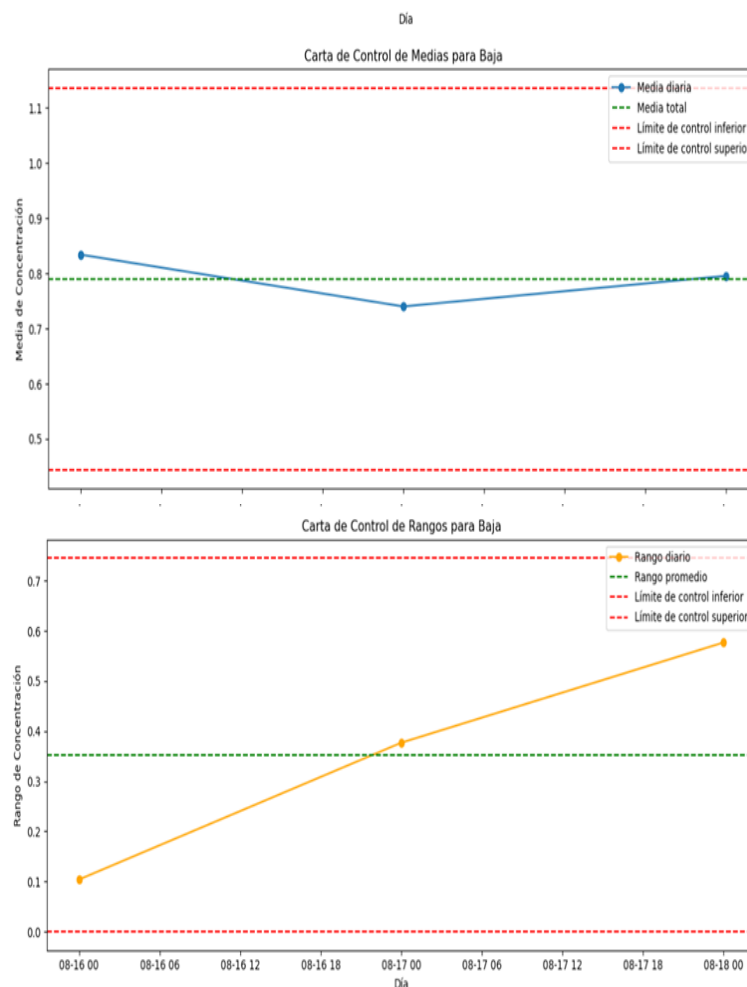


Figura 7. Carta control precisión valores bajos, grafico que representa los valores de concentración en medida que pasa el tiempo en valores bajos.

Se observa una media de valores promedios y rangos para los valores de concentración bajo. Ya que se puede observar que la muestra para altas concentraciones no se degrada tan rápido como las muestras con bajas concentraciones se consideró tener cierto grado de criterio al recolectar los datos para su procesamiento de datos.

Veracidad

Se realizó una **tabla 8** resumiendo los datos obtenidos del porcentaje de recuperación, indicando los criterios a cumplir:

Tabla 8. Resultados Veracidad

<i>Porcentaje de recuperación</i>		
<i>Concentración</i>	Porcentaje de recuperación	Criterio de aceptación
Alta	93.96%	90-110%
Baja	95.31%	

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

El reporte del porcentaje que se recuperó en las concentraciones altas y bajas, nos da como resultado un 90 a 110 % con lo cual se acepta la veracidad del método.

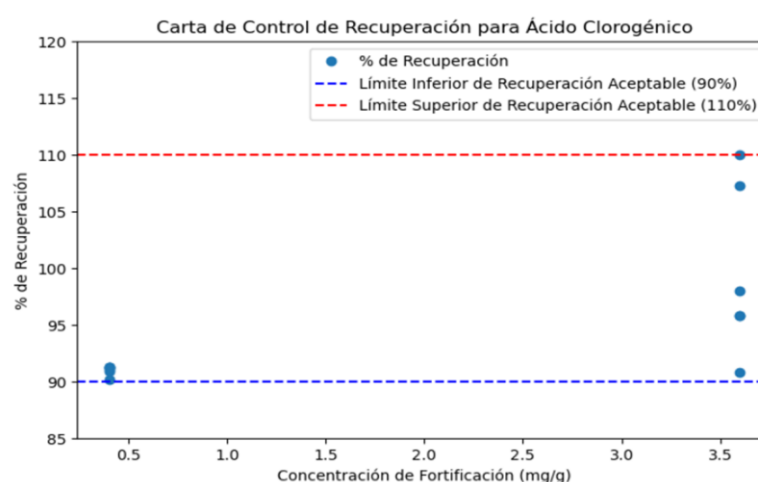


Figura 8. Carta control veracidad, los valores recuperados en base a límites establecidos en la verificación del método.

Se observa que tantos valores con concentraciones mínimas y altas se encuentran dentro del rango de recuperación establecido. En la carta control observamos que los niveles de CGA no sobrepasan los límites establecidos con anterioridad por Eucharem [30].

Se elaboró una **tabla 9** resumiendo los resultados obtenidos a lo largo de la verificación del método, en donde se podrá verificar los criterios y resultados de los mismos.

Tabla 9. Resultados Finales

Parámetros	Especificaciones	Resultados	Evaluación
Linealidad	$r^2 \geq 0.99$	0.99	Aceptable
Selectividad	Ausencia en el blanco reactivo de señal en los tiempos de retención del analito, y presencia de señal en el blanco matriz.	La presencia fue evaluada para la señal en los tiempos de retención del CGA	Aceptable
Límite de detección	% de recuperación ≤ 50 %	0.05 ppm	Aceptable
Límite de cuantificación	% de recuperación 90%-110%	0.25 ppm	Aceptable
Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	% CV de repetibilidad; ≤ 12 % de precisión intermedia; ≤ 15 %	Alta: 5%	Aceptable
		Media: 6%	Aceptable
		Baja: 20%	muy malo
Veracidad	% de recuperación: 90%-110%	95-110%	Aceptable

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Cuantificación de ácido clorogénico 5-CQA

Al realizar la cuantificación de los diferentes factores se resumió los resultados en la siguiente tabla presentando los resultados en base al diseño experimental:

Tabla 10. Concentración (ppm) promedio de 5-CQA en muestra de *Ilex guayusa*

Chakras		Talag (A)		Alto Pano (B)		Alto Tena ©	
Condiciones exposición		Luz (+)	Sombra (-)	Luz (+)	Sombra (-)	Luz (+)	Sombra (-)
Edades	0	12.56	5.53	9.91	7.29	3.52	2.44
	1	5.19	3.84	4.74	5.60	1.88	2.83
	2	1.77	2.54	2.56	10.26	1.39	2.02

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Las concentraciones mostradas en la **Tabla 10.** están en ppm (mg/L) se observan concentraciones altas en relación a los factores, pero no se podrá sacar conclusiones sin antes proceder con el análisis estadístico.

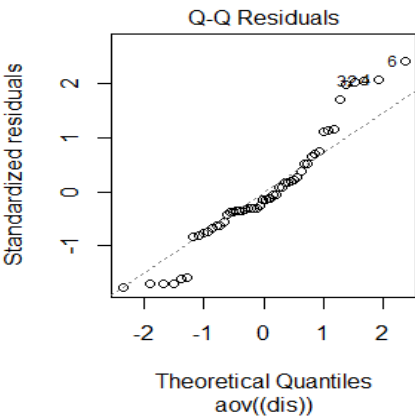


Figura 9. Gráfico Q-Q, grafico que representa la distribución de los datos dando en este caso una distribución asimétrica.

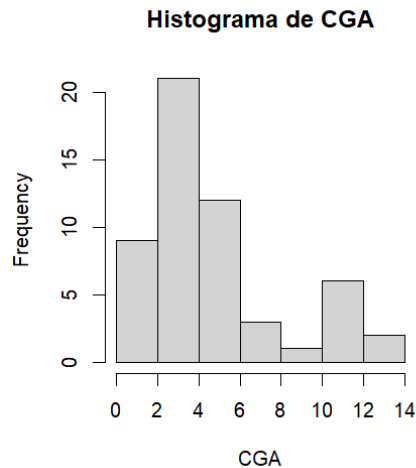


Figura 10. Histograma, distribución de datos, se detalla una la frecuencia de los datos.

El histograma que se muestra en la **figura 10.** muestra la distribución de los valores de CGA. Los datos parecen estar sesgados hacia la derecha, con una cola más larga hacia los valores más altos. Esto es típico de los datos que pueden seguir una distribución Gamma, que es común para variables que son siempre positivas y tienen una distribución asimétrica. La forma del histograma sugiere que los datos de CGA no siguen una distribución normal y podrían ser modelados adecuadamente con una distribución Gamma o alguna otra distribución asimétrica positiva.

Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para comparar la distribución de los datos con una distribución Gamma teórica.

Dando como resultado: $D = 0.1453$, $p\text{-value} = 0.2043$. El valor p es mayor que el alfa empleada ($\alpha = 0.05$), lo que indica que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de que los datos siguen una distribución Gamma.

La prueba de Levene se utilizó para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre los diferentes grupos definidos por la combinación de factores chakra, edad y exposición.

Los resultados fueron: F value = 0.3653, p-value = 0.9853, dando un valor p muy alto sugiere que las varianzas entre los grupos son homogéneas.

Los resultados del histograma y el test de Kolmogorov-Smirnov apoyan la idea de que la distribución Gamma podría ser un modelo adecuado para los datos de CGA. El test de Levene indica que las varianzas son homogéneas entre los grupos de interacción de los factores, lo cual es favorable para realizar el test ANOVA.

Concluimos por gráficos que los datos no presentan una normalidad además de tener un p value por parte de shapiro test de p-value = 0.009657, se propone realizar modelos lineales generalizados en este caso se usó la familia “gamma” dado a los resultados obtenidos para garantizar el uso de los GLM y la familia escogida por la naturaleza de los datos.

Se comienza con la transformación de los GLM para ajustar los datos:

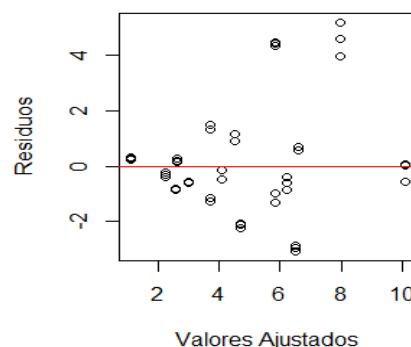


Figura 11. Gráfico Residuos vs Valores ajustados, se muestra valores en el grafico donde sé que existe problemas con el método de análisis.

La **figura 11** sugiere que el modelo no se ajusta dado que existe el problema de posibles outliers y una posible heterocedasticidad. La prueba de Breusch-Pagan da un p-value = 0.0002927, por lo que se propone que el modelo tiene heterocedasticidad. Se buscará arreglar los problemas transformando los ‘links’ del modelo.

Por lo tanto, se propone transformar el modelo:

Se procedió a aplicar la Transformación Logarítmica: Dado que el intervalo de confianza incluye el 0, aplicar una transformación logarítmica a la variable de respuesta que logró estabilizar la varianza y mejorar la normalidad de los residuos.

La evaluación de las predicciones se dio por el error cuadrático medio (MSE) y el error absoluto medio (MAE):

Escala logarítmica:

- MSE logarítmico= 0.0714
- MAE logarítmico= 0.2022

Estos resultados son relativamente bajos, esto indicaría que el modelo se ajusta bien a la escala propuesta. El MSE y MAE más bajos sugieren que las predicciones están bastante cerca de los valores reales en términos logarítmicos.

Escala original:

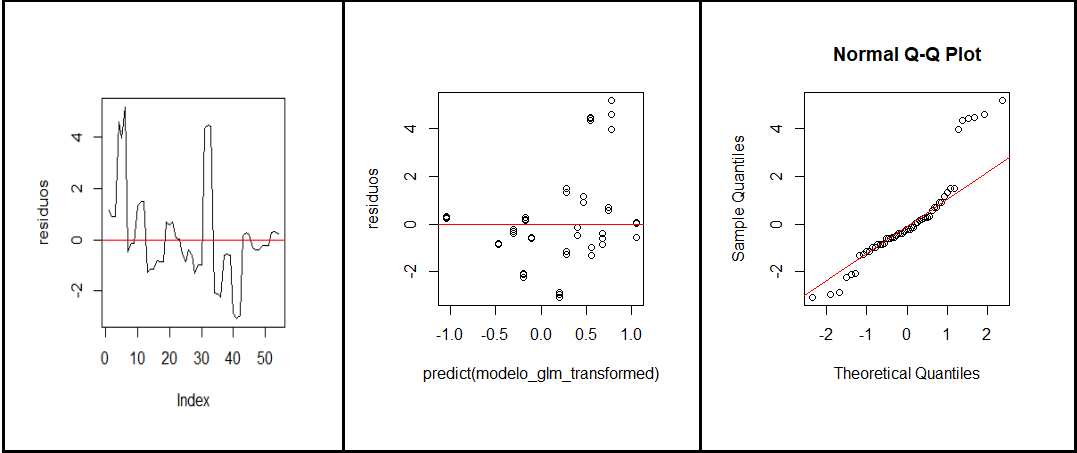
- MSE original= 5.84
- MAE original= 1.3689

En la escala original, el MSE y el MAE son más altos. Esto es esperable, ya que la escala original amplificó cualquier error presente en la escala logarítmica. Sin embargo, la magnitud de estos errores debe interpretarse en el contexto de los valores reales de la variable de respuesta (CGA). En este caso los valores de CGA son relativamente altos por lo que el MAE es pequeño y no significativo.

De acuerdo a lo demostrado en la **tabla 10** hay diferencias significativas en la variable de respuesta transformada entre los distintos niveles de chak. Específicamente, el grupo C tiene una media significativamente menor que los grupos A y B, y el grupo B tiene una media significativamente mayor que el grupo A. Para la edad, cada uno de los tiempos posteriores (T1 y T2) tiene una media significativamente menor en la variable de

respuesta transformada en comparación con el tiempo base T0. Además, T2 es significativamente menor que T1.

Tabla 11. Supuestos del método ajustados



Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Dado que se trabajó con variables categóricas, la "linealidad" no es el enfoque, sino más bien si las diferencias entre las categorías son estadísticamente significativas. Como se observa en la **tabla 11** no parece haber patrones claros que sugieran problemas de independencia. No hay señales evidentes de heterocedasticidad, aunque una inspección visual no siempre es suficiente para descartarla. Los residuos parecen ser aproximadamente normales con algunas posibles desviaciones en los extremos. Multicolinealidad: No hay indicaciones de multicolinealidad problemática en el modelo. Se procedió a reajustar el modelo logarítmico para la mejor adaptación del modelo propuesto.

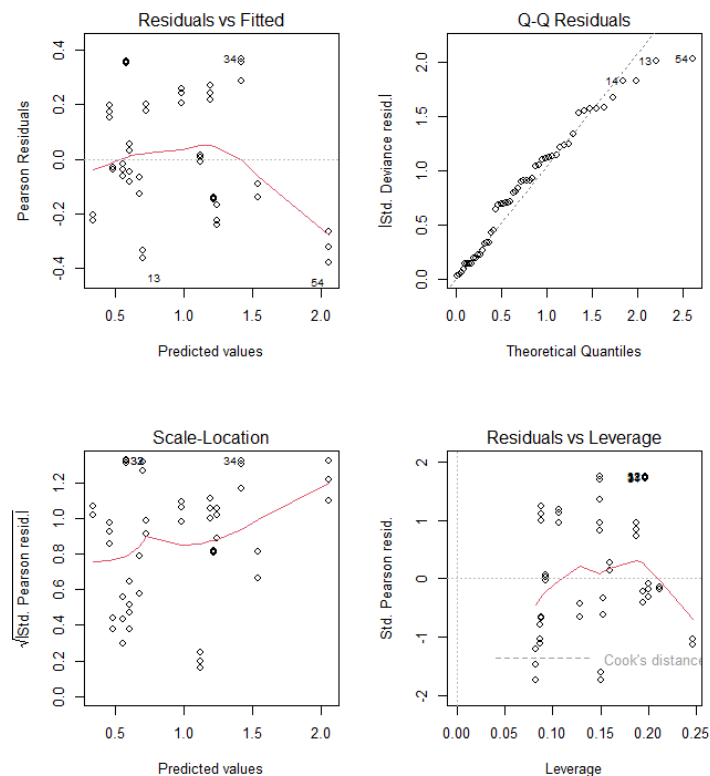


Figura 12. Supuestos del modelo ajustado, se presentan supuestos estadísticos como los antes mencionados.

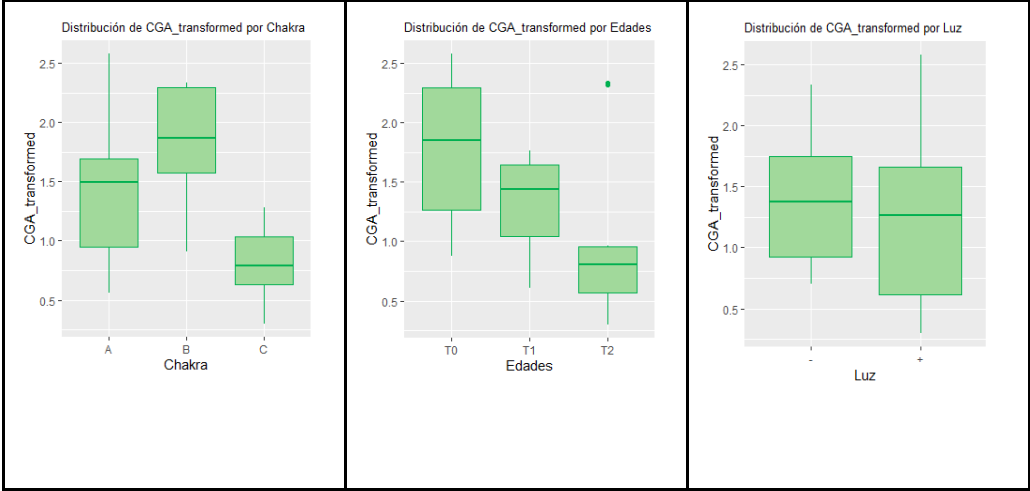
Estos resultados sugieren que el modelo tiene un buen ajuste estadístico en términos de la capacidad para explicar la variabilidad de los datos y que los errores de predicción son relativamente bajos.

Además, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) sobre la variable de respuesta transformada para evaluar las diferencias entre los niveles de los factores clave: Chakra, Edad y Luz. Estos resultados, facilitaron la interpretación de las diferencias estadísticas significativas y las tendencias en los datos.

El análisis de varianza (ANOVA) es una herramienta estadística fundamental para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos. En el contexto de su estudio, el ANOVA se ha utilizado para examinar cómo los factores Chakra, Edad y Luz interactúan y afectan a la variable de respuesta que, por lo que

menciona, ha sido transformada para satisfacer los supuestos de esta técnica estadística.

Tabla 12. Correlación entre los valores del CGA



Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 13. ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chak	2	9.184	4.592	63.30	6.18e-14	***
Age	2	5.939	2.970	40.94	6.13e-11	***
Light	1	0.136	0.136	1.87	0.178	
Age:Light	2	3.271	1.636	22.55	1.50e-07	***
Residuals	46	3.337	0.073			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

De acuerdo con la **tabla 11 y 13**, el ANOVA ha revelado resultados significativos para los factores Chakra y Edad, así como para la interacción entre Edad y Luz, lo que indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo en la variable de respuesta. El p-valor asociado con Chakra y Edad es inferior a 0.001, lo que sugiere que las diferencias en los niveles de chakra y las distintas edades tienen un impacto muy significativo en la variable de respuesta. La interacción Edad: Luz también es significativa con un p-valor de $1.50e^{-07}$, lo que implica que el efecto de la luz en la variable de respuesta no es constante a través de todas las edades.

La ausencia de significación estadística para el factor luz por sí solo (p-valor de 0.178) sugiere que no hay suficiente evidencia para afirmar que diferentes niveles de luz tienen un efecto directo en la variable de respuesta cuando no consideramos la edad. Sin embargo, la significancia de la interacción edad: luz indica que el efecto de la luz en la variable de respuesta es dependiente de la edad; es decir, la edad modifica cómo la luz afecta la variable de respuesta.

Además, el tamaño de efecto, reflejado en la suma de cuadrados y el cuadrado medio, muestra la magnitud del impacto de cada factor. Por ejemplo, los factores chakra y edad tienen sumas de cuadrados mucho más grandes que la luz, lo que indica que tienen un efecto más pronunciado sobre la variable de respuesta.

La significancia estadística también es reflejada en los valores F, donde los factores Chakra y Edad tienen valores F más altos, lo que indica una mayor variabilidad entre los grupos que la variabilidad dentro de los grupos para estos factores. Esto refuerza la idea de que estos factores son predictores importantes de la variable de respuesta.

Perfil metabolómico de ácidos clorogénicos en extractos de *I. guayusa*.

Los metabolitos identificados se encuentran en la **tabla 14**, los cuales se recopilaron de las 3 energías empleadas.

Tabla 14. Identificación de metabolitos

Metabolitos	Fórmula	RT (mín.)	Energía de colisión	Masa experimental (mz) [M-H] ⁺	Error (ppm)	Coseno
Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.350	40:20:10	163.03941	0	1
Ácido Neoclorogenico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2.975	40:20:10	135.0453	0	1
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	3.4518	40:20	195.0886	0.39196809998998106	0.74
DIMETILBENZIMIDAZOL	C ₉ H ₁₀ N ₂	11.4924	40	147.0922	- 0.14298444792900522	0.821751
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	4.1936	40	303.0143	0.7226334144431606	0.804247
Petasol	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	9.184	20	235.1703	2.1049815474211493	0.794195
Hyoscyamine	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O	3.7505	20	290.1767	3.726598758074864	0.911511
N-fenil-1-naftilamina	C ₁₆ H ₁₃ N	9.2716	20	220.1127	0.3432292908131458	0.893027
N,N-dietil-3-metilbenzamida	C ₁₂ H ₁₇ NO	6.6281	20	192.139	0.8369057535135448	0.846486
4-hidroxi-1-(2-hidroxietil)- 2,2,6,6-tetrametilpiperidina	C ₁₄ H ₂₇ NO ₂	0.7353	20	202.1807	- 0.01982335565926466	0.847687
ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	3.3466	20	163.0397	1.1096763597384962	0.846089

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Los parámetros que delimitaron la identificación fueron: un ppm de ± 10 ppm y un coseno de 0.7, se realizó la identificación por medio del portal GNPS y se revisaron los metabolitos encontrados mediante la literatura y bases de datos como chemspider y pubchem.

Tabla 15. Clasificación de compuestos identificados

Metabolito	Grupo/Familia	Función
Ácido clorogénico	fenilpropanoides	Propiedades antioxidantes y se encuentran comúnmente en una variedad de plantas
Ácido Neoclorogénico	fenilpropanoides	Propiedades antioxidantes y se encuentran comúnmente en una variedad de plantas
Cafeína	Xantinas	Estimulante del sistema nervioso central.
Dimetilbenzimidazol	Benzimidazoles	Utilizado en medicamentos antiparasitarios y antifúngicos.
Ácido elágico	Taninos	Antioxidante, usado en suplementos alimenticios y cosmética.
Petasol	Terpenos	Compuesto en ciertas plantas con propiedades medicinales.
Hyoscyamine	Alcaloides tropanos	Fármaco anticolinérgico.
N-fenil-1-naftilamina	Aminas aromáticas	Antioxidante en la industria química.
N,N-dietil-3-metilbenzamida	Amidas	Repelente de insectos.
4-hidroxi-1-(2-hidroxietil)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina	Piperidinas	Antioxidante en la industria química.
Ácido cafeico	Fenoles	Antioxidante, se encuentra en todos los vegetales.

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

La **tabla 15** muestra las propiedades de los metabolitos encontrados en plantas. Se destaca que la mayoría de los metabolitos identificados, son de capacidad antioxidante, esto refutando la idea del método de extracción único para metabolitos antioxidantes y la verificación en la presencia de los CGA para confirmar la aparición de estos compuestos en la identificación con estándares.

Redes moleculares

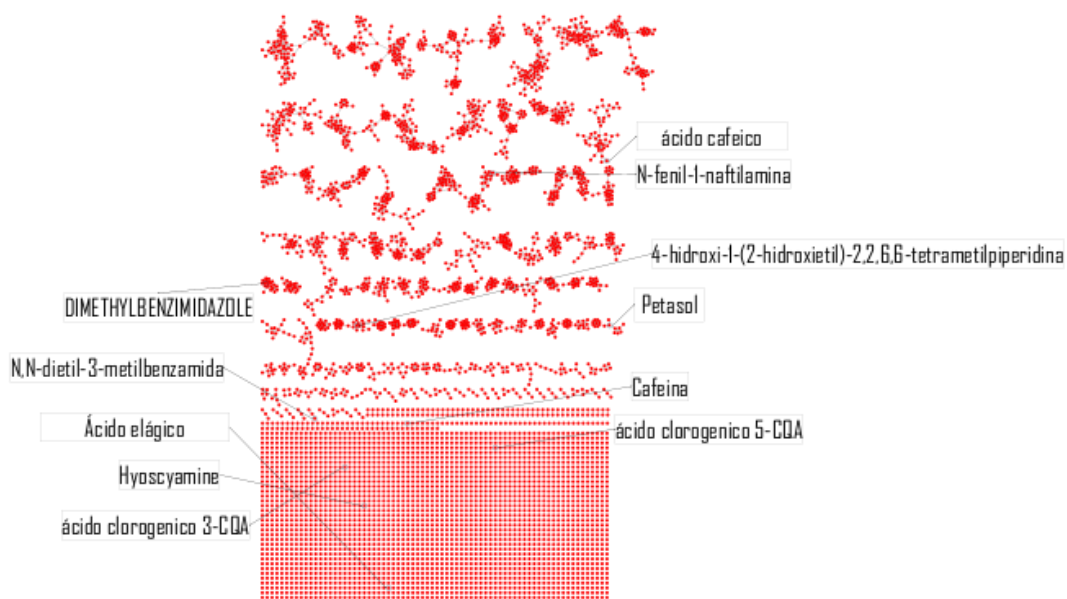


Figura 13. Red molecular

Los resultados de la **Figura 13** expresan que en la red molecular no se encuentren metabolitos enlazados, estos tendrían una similitud o podrían compartir alguna característica semejante.

Los metabolitos que se identificaron con la herramienta dereplicator+, los cuales a su vez para poder identificar cual metabolito tiene un buen mach o semejanza se utilizó los resultados de la herramienta MS2LDA para ver los motif y deducir que metabolito se parece a su espectro en librería.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Verificación

Linealidad

Las curvas de calibración muestran coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0.99, cumpliendo con los parámetros establecidos para la verificación del método. La linealidad es fundamental para la confiabilidad del método en un rango específico de concentraciones. Esta consistencia en los resultados refuerza la capacidad del método para generar resultados precisos y confiables. Podemos comparar esta linealidad con los criterios establecidos en la literatura, como se sugiere en el documento "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods" (Eurachem, 2016) [30].

Selectividad

Como se pudo observar en la **Figura 1**, no existen picos en los cromatogramas del blanco control en los tiempos de retención que se presenta el CGA. Dado que existe una gran variedad de CGA existente en la mayoría de hojas empleadas en la infusión [31–33], se decidió emplear la identificación del analito presente en las muestras para poder evaluar la selectividad de acuerdo a Abraham J. 2010 [34] el cual discute que la selectividad del blanco matriz se puede evaluar mediante la detección del analito en varias especies en este caso de hojas de infusión, dando lugar a un blanco matriz que necesite la presencia del analito para su cumplimiento con lo establecido para la verificación del método.

Para esto se utilizó muestras preparadas con el mismo tratamiento de muestra para manzanilla (*Chamaemelum nobile*) [35] y cilantro (*Coriandrum sativum*) [36], los cuales se encontraron CGA en los estudios de: para manzanilla y para cilantro donde destacan la capacidad antioxidante de estas dos plantas y la concentración de CGA.

Dado que se observa que el blanco reactivo no muestra señal, denota que no existe presencia de metabolitos que puedan afectar al estudio en cuanto al tratamiento de muestras y el blanco matriz muestra que lo que estamos viendo es en verdad nuestro analito CGA el cual está presente en la mayoría de plantas que se usan para infusión y varias más.

Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

Los valores de LOD y LOQ son críticos para determinar la sensibilidad del método [37]. En comparación con los requerimientos de sensibilidad, estos valores indican que el método es suficientemente sensible para detectar y cuantificar ácido clorogénico en las muestras [30].

Precisión

La variabilidad en la precisión, especialmente en concentraciones bajas, se refleja en los coeficientes de variación. La variabilidad observada en la precisión, especialmente a bajas concentraciones, plantea interrogantes sobre la confiabilidad del método en estos rangos. Aunque esta variabilidad puede ser aceptable dependiendo del contexto específico del estudio, es crucial considerar métodos para mejorar la precisión, como optimizar las condiciones de análisis o aumentar el número de réplicas en concentraciones bajas.

Como se observa en las cartas control la característica principal de la precisión es ver la variabilidad de las concentraciones a través del tiempo para evaluar la degradación del analito [38] por esto se recurre a las gráficas de medios y rangos en donde estos se deben encontrar dentro de los límites para su cuantificación [39] esto nos transmite una seguridad del equipo y de la muestra para evaluar el componente a diferentes días, para poder conocer cuánto del analito se volatiliza y poder realizar las correcciones para estos casos [40].

Veracidad

Los porcentajes de recuperación están dentro del rango aceptado de 90-110% [30]. La veracidad del método, demostrada por la recuperación de los porcentajes dentro del rango aceptable, es esencial para asegurar que el análisis refleje con precisión la concentración del analito en la muestra.

La integración de los aspectos de linealidad, selectividad, LOD, LOQ, precisión y veracidad confirma que el método es confiable y aplicable.

Análisis de cuantificación del ácido clorogénico (5-CQA) por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC-Uv-vis

Cuantificación de CGA

Como se muestra en la **Tabla 10**, existe una notable variación en las concentraciones de CGA (ácidos clorogénicos) en relación con diferentes factores ambientales y de cultivo.

Sin embargo, para comprender plenamente estos cambios, es crucial realizar un análisis estadístico detallado. Nuestro estudio comparó las muestras con altas concentraciones de CGA, influenciadas por factores como sombra, edad joven de las plantas y ubicaciones. Al comparar nuestros datos con los resultados de Cárdenas T. et al. 2020 [21], encontramos que las concentraciones acumuladas de 5-CQA fueron de 8 mg/L. Según Craig, et al. 2016, [17], las concentraciones de CGA pueden variar significativamente según el método de extracción utilizado, como se observa en el caso de Cárdenas T, et al. 2020 [21] que empleó un método de extracción con hojas secas, por lo cual sus concentraciones serían más bajas donde obtuvo, esto porque la molécula de CGA es muy volátil y se trabaja mejor en una hoja húmeda, esto visto por nuestros resultados que nos dan una mayor concentración del CGA 5-CQA trabajado en hoja húmeda mediante el método verificado en laboratorio. Por lo tanto, se procedió a

realizar los análisis estadísticos para obtener una gran cantidad de CGA de acuerdo a los factores planteados.

Supuestos de estadística y métodos de arreglo de datos

En primera instancia el resultado para poder medir la normalidad dentro de los datos se realizó con el test Shapiro-Wilk el cual nos dio un e-value por debajo del alfa propuesto ($\alpha=0.05$), esto debido a varios factores como lo explica Da Silva, 2022 [42], el cual dice que los datos que no cumplen con el test de Shapiro-Wilk puede ser porque se lo está realizando con la familia gaussiana y los datos recolectados no pertenezcan a esta, esto debido a la complejidad o aleatoriedad en CGA al ser un metabolito complejo [43] los datos posiblemente no se podrían tomar como un conjunto de datos normales debido a la cantidad de muestra empleada, lo que podría hacer que los datos no integrasen completamente el modelo gaussiano normal. Lo que nos conlleva a realizar un estudio amplio de los diferentes modelos generalizados para poder ajustar los datos y realizar el análisis estadístico pertinente [25,26,44,45]. Este modelo estadístico fue sustentando por las pruebas de histograma donde se aprecia una forma y distribución de datos de manera que el GLM gamma se acopla bien a los datos, siendo también corroborado por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene.

El resumen del modelo GLM proporcionó información cruciales sobre la importancia de los predictores y la calidad del ajuste del modelo. Sin embargo, el análisis de residuos indicó problemas, como la heterocedasticidad y la autocorrelación, identificados mediante las pruebas de Breusch-Pagan y Durbin-Watson, respectivamente siendo estos problemas relacionados con el ‘enlace’ de la familia [44].

Estos problemas señalaron que el modelo inicial necesitaba refinamiento, conduciendo a la implementación de los diferentes enlaces [45] para mejorar el ajuste del modelo y satisfacer los supuestos estadísticos, se probaron las funciones “identity” “inverse” y “log” siendo esta última la que mejor resultados daba al momento de realizar los supuestos, esto se verificó mediante los gráficos de supuestos como se contempla en la

Figura 12. Esto garantizó que el modelo final cumpliera con los requisitos de los GLM y permitiera una interpretación correcta de los resultados estadísticos.

Resultados de incidencia de factores finales

Siendo la edad de la planta, un factor manejable en un entorno controlado, y que es especialmente crítica en el sistema agroforestal chakra [10]. Este sistema, caracterizado por su enfoque en la biodiversidad y la sostenibilidad, permite un control efectivo sobre la edad de la planta [12]. Viéndose directamente relacionada con la concentración de CGA como se puede ver en la **Tabla 11**.

Aunque la ubicación también emerge como un factor diferenciador significativo, su manipulación resulta más compleja. Al realizar un análisis cualitativo del suelo, en cómo se distribuyen la guayusa dentro del sistema agroforestal [46,47], se evidencian ciertos componentes físicos y biológicos que son intrínsecos a la chakra y escapan a un control directo. Estos factores, inherentes a la naturaleza del suelo y a la integridad orgánica de la chakra, limitan la capacidad de manejar el factor de ubicación de manera efectiva para maximizar la producción de CGA. Además hay que tener en cuenta que la ubicación de las chakras es en diferentes altitudes, lo que apoya a que tengan una producción mas alta de metabolitos secundarios mientras mas latitud tenga la ubicación [71].

En cambio, la gestión de la edad de las plantas de *Ilex guayusa* es más viable. En etapas tempranas de crecimiento, estas plantas tienden a concentrar la producción de metabolitos, incluyendo un aumento en la concentración de CGA, lo que sugiere una correlación directa entre la edad de la planta y la síntesis de estos compuestos [48]. En estudios acerca de las edades nos muestran la cantidad de metabolitos en relación a las edades de estas [49], viéndose más afectadas las plantas jóvenes con altos porcentajes de metabolitos con propiedades bioactivas.



Figura 14. Talag imagen geográfica, se observa ciertas variables como la aglomeración de plantas en un solo lugar.



Figura 15. Alto Pano imagen geográfica, existe una distribución de plantas menos sesgada.



Figura 16. Alto Tena imagen geográfica, se observa una organización de plantas muy juntas lo que causaría conflictos con los nutrientes o la luz que recibe.

Las **Figuras 14-16** referentes a las chakras demuestran la manera en la que estas están sujetas a una manera agroforestal que se liga este comportamiento al factor exposición, debido a la gran cantidad de diversas constantes que este recibe diariamente en estos sectores como, por ejemplo: Se observa que los árboles que opacan la luz en la mayoría de guayusa, factores climáticos ayudarían a que este factor exposición pueda tener una complejidad de pronóstico alta. Sin embargo, el factor exposición, a pesar de no mostrar diferencias estadísticas significativas, revela tendencias interesantes. Como se muestra en la **Tabla 12** las concentraciones más elevadas en capacidad antioxidante de la familia *Ilex* se observaron en plantas cultivadas en la sombra [24,50–52]. Esta observación, a

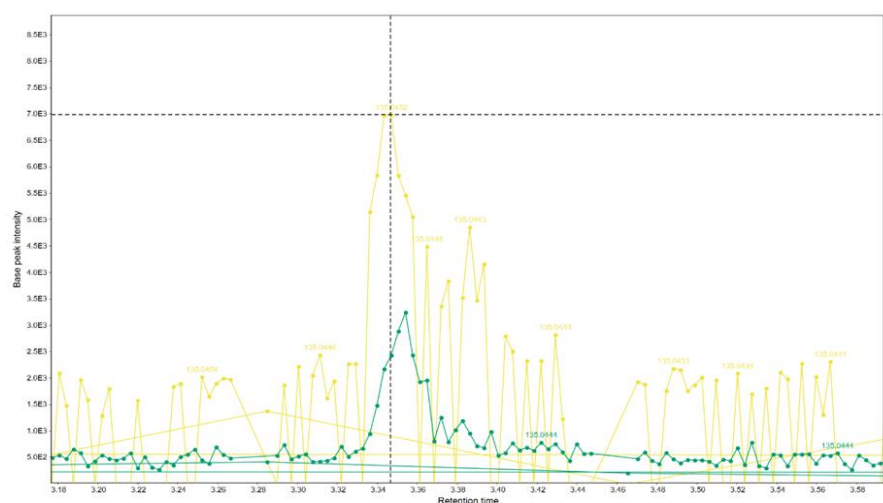
pesar de la falta de significancia estadística, es consistente con las diferencias en las medias representadas en la gráfica. Esta tendencia se alinea con los hallazgos de Gómez (2015), [53] quien sugiere que la actividad antioxidante en la guayusa es más prominente en hojas que crecen en condiciones de oscuridad. Según estudios realizados en plantas [54–56] la falta de exposición a la luz provoca un estrés oxidativo en las plantas, lo que a su vez estimula la producción de compuestos con propiedades antioxidantes. Esto sugiere que la guayusa, al enfrentarse al estrés oxidativo resultante de la menor exposición a la luz, incrementa la síntesis de compuestos como el CGA, que juegan un papel crucial en la respuesta antioxidante de la planta.

Análisis del perfil de ácidos clorogénicos por UPLC-MS/MS

Identificación de Ácidos clorogénicos

Al realizar la identificación de ácido clorogénico y neoclorogénico en las muestras FAST DDA de *Ilex guayusa*, en donde se observó una fragmentación de los analitos. Esta fragmentación está influenciada por la técnica de ionización y los métodos de fragmentación empleados en la espectrometría de masas [57,58]. En la espectrometría de masas, la fragmentación se produce generalmente a través de un proceso conocido como colisión inducida por disociación (CID), en el cual un ion precursor es aislado y luego colisiona con un gas, causando su fragmentación [57]

Después de la ionización, el ion molecular retiene el exceso de energía de ionización, lo que puede provocar que la molécula se fragmente si esta energía excede la requerida para romper un enlace químico [57,59]. La energía de colisión aplicada en el estudio fue de (10, 20, 40 eV) lo cual influyó significativamente en este proceso, afectando directamente la fragmentación del ácido clorogénico.



Los ácidos clorogénicos identificados en las diferentes condiciones muestran una tendencia a tener una abundancia relativa más alta en cuanto a las muestras de Alto Pano con factores de oscuridad y edad joven, esto se debe a que los ácidos clorogénicos engloban parte de los compuestos antioxidantes vitales de una planta [49], dando lugar a que se produzcan en masa en una edad joven de la planta por el desarrollo que esta debe tener a inicios tempranos de su vida y en la oscuridad por los desequilibrios energéticos que tiene y para su adaptabilidad a este factor se crean compuestos antioxidante que ayudan a la planta [48], la chakra afectaría los compuestos debido a sus concentraciones tanto de materia orgánica como metales pesados [51].

Los CGA, son compuestos con múltiples enlaces susceptibles a la fragmentación, debido a que se compone de una estructura central de ácido quínico esterificado con ácido caféico [60]. El ácido quínico posee un anillo de ciclopentano con un grupo hidroxilo en cada carbono [61], mientras que el ácido caféico [62] es un ácido fenólico con una estructura de ácido cinámico que incluye un grupo hidroxilo y un grupo metoxi. El enlace éster que une ambos ácidos es particularmente susceptible a la fragmentación debido a su facilidad para romperse bajo condiciones de energía de colisión en la espectrometría de masas [57–59,63]

Estas energías de colisión pueden haber sido suficientes para causar una fragmentación significativa de los CGA, resultando principalmente en la detección de iones producto.

Los demás metabolitos presentes en la **Tabla 13**. representan una alta gama de diferentes familias, en la bibliografía revisada se ha encontrado que la cafeína, ácido elágico, hyoscyamine, petasol, ácido cafeico, ácido clorogénico son metabolitos que se han encontrado en plantas, en la guayusa se han identificado todos menos el petasol y hyoscyamine [23,64–67].

Los principales metabolitos de interés investigativo encontrados en las muestras analizadas son el Ácido clorogénico, Ácido neoclorogenico, cafeína, Ácido cafeico, Ácido elágico, dado que estas tienen propiedades bioactivas que pueden aumentar el interés

por la planta. La cafeína al ser uno de los principales componentes en los productos de guayusa [8], los ácidos clorogénicos siendo los metabolitos con mayor presencia en capacidad antioxidante [22], el ácido cafeico con capacidad antioxidante y ser intermediario en la biosíntesis de lignina y el ácido elágico al ser igual un antioxidante presente en la mayoría de plantas [68].

Redes moleculares

De acuerdo con los resultados obtenidos, la **Tabla 2 en los anexos** revela que, utilizando la herramienta GNPS Dereplicator+, se lograron identificar coincidencias con los compuestos listados. Sin embargo, fue necesario realizar una identificación más precisa utilizando 'motifs', los cuales permitieron identificar diversas familias de compuestos, como terpenoides, policétidos, aminas, y alcaloides. Estas familias son las más relevantes en relación con la guayusa, según los metabolitos identificados en la referencia [8], y están representadas por los 'motifs' con la denominación Sulfangolide_A_Sulfangolide_A 572.3128_1.5, Angiolam_A_9',10'-Dihydro 322.3128_3.5, 1-Benzyl-(R)-Propylamine 452.9812_1.8, Motuporamine_C_9Z,10-Didehydro 651.1124_2.5, característicos de las familias encontradas en los metabolitos de Dereplicator+.

Los metabolitos descubiertos no muestran una relación directa en los clústeres, ya que presentan una diversidad compleja [58]. Las relaciones entre ellos son tales que los algoritmos utilizados podrían indicar que, aunque un metabolito pertenezca a un clúster [59], no es posible determinar con exactitud con qué otros comparten propiedades. Esto se debe al método de extracción empleado, que se centra en un tipo específico de metabolito, resultando en un método selectivo. Esta selectividad puede causar que otros metabolitos, que comparten propiedades con el identificado, no estén presentes [69]. Sin embargo, este método es válido para identificar, en este caso, una mayoría de metabolitos antioxidantes. La molécula principal bajo estudio es el ácido clorogénico, conocido por su actividad antioxidante. El método de extracción, específico para esta

molécula, facilita la identificación de otros metabolitos con funciones antioxidantes similares, pero que no necesariamente comparten el mismo clúster.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

La verificación del método proporcionó una base sólida para la interpretación de los resultados. La correlación entre los cambios de las concentraciones de CGA y los metabolitos identificados, principalmente antioxidantes, valida la eficacia del procesamiento de las muestras para el estudio de CGA en *Ilex guayusa*.

La presente investigación ha recopilado información esencial respecto a la evaluación de factores clave y la concentración de ácidos clorogénicos en *Ilex guayusa*. Se ha identificado que la edad de la planta y su ubicación geográfica son factores de diferencia significativa. Específicamente, se encontró que las plantas jóvenes situadas en la región del Alto Plano bajo condiciones de sombra presentan las concentraciones más altas de CGA.

Dada la variabilidad climática y la disposición de las chakras en un sistema agroforestal, que dificultan un control efectivo sobre la exposición lumínica de la guayusa y los resultados que muestran la baja fluctuación de variabilidad de CGA en cuanto al factor exposición se concluye que este factor en campo no amerita una intervención, pero para aplicaciones industriales que no contemplen este sistema agroforestal la luz es un factor a tomar muy en cuenta ya que los resultados y bibliografía demuestran un comportamiento más asertivo a la concentración alta en sombra.

La aplicación de redes moleculares ha sido crucial para entender las similitudes entre los metabolitos identificados y para explorar posibles nuevos metabolitos presentes. Este enfoque ha demostrado ser una herramienta valiosa para descubrir metabolitos no identificados previamente.

La identificación de los metabolitos encontrados refuerza la práctica de la extracción al querer sólo identificar compuestos de actividad antioxidante, ya que estas funciones tuvieron un mayor impacto en la cantidad de metabolitos que se lograron identificar.

Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios adicionales en la ubicación que mostró la mayor concentración de CGA. Estos estudios deberían efectuarse bajo condiciones controladas de exposición a la luz, para obtener resultados más precisos sobre el impacto de este factor.

Considerando la significativa influencia de la ubicación de la chakra en la concentración de CGA, se sugiere implementar Índices de Calidad de Suelo (SQI) para comparar las chakras seleccionadas. El objetivo sería identificar las propiedades específicas del suelo que favorecen la producción de CGA.

Para futuras investigaciones, se recomienda procesar las muestras en polaridad negativa. Correlacionando la abundancia de estos con la intención de conocer la mejor manera de tener todos los CGA en mayor cantidad.

REFERENCIAS

1. 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
2. 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
3. Wise G, Negrin A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60: 2393–2404. doi:10.1080/10408398.2019.1643286
4. Quijano Velasquez JF. Propuesta de industrialización de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) para otorgarle valor agregado. 2023 [cited 8 Nov 2023]. Available: <http://tesis.usat.edu.pe/handle/20.500.12423/6171>
5. Villacís Chiriboga J. Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (*Ilex Guayusa* Loes). *Etnobiología*. 2017;15: 79–88.
6. Gallegos M, Alejandro V. Composición y análisis químico de la especie *Ilex guayusa* Loes. bachelorThesis, Quito, 2014. 2014. Available: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3269>
7. Chaves-Ulate EC, Esquivel-Rodríguez P. Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agron Mesoam*. 2019; 299–311. doi:10.15517/am.v30i1.32974
8. Radice M, Vidari G. Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *Granja Rev Cienc Vida*. 2007; 3–11.
9. Meléndez Á. Casi toda la guayusa del mundo está en Ecuador, que hoy busca exportarla más y mejor. In: Bloomberg Línea [Internet]. 22 Aug 2022 [cited 1 Nov 2023]. Available: <https://www.bloomberglinea.com/2022/08/20/casi-toda-la-guayusa-del-mundo-esta-en-ecuador-que-hoy-busca-exportarla-mas-y-mejor/>
10. Coq-Huelva D, Higuchi A, Alfalla-Luque R, Burgos-Morán R, Arias-Gutiérrez R. Co-evolution and bio-social construction: The Kichwa agroforestry systems (chakras) in the Ecuadorian Amazonia. *Sustainability*. 2017;9: 1920.
11. Jadán O, Günter S, Torres B, Selesi D. Riqueza y potencial maderable en sistemas agroforestales tradicionales como alternativa al uso del bosque nativo, Amazonia del Ecuador. *Rev For Mesoam Kurú*. 2015;12: 13–22.
12. Regalado Bolaños JM. Etnoecología de la chakra kichwa para la conservación de las prácticas tradicionales y el fomento del turismo comunitario. Limoncocha, Sucumbíos, Ecuador. masterThesis, Quito: Universidad Tecnológica Indoamérica. 2020. Available: <https://repositorio.uti.edu.ec/handle/123456789/1848>

13. Marin G. C, Puerta Q. GI. Contenido de ácidos clorogénicos en granos de *coffea arabica* l y *c canephora* según el desarrollo del fruto. Chlorogenic acid content in *coffea arabica* l and *c canephora* beans according to fruit development. 2008 [cited 8 Nov 2023]. Available: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/60>
14. 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
15. Freitas Alvarado L, Zárate Gómez R, Bardales Lozano R, Del Castillo Torres D. Efecto de la densidad de siembra en el desarrollo vegetativo del aguaje (*Mauritia flexuosa* Lf) en plantaciones forestales. *Rev Peru Biol*. 2019;26: 227–234.
16. 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. *Rev Toxicol*. 2005;22: 7–14.
17. Craig AP, Fields C, Liang N, Kitts D, Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 2016;154: 481–485.
18. Guo Y, Simpson JR, Pignatiello JJ. Construction of Efficient Mixed-Level Fractional Factorial Designs. *J Qual Technol*. 2007;39: 241–257. doi:10.1080/00224065.2007.11917691
19. 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
20. *espectrometria_de_masas.pdf*. Available: https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
21. Cárdenas Tavera CF, Castañeda Villate JC, Hernández Roa MJ. Actividad antioxidante de extractos y fracciones de guayusa (*Ilex guayusa* L.). 2020 [cited 17 Dec 2023]. Available: <https://repositorio.juanncorpas.edu.co/handle/001/159>
22. Villacís-Chiriboga J, García-Ruiz A, Baenas N, Moreno DA, Meléndez-Martínez AJ, Stinco CM, et al. Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. *J Sci Food Agric*. 2018;98: 1927–1934. doi:10.1002/jsfa.8675
23. Chillerón Herrera Z. Optimización en la obtención de infusiones de guayusa (*Ilex guayusa*; Loes. 1901) con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. PhD Thesis, Universitat Politècnica de València. 2020. Available: <https://riunet.upv.es/handle/10251/147816>
24. Cayuela, L. (2009). Modelos lineales generalizados (GLM). Materiales de un curso del R del IREC.

25. Dunn PK, Smyth GK. Generalized Linear Models With Examples in R. New York, NY: Springer New York; 2018. doi:10.1007/978-1-4419-0118-7
26. Wise G, Santander D. Substantial equivalence application for the approval of guayusa leaf tea (*Ilex guayusa* Loes.) for use as a dry leaf infusion. Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2017. doi:10.13140/RG.2.2.25111.42406
27. Wang Y, Wen J, Zheng W, Zhao L, Fu X, Wang Z, et al. Simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and geniposide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of Reduning injection. *Biomed Chromatogr.* 2015;29: 68–74. doi:10.1002/bmc.3241
28. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics.* 2018;14: 72. doi:10.1007/s11306-018-1367-3
29. Delange DM, Canavaciolo VG. Acercamiento a la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica cubana. *Rev CENIC Cienc Quím.* 2005;36: 21–23.
30. Morillas PP, Terra AI, Uribe C, Mastromonaco G, Prieto JL, Torres M. Guía Eurachem: La Adecuación al uso de los Métodos Analíticos—Una Guía de Laboratorio Para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. *Esp Eurolab Esp.* 2016;66.
31. Castro Juárez CJ, Villa Ruano N, Ramírez García SA, Mosso González C. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Rev Cuba Plantas Med.* 2014;19: 101–120.
32. Reyes IEC, Pérez JJR, González RP. Plantas medicinales de interés estomatológico. 16 Abril. 2014;53: 79–98.
33. Muñoz Jáuregui AM, Ramos-Escudero DF, Alvarado-Ortiz Ureta C, Castañeda Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú.* 2007;73: 142–149.
34. Abraham J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Tietje C, Brouder A, editors. *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes.* Brill | Nijhoff; 2010. pp. 1041–1053. doi:10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897
35. Solano, Y. H. EFECTIVIDAD DE LA TINTURA DE MANZANILLA EN EL TRATAMIENTO DE GINGIVITIS CRÓNICA EN PACIENTES ANGOLANOS.
36. Torres-Aguirre GA, Muñoz-Bernal ÓA, Álvarez-Parrilla E, Núñez-Gastélum JA, Wall-Medrano A, Sáyago-Ayerdi SG, et al. Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a

- espectrometría de masas. *TIP Rev Espec En Cienc Quím-Biológicas*. 2018;21. doi:10.22201/fesz.23958723e.2018.2.4
37. Castillo Aguilar B, González Hernández R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev Cuba Farm*. 1996;30: 0–0.
 38. Payares Gómez FJ. Validación de un método analítico para la determinación de metales pesados en muestras de agua natural mediante espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). 2023 [cited 17 Dec 2023]. Available: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/7192>
 39. Zavaleta Cruz HJ. Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de Dextrometorfano bromhidrato 7, 5 mg en pastilla dura para chupar. 2021 [cited 17 Dec 2023]. Available: <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3071306>
 40. Pretelt Vega F, Socarrás Galindo S. Validación del método analítico para la determinación de nitritos en agua natural y potable, por espectrofotometría visible en el laboratorio de investigación y calidad ambiental del Centro de Comercio, Industria y Turismo del SENA, Regional Córdoba. 2020 [cited 17 Dec 2023]. Available: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/3041>
 41. Katajamaa, M., Miettinen, J. & Oresic, M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22, 634–636 (2006).
 42. Vancine FR da S Thiago Gonçalves-Souza, Gustavo Brant Paterno, Diogo Borges Provete, Maurício Humberto. Bem-vindos | Análises Ecológicas no R. Available: <https://analises-ecologicas.netlify.app/>
 43. Estrada Meza BC, Luna Peralta AH. Determinación del contenido de ácidos clorogénicos, en especies de café (*Coffea arábica*, *Coffea canephora*) cultivado en Ecuador. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. 2020. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/49248>
 44. RPubS - GLM. [cited 18 Dec 2023]. Available: <https://rpubs.com/JessicaP/459130>
 45. RPubS - Modelos lineales generalizados: Ajuste de un Modelo Lineal usando las Funciones de R: `lm()` y `glm()`. [cited 18 Dec 2023]. Available: <https://rpubs.com/robertrespa/397490>
 46. Mukherjee A, Lal R. Comparison of Soil Quality Index Using Three Methods. *PLOS ONE*. 2014;9: e105981. doi:10.1371/journal.pone.0105981
 47. Reyes EBS, Zabala SAF, Echeverri LFG. Índices de calidad del suelo. Una revisión sistemática: Ecosistemas. 2018;27: 130–139. doi:10.7818/ECOS.1598
 48. Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* 17, 905–908 (2020).
 49. Marín-Garza T, Gómez-Merino FC, Aguilar-Rivera N, Murguía-González J, Trejo-Téllez LI, Pastelín-Solano MC, et al. Composición bioactiva de hojas de café durante

un ciclo anual. Rev Fitotec Mex. 2018;41: 365–372. doi:10.35196/rfm.2018.4.365-372

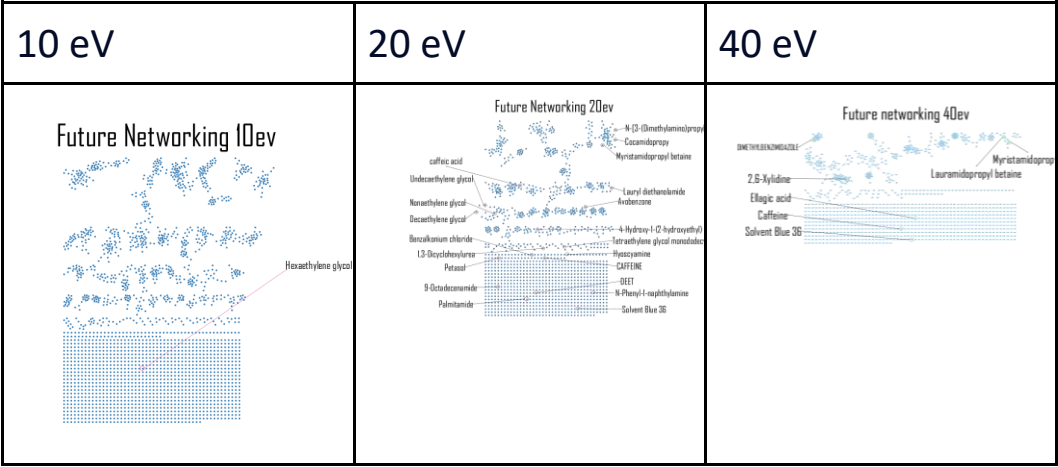
50. Cañar Guapisaca JA. Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa para la elaboración de una bebida energizante con guayusa (*Ilex guayusa*) y pepino dulce (*Solanum muricatum*) en la Provincia de Tungurahua. B.S. thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos 2023. Available: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/39227>
51. Garcia Garcia LM. Efecto de reguladores de crecimiento para la propagación vegetativa de guayusa (*ilex guayusa* L). B.S. thesis, UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL-FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS. 2022. Available: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/63699>
52. Zuñiga Vera KN. Propagación in vitro de *Ilex guayusa* y los efectos de diferentes tratamientos de luces LED en su desarrollo. B.S. thesis, Quito. 2021. Available: <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/11358>
53. Clairand Gómez MI. Diseño de una planta industrial para la elaboración de una infusión acuosa de guayusa, considerando la selección del envase del producto en función del efecto de la luz solar y artificial en la actividad antioxidante de extractos acuosos de *Ilex guayusa* Loes. bachelorThesis, Quito: USFQ, 2015. 2015. Available: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4797>
54. Murube Torcida EM. Estrés oxidativo y respuestas fisiológicas a la acumulación de metales pesados en *Betula celtiberica* micorrizada y no micorrizada cultivada en un suelo contaminado. 2014 [cited 18 Dec 2023]. Available: <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/28018>
55. Hernández-Jiménez MJ, Lucas MM, Swaraj K, Guasch L, Fernández-Pascual M, Felipe M. Senescencia inducida por oscuridad y zinc en plantas de lupino y guisante. 1996 [cited 18 Dec 2023]. Available: <https://digital.csic.es/handle/10261/200190>
56. de Sucre, J. TERAPIA ANTIOXIDANTE PARA CONTRARESTAR EL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR ACTIVIDAD FÍSICA. Versión digital, 48.
57. Greaves J, Roboz J. Mass spectrometry for the novice. CRC Press; 2013. Available: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xc-nAAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=mass+spectrometry+for+the+novice&ots=QyaJ5ez8yr&sig=TN-K4ZS8DtM5xxYaYm8POfSDxb8>
58. Moyo B, Tavengwa NT, Madala NE. Application of the UHPLC-q-TOF-MS and molecular networking in revealing chemo-taxonomical markers of *Viscum combreticola* Engl. and *Viscum album* L. Biochem Syst Ecol. 2023;111: 104720. doi:10.1016/j.bse.2023.104720
59. van der Gugten JG. Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. Clin Mass Spectrom. 2020;15: 36–43.

60. Ramabulana A, Steenkamp P, Madala N, Dubery I. Profiling of Chlorogenic Acids from *Bidens pilosa* and Differentiation of Closely Related Positional Isomers with the Aid of UHPLC-QTOF-MS/MS-Based In-Source Collision-Induced Dissociation. *Metabolites*. 2020;10: 178. doi:10.3390/metabo10050178
61. Behne S, Franke H, Schwarz S, Lachenmeier D. Risk Assessment of Chlorogenic and Isochlorogenic Acids in Coffee By-Products. *Molecules*. 2023;28: 5540. doi:10.3390/molecules28145540
62. Rogozińska M, Lisiecki K, Czarnocki Z, Biesaga M. Antioxidant Activity of Sulfate Metabolites of Chlorogenic Acid. *Appl Sci*. 2023;13: 2192. doi:10.3390/app13042192
63. Meinhart A, Ferreira T, Godoy H. Yerba Mate as an Inexpensive Source of Analytical Standards of Chlorogenic Acid Isomers: an Optimization Study. *Food Anal Methods*. 2023; 1–13. doi:10.1007/s12161-023-02549-7
64. 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
65. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504.
66. Gan R-Y, Zhang D, Wang M, Corke H. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*. 2018;10: 1682. doi:10.3390/nu10111682
67. Sequeda-Castañeda L, Costa G, Celis C, Gamboa F, Gutierrez S, Luengas P. *Ilex guayusa* (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant. *Pharmacologyonline*. 2016;3: 93–202.
68. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 1999;79: 362–372. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D
69. Alfattani A, Marcourt L, Hofstetter V, Queiroz EF, Leoni S, Allard P-M, et al. Combination of Pseudo-LC-NMR and HRMS/MS-Based Molecular Networking for the Rapid Identification of Antimicrobial Metabolites From *Fusarium petrophilum*. *Front Mol Biosci*. 2021;8. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.725691>
70. Liza Ghassan Riachi, Daniel Luiz Reis Simas, Geraldo Ceni Coelho, Paulo Sérgio Marcellini, Antônio Jorge Ribeiro da Silva, Carlos Alberto Bastos de Maria, Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in maté extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), *Food Chemistry*, Volume 266, 2018, Pages 317-322, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.028>.

71. Adhikari, P., Joshi, K., Singh, M., & Pandey, A. (2022). Influence of altitude on secondary metabolites, antioxidants, and antimicrobial activities of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(1), 187-195.

ANEXOS

Tabla 1. Redes moléculas



Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 2. Resultados de Dereplicator+, MS2LDA

Voltaje	Metabolito	Familia	Función
40	Filipin,_INN,_USAN_Filipin _II	Polieno macrólido	funciona como un agente antifúngico y se usa para detectar colesterol en membranas biológicas.
20	oasomycin_a	tetraterpenoide	actividad antibiótica y antifúngica
20	11,12-Dihydroxy-1,3,15- cembratrien-7-one_11,12- Dihydroxy-1,3,15- cembratrien-7-one	cembranoides	actividad biológica, incluyendo efectos antiinflamatorios y citotóxicos
40	Strevertenes_Strevertene_ B	esteroides	Tienen actividad biológica que puede incluir propiedades antimicrobianas
40	Tuscolide_Tuscolide	sesquiterpeno lactona	Estas moléculas suelen tener propiedades antibióticas y antiparasitarias.
20	1,3-Elemadiene- 6,11,12,13-tetrol_1,3- Elemadiene-6,11,12,13- tetrol	sesquiterpenos	Puede jugar un papel en la defensa de las plantas y tener actividad antimicrobiana
40	3,4-Epoxy-2,7,14- trihydroxy-1(15),11- cembradien-16,14- olide_14-Me_ether,_7- octanoyl	cembranoides	Estos compuestos a menudo tienen propiedades antiinflamatorias y citotóxicas
20	2-Propyl-Aniline	amina aromática	Se utiliza como intermediario en la síntesis de polímeros, productos farmacéuticos y tintes.

20	Juvocimene__1",2"-Epoxide	monoterpeno	A menudo participa en la defensa de las plantas y puede tener actividad repelente de insectos
20	Sulfangolide_A_Sulfangolide_A	terpenoide	Conocido por su actividad antiparasitaria.
20	3,8,9,10-Tetrahydro-4,11(13)-germacradien-12,6-olide_8-(2-Methylbutanoyl),_9-Ac	sesquiterpeno lactona	Puede tener actividad antimicrobiana o citotóxica
40	Angiolam_A_9',10'-Dihydro	policétido	Puede tener actividades anticancerígenas y antimicrobianas.
20	1-Benzyl-(R)-Propylamine	amina	Se utiliza como bloque de construcción química en síntesis orgánica.
20	Budmunchiamine_L5_6'-Hydroxy,_N1,N13-di-Me	alcaloide	Tiene actividad biológica que puede incluir propiedades antiparasitarias.
20	8-deoxyamphoteronolide_A	macrólido	Posee actividad antifúngica.
40	3-Hexylpyridine,_9Cl_3-Hexylpyridine,_9Cl	alquilpiridina	Utilizado en síntesis química como bloque de construcción o agente químico.
40	20(29),21-Lupadien-3-ol_20(29),21-Lupadien-3-ol	diterpenoide	A menudo involucrado en la defensa de las plantas y puede tener actividad antimicrobiana.
20	3-n-Butylpyridine	alquilpiridina	Puede utilizarse como bloque de construcción en síntesis química.
20	Polyprenol_Octaprenol	poliisoprenoides	Funcionan como intermediarios en la síntesis de dolícoles, importantes en la glicosilación de proteínas.
20	2-Amino-11,15-hexadecadien-3-ol_15,16-Dihydro	aminoalcohol	Puede funcionar como un precursor en la biosíntesis de lípidos y otros compuestos biológicos.
20	9-Hydroxy-3(15),6-caryophylladien-8-one_9-Deoxy	sesquiterpenoide	Puede tener actividad antimicrobiana y estar involucrado en la defensa de las plantas
20	15-Hydroxy-4,10(14)-cadinadien-3-one_Ac	sesquiterpenoide	Tiene actividad biológica que puede incluir efectos antiinflamatorios y antimicrobianos.
20	Motuporamine_C_9Z,10-Didehydro	alcaloide	Tiene actividad citotóxica y se investiga por sus potenciales aplicaciones contra el cáncer.

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 3. Resultados concentración de CGA en muestras de *I. guayusa*

Chakra	Edades	Condiciones_luz	CGA
A	T0	-	5.688
A	T0	-	5.447
A	T0	-	5.447
A	T0	+	12.568
A	T0	+	11.955
A	T0	+	13.158
A	T1	-	3.618
A	T1	-	3.953
A	T1	-	3.953
A	T1	+	5.055
A	T1	+	5.251
A	T1	+	5.251
A	T2	-	2.475
A	T2	-	2.579
A	T2	-	2.579
A	T2	+	1.803
A	T2	+	1.749
A	T2	+	1.749
B	T0	-	7.333
B	T0	-	7.189
B	T0	-	7.333
B	T0	+	10.113
B	T0	+	10.085
B	T0	+	9.517
B	T1	-	5.361
B	T1	-	5.821
B	T1	-	5.613
B	T1	+	4.531
B	T1	+	4.840
B	T1	+	4.840
B	T2	-	10.191
B	T2	-	10.322
B	T2	-	10.279
B	T2	+	2.62
B	T2	+	2.6
B	T2	+	2.473
C	T0	-	2.443
C	T0	-	2.460
C	T0	-	2.413
C	T0	+	3.593
C	T0	+	3.416
C	T0	+	3.543
C	T1	-	2.763

C	T1	-	2.889
C	T1	-	2.827
C	T1	+	1.949
C	T1	+	1.842
C	T1	+	1.863
C	T2	-	2.017
C	T2	-	2.022
C	T2	-	2.013
C	T2	+	1.391
C	T2	+	1.430
C	T2	+	1.352

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 4. Porcentaje de recuperación datos crudos

Porcentaje de recuperación							
B+0 + 0.4		B+0 + 0.4		B+0+3.6		B+0+3.6	
Amount				Amount			
1	0.1	1	1.898	1	3.593		20.741
2	1.783	2	1.783	2	3.416		21.127
3	1.975	3	1.975	3	3.543		22.944
Promedio	1.879	Promedio	1.885	Promedio	3.517		21.604
	1.819		1.825		1.917		17.650
	0.3638		0.3651		0.3835		3.5300
	90.95		91.27		95.87		98.06
B+0 + 0.4		B+0 + 0.4		B+0+3.6		B+0+3.6	
Amount				Amount			
1	1.888	1	1.902	1	8.631		26.855
2	1.783	2	1.783	2	10.279		26.554
3	1.975	3	1.975	3	10.322		21.124
Promedio	1.882	Promedio	1.887	Promedio	9.744		24.844
	1.822		1.827		2.200		19.304
	0.3644		0.3653		0.4400		3.8609
	91.10		91.33		110.00		107.25
B+0 + 0.4		B+0 + 0.4		B+0+3.6		B+0+3.6	
Amount				Amount			
1	1.834	1	1.875	1	3.593		22.357
2	1.783	2	1.783	2	3.416		22.335
3	1.975	3	1.975	3	3.543		13.158
Promedio	1.864	Promedio	1.878	Promedio	3.517		19.283
	1.804		1.818		1.917		17.703
	0.3608		0.3635		0.3835		3.5407
	90.20		90.88		95.87		98.35

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 5. LOD y LOQ

LDQ, LOQ						
	Amount					
	Std 0,05	Std 0,1	Std 0,2	Std 0,25	Std 0,5	Std 1
	0.053	0.09	0.16	0.27160714	0.50008929	1.01491071
	0.03	0.07	0.142	0.28535714	0.48982143	0.98285714
	0.026	0.069	0.137	0.28339286	0.48098214	0.974375
	0.02	0.064	0.135	0.27491071	0.47026786	0.97598214
	0.018	0.059	0.13	0.27464286	0.466875	0.96508929
	0.019	0.066	0.127	0.28223214	0.46125	0.915625
	0.018	0.062	0.13	0.273125	0.46508929	0.92116071
	0.019	0.061	0.129	0.275625	0.464375	0.92017857
	0.017	0.064	0.129	0.27508929	0.47580357	0.91633929
	0.017	0.063	0.132	0.27232143	0.45946429	0.87223214
Promedio	0.02	0.07	0.14	0.28	0.47	0.95
Desv Std	0.011	0.009	0.010	0.005	0.013	0.043
%CV	46.9874583	13.2174316	7.28963265	1.78292509	2.80765975	4.55455442
%recuperacion	47.4	66.8	67.55	110.732143	94.6803571	94.5875

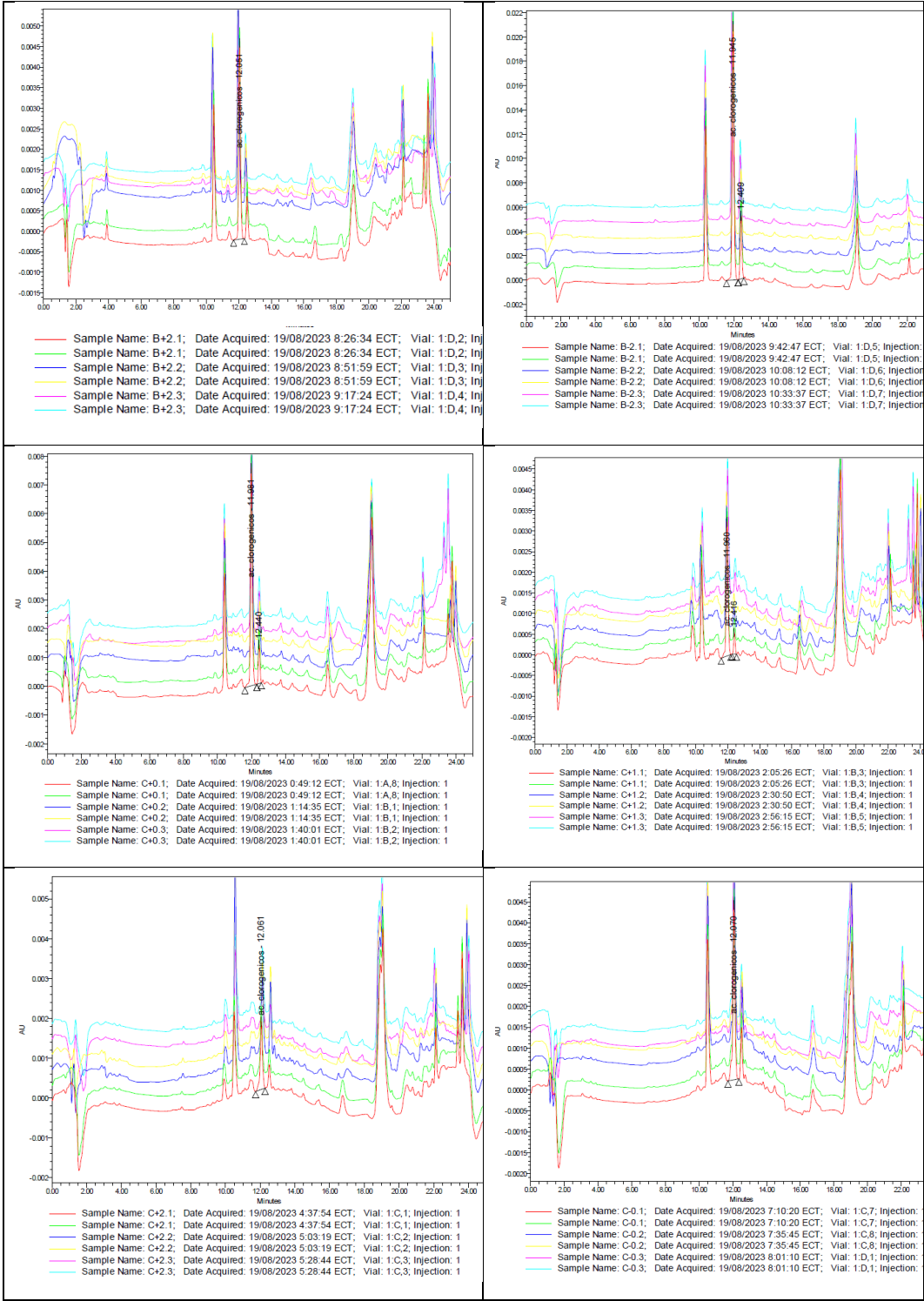
Realizado por: Thomas Garzon, 2024

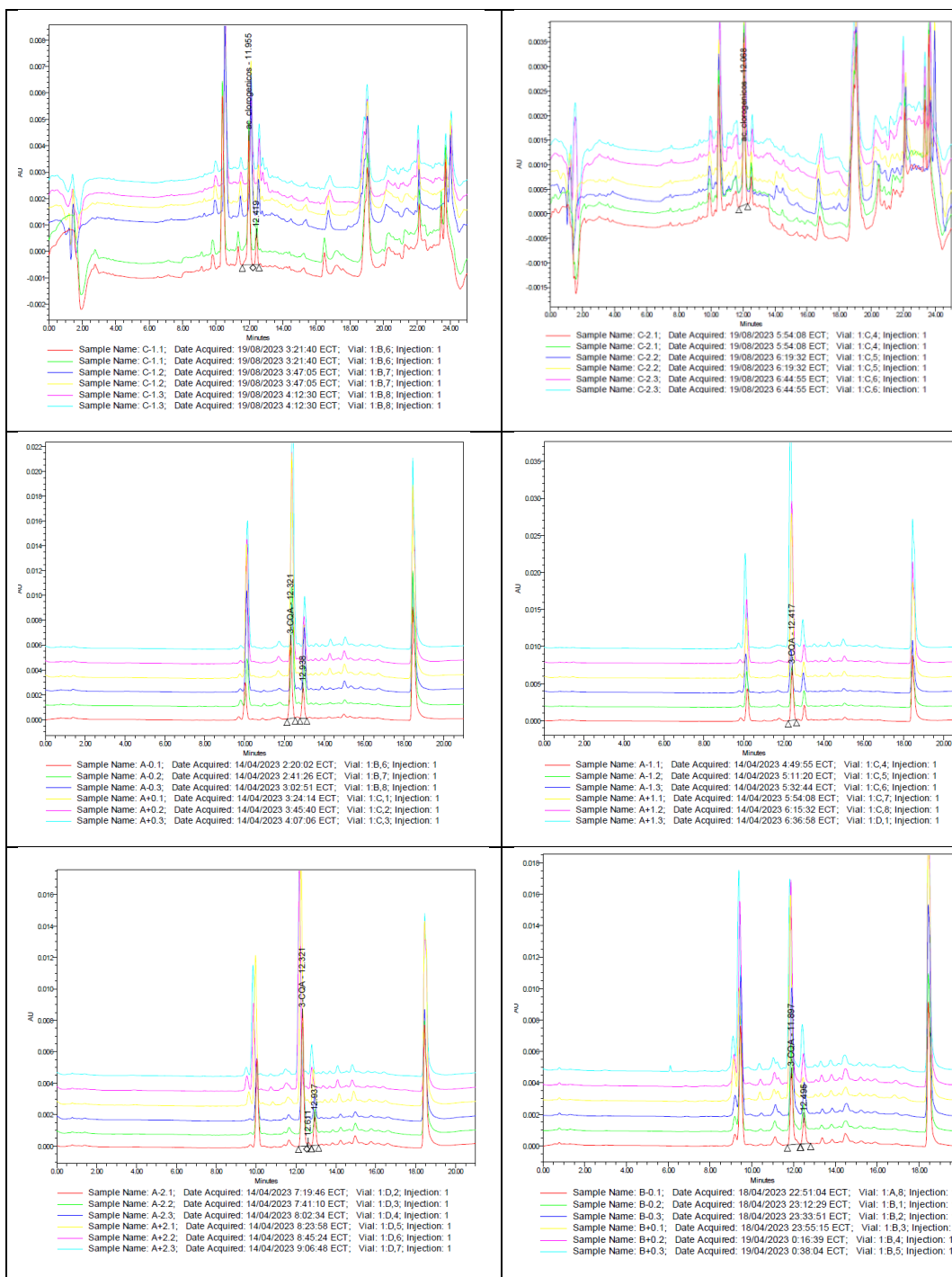
Tabla 6. Datos precisión

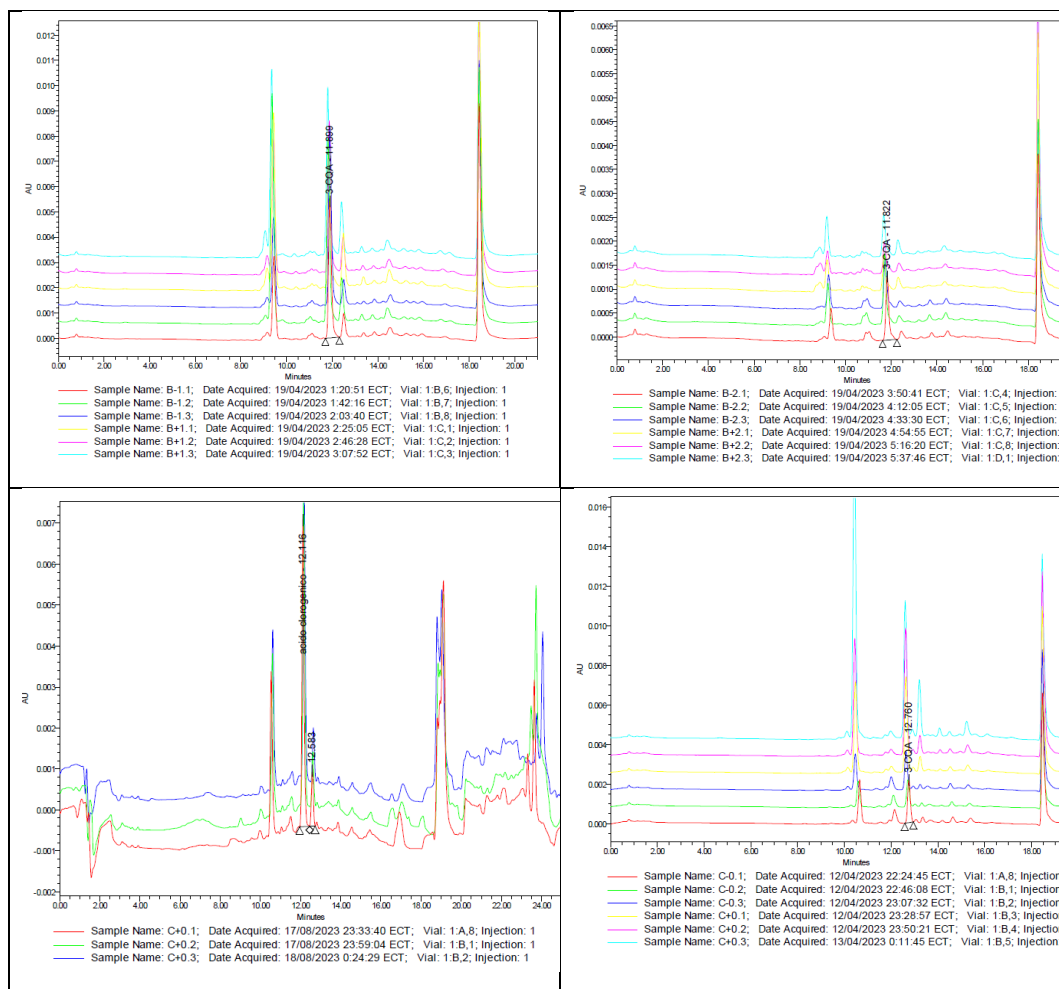
Precesion			
Item	Dia	Cantidad	Concentracion
1	16-ago	Alta	25.027
2	16-ago	Alta	24.348
3	16-ago	Alta	24.193
4	16-ago	Alta	22.357
5	16-ago	Media	3.534
6	16-ago	Media	3.684
7	16-ago	Media	3.379
8	16-ago	Media	3.532
9	16-ago	Baja	0.9
10	16-ago	Baja	0.84
11	16-ago	Baja	0.8
12	16-ago	Baja	0.796
13	17-ago	Alta	23.652
14	17-ago	Alta	22.335
15	17-ago	Alta	21.127
16	17-ago	Alta	20.741
17	17-ago	Media	3.162
18	17-ago	Media	3.707
19	17-ago	Media	3.579
20	17-ago	Media	3.587
21	17-ago	Baja	0.63
22	17-ago	Baja	0.558
23	17-ago	Baja	0.837
24	17-ago	Baja	0.935
25	18-ago	Alta	21.124
26	18-ago	Alta	21.121
27	18-ago	Alta	21.121
28	18-ago	Alta	21.118
29	18-ago	Media	3.812
30	18-ago	Media	3.546
31	18-ago	Media	3.888
32	18-ago	Media	3.908
33	18-ago	Baja	0.523
34	18-ago	Baja	1.1
35	18-ago	Baja	0.65
36	18-ago	Baja	0.909

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 7. Cromatogramas-HPLC

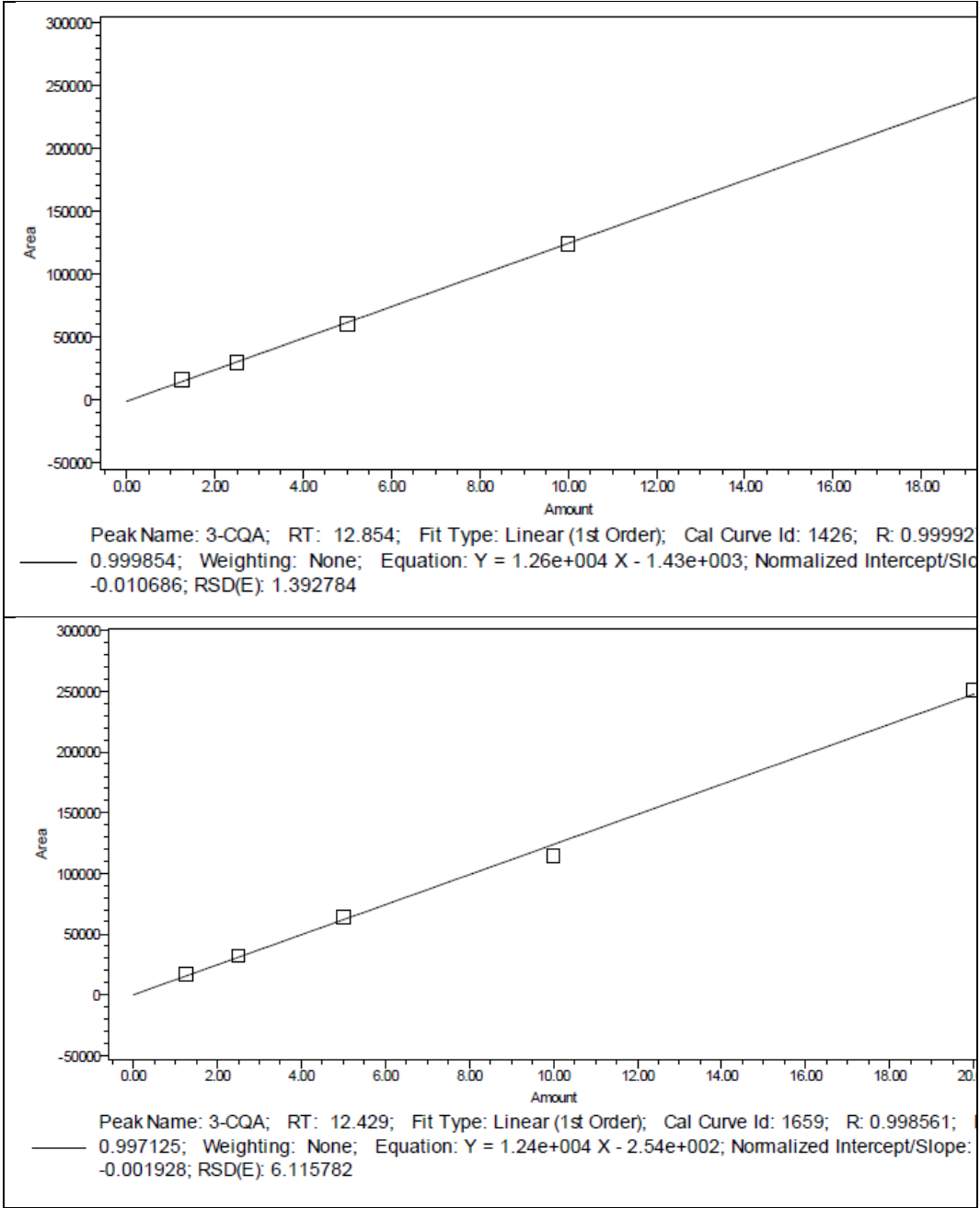


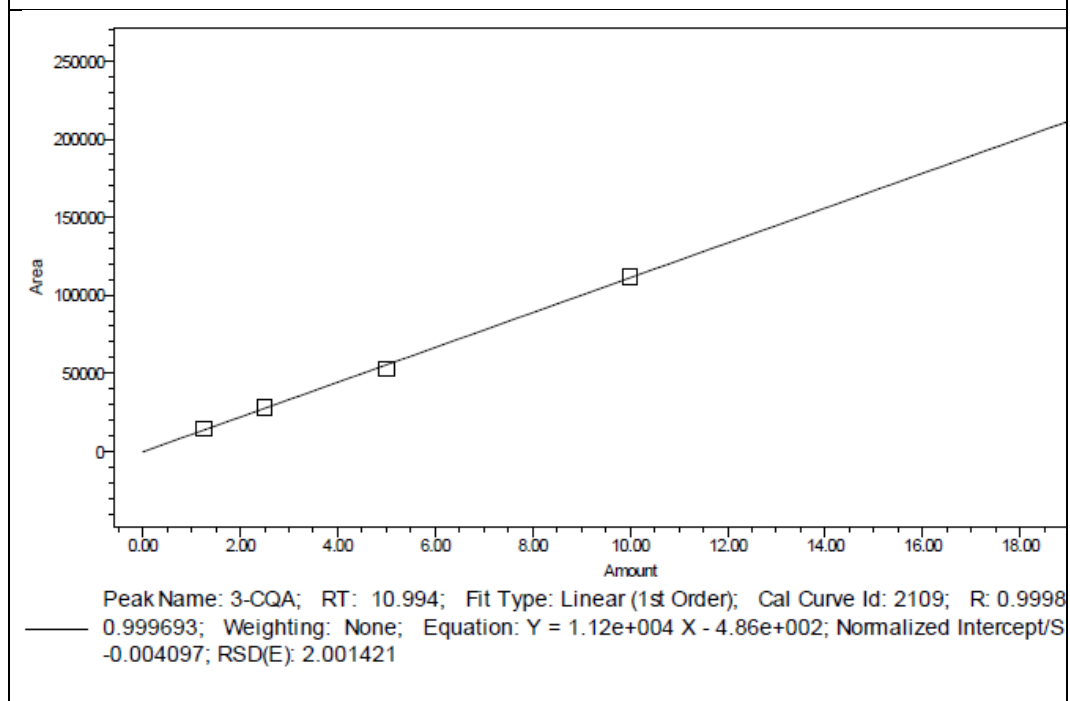
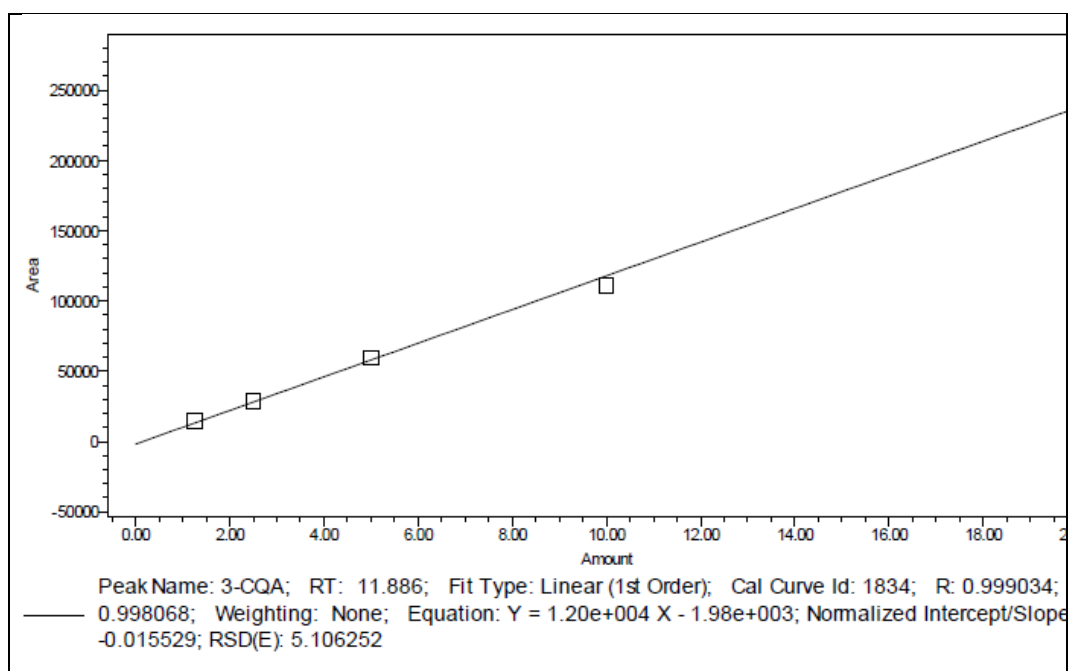


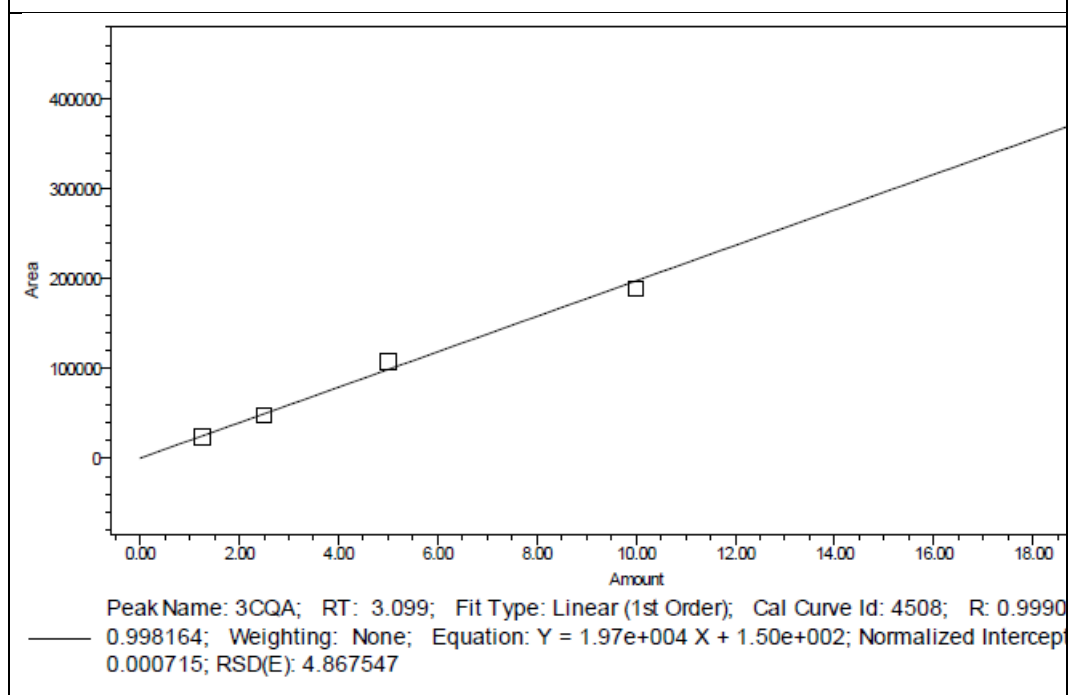
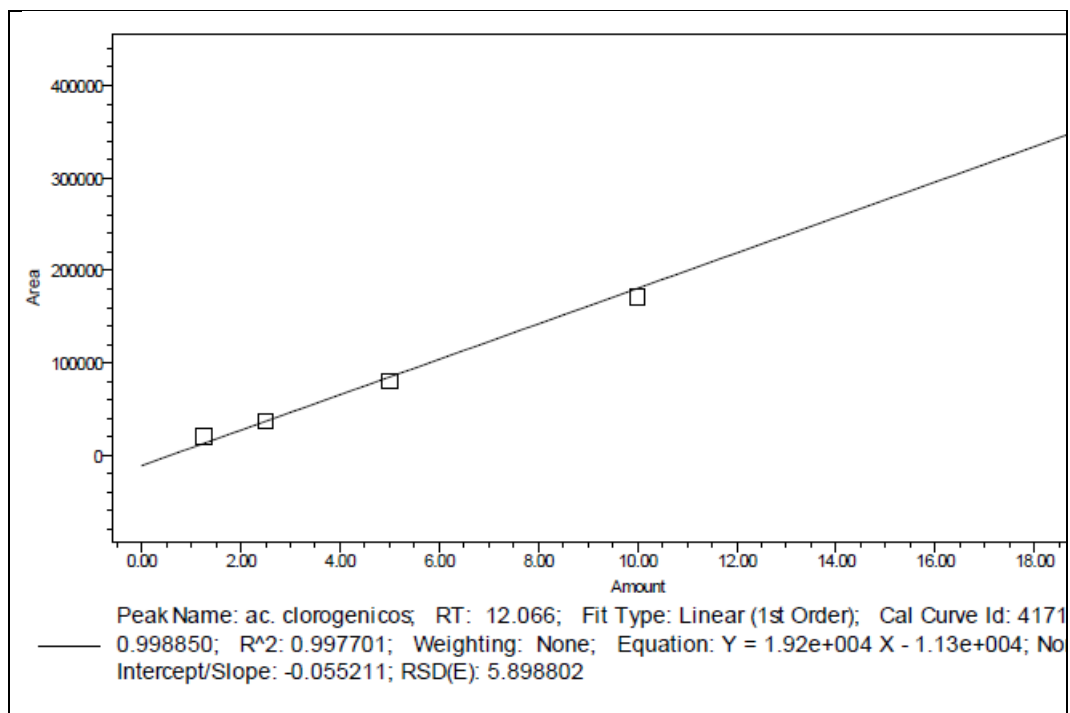


Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 8. Curvas de calibración

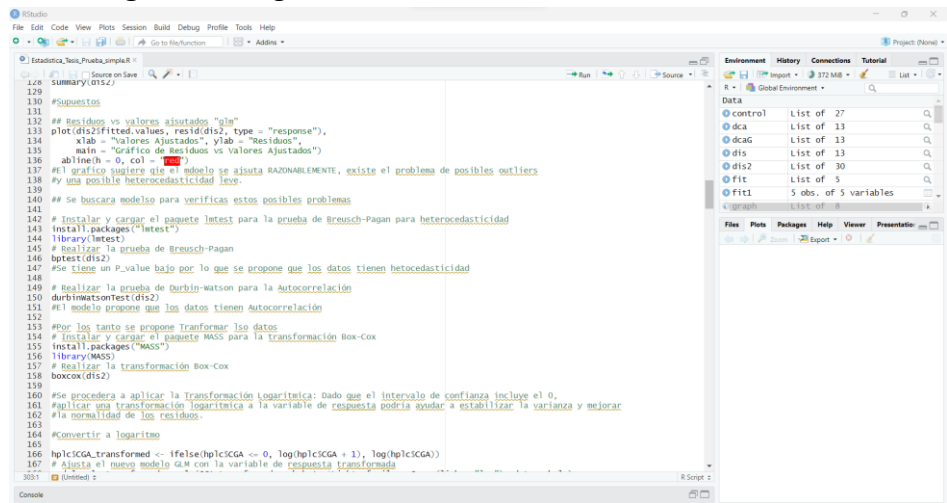






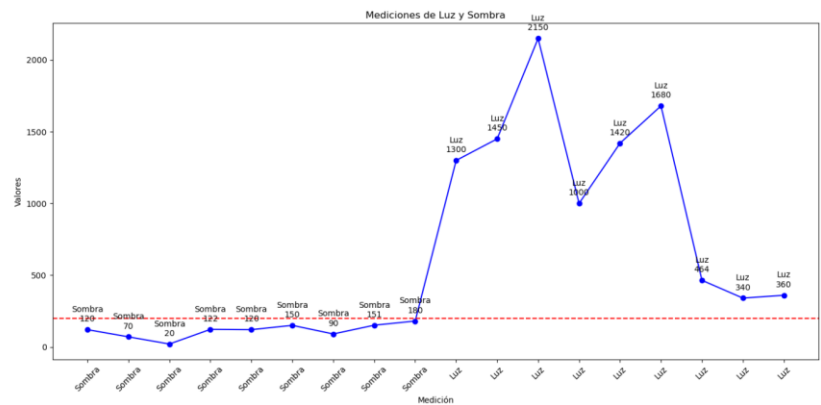
Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Figura 1. Imagen Del ambiente R studio



Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Figura 2. Imagen de datos para la selección de rangos de luz



Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 9. Identificación de metabolitos 40 ev

Metabolite	Formula	RT (min)	Collision ene [eV]	Aducts	Theoretical [M]	Theoretical mass [m/z]	Mass Experimental mass [m/z]	Mass Error [ppm]	Score	GNPS Library Spectrum ID	Comment
2,6-Kyridine	C8H5N3	12.3592	40	1.007825	121.08915	122.09874	122.0987	-2.244379	0.74	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005755194	
Ambenzone	C20H22O3	11.0258	40	1.007825	310.15689	311.164716	311.1651	1.239971	0.76	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000077204	
Benzyltetrahydroxydimethylammonium	C23H42N2	9.0219	40	1.007825	332.33173	333.339504	332.3324	-9021.995	0.86	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000138512	
Benzyltetrahydroxydimethylammonium	C23H42N2	8.2751	40	1.007825	332.33173	333.339504	304.3007	-87114.09	0.78	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000138512	
Benzyltetrahydroxydimethylammonium	C23H42N2	11.4383	40	1.007825	332.33173	333.339504	304.3005	-87115.53	0.76	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000136390	
Myristamidopropyl betaine	C21H42N2O2	7.9415	40	1.007825	370.31955	371.327375	371.3271	-0.740672	0.8	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005726177	
Caffeine	C8H10N4O2	3.4518	40	1.007825	194.08038	195.088208	195.0886	0.391968	0.74	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000365627	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	10.8986	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0921	-0.82283	0.82	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000006882697	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	10.1555	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0921	-0.82283	0.79	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000006882697	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	10.9771	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0922	-0.142984	0.75	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005720583	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	11.4442	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0921	-0.142984	0.71	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005720583	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	10.1525	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0921	-0.82283	0.75	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005720583	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	11.4924	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0922	-0.142984	0.72	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005720583	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	11.2569	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0923	0.336861	0.74	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005720583	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	11.9273	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0922	-0.142984	0.76	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000006882697	
DIMETHYLBENZYLIDAZOLE	C9H10N2	11.8251	40	1.007825	146.0844	147.092221	147.0921	-0.82283	0.72	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000006882697	
Ellagic acid	C14H6O8	4.1935	40	1.007825	302.00626	303.014081	303.0143	0.721633	0.80	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000006370465	
Glycerol 1-oleate	C21H42O8	6.5679	40	1.007825	368.30832	369.316144	369.3272	90.76647	0.76	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000001384242	
Lauroamidopropyl betaine	C19H40N2O2	6.9783	40	1.007825	342.28824	343.296064	343.2958	-0.769108	0.86	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005726523	
N-Phenyl-1-naphthylamine	C16H13N	9.2768	40	1.007825	219.2911	220.288925	220.1126	-800.4262	0.72	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005765543	
Solvent Blue 36	C20H22N2O2	10.4372	40	1.007825	322.16812	323.175948	323.1769	1.09528	0.92	http://gnps.ucsd.edu/ProteomeSpectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005760739	

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 10. Identificación de metabolitos 20 ev

Metabolite	Formula	RT (min)	Collision energy [eV]	Theoretical [M]	Theoretical m/z	Experimental m/z	Error (ppm)	Cosine	GNPS Library Comment
Amphetamine		5.9996	20	1.007825	942.11621	943.12404	965.1061	0.8024.466	0.905836 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000008008.002
Spectral Match to Undecanethiylene glycol from NIST14		4.0794	20	1.007825	502.29889	503.30875	503.3086	3.6718524	0.83805 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003135327
Spectral Match to N-Propyl-L-phenylalanine from NIST14		6.0187	20	1.007825	276.1209	277.12873	299.111	0.803553	0.803553 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003139717
Spectral Match to Palmitylamide from NIST14		10.9284	20	1.007825	295.25611	296.26404	356.2636	-0.5451717	0.800243 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003137937
Spectral Match to Nonanethiylene glycol from NIST14		3.8041	20	1.007825	414.2465	415.25432	415.2557	3.3174082	0.91738 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003136412
Spectral Match to 1-Tryptophan from NIST14		3.0034	20	1.007825	204.08988	205.0977	188.0706	830.03.46	0.89067 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003138038
Spectral Match to Decanethiylene glycol from NIST14		12.6067	20	1.007825	404.29266	405.30048	413.2673	0.811625	0.811625 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003137997
Spectral Match to Decanethiylene glycol from NIST14		3.9489	20	1.007825	458.37371	459.29054	459.285	3.1850209	0.9046 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003137675
Spectral Match to Benzylacetate/dimethylammonium from NIST14		11.8346	20	1.007825	308.21739	309.22521	304.3004	350.03.186	0.763551 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003137084
Spectral Match to Azobenzene from NIST14		11.0249	20	1.007825	310.15689	311.16472	311.1659	3.7935152	0.927083 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003134632
Spectral Match to Azobenzene from NIST14		11.0518	20	1.007825	310.15689	311.16472	311.1653	1.8652761	0.910622 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003134631
Spectral Match to 9-Octadecanamide (Z)- from NIST14		11.1752	20	1.007825	281.27185	282.27968	282.2799	0.7934262	0.716594 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003137650
Spectral Match to 1,3-Dioxolane/diol from NIST14		11.5933	20	1.007825	304.30043	305.30825	304.2997	350.03.186	0.72874 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003135734
Spectral Match to 1,3-Dicyclohexylurea from NIST14		7.0106	20	1.007825	224.18886	225.19669	225.1967	0.0514	0.843867 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003136087
Petrol		9.184	20	1.007825	234.16198	235.1698	335.1703	2.1049815	0.794195 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00011306050
MassBankEU SM876702 Lauryl diethanolamide [N,N-bis(2-hydroxyethyl)doce		8.0687	20	1.007825	287.24604	288.25387	288.2542	1.1484949	0.930593 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000008008.002
MassBank PR300457 Hyoscyamine		3.7505	20	1.007825	289.16779	290.17562	290.1767	3.7265988	0.911511 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005742412
MassBank LU123904 N-Phenyl-1-methylpyrrolidine-1-amine		9.2716	20	1.007825	219.1048	220.11262	220.1127	0.9432293	0.893027 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005746408
MassBank LU071402 N-[3-(Dimethylamino)propyl]doodecanamide		6.8515	20	1.007825	284.28276	285.29059	285.2914	1.5444285	0.887533 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005763071
MassBank LU071402 N-[3-(Dimethylamino)propyl]doodecanamide		14.7728	20	1.007825	284.28276	285.29059	285.2902	-1.3628487	0.854609 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005763071
MassBank LU052903 1,4-Bis[1-isopropylamino]anthraquinone Solvent Blue 36		10.4298	20	1.007825	322.16613	323.17395	323.1737	-0.7827962	0.791143 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005765132
MassBank LU030803 lauryl diethanolamine 1-(2-hydroxyethyl)-2-(6-ethylamino)pyrrolid		6.8511	20	1.007825	273.26678	274.2746	274.2753	3.2053738	0.75988 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005764095
MassBank AU406506 3,6,9,12-Tetraoxatetradecan-1-ol/Tetradethiylene glycol mc		10.5102	20	1.007825	362.30322	363.31105	363.3104	-1.787647	0.734339 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000575343
MassBank AU335306 DIET [N,N-diethyl-3-methylbenzamide		6.6281	20	1.007825	191.13101	192.13884	192.139	0.8369058	0.846486 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005772290
MassBank AU252106 4-Hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidi		0.7353	20	1.007825	201.17288	202.1807	202.1807	-0.0198234	0.847687 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005774329
MassBank AU252106 4-Hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidi		1.3018	20	1.007825	201.17288	202.1807	202.18	-0.4802727	0.774287 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005774329
MassBank Myristamidopropyl betaine/carboxymethyl-dimethyl-3-β-tetradecan		7.9096	20	1.007825	370.31954	371.32737	371.3286	3.3171756	0.803618 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005782601
MassBank Myristamidopropyl betaine/carboxymethyl-dimethyl-3-β-tetradecan		7.9061	20	1.007825	370.31954	371.32737	371.3285	0.3047815	0.872624 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005782601
Cocamidopropyl betaine		6.9641	20	1.007825	342.28824	343.29607	343.2967	1.8405006	0.9411 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000077206
CAFFEINE - 60.0 eV		3.4466	20	1.007825	194.08038	195.0882	195.0884	6.1479787	0.895565 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005884027
CAFFEINE - 50.0 eV		3.4736	20	1.007825	194.08038	195.0882	195.0893	5.63539	0.972608 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005884026
caffeic acid CollisionEnergy:205060		3.3645	20	-17.00274	180.04226	183.03952	183.0397	1.1096764	0.819258 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000010122408
caffeic acid CollisionEnergy:205060		3.3486	20	-17.00274	180.04226	183.03952	183.0397	1.1096764	0.846089 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000010122408
caffeic acid CollisionEnergy:205060		2.9713	20	-17.00274	180.04226	183.03952	183.0397	-1.3437165	0.837001 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000010122408
Benzalkonium chloride (C12)		8.2635	20	1.007825	293.23	294.23783	304.3013	34201.84	0.831852 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003135495
Ala-C15.0		10.7765	20	1.007825	??????????	????ALORI	314.2685	????ALORI	0.700041 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00010010727

Realizado por: Thomas Garzon, 2024

Tabla 11. Identificación de metabolitos 10 ev

Metabolite 2 peaks	Formula	RT (min)	Collision energy [eV]	Theoretical [M]	Theoretical mass	Experimental m/z	Error (ppm)	Cosine	GNPS Library Comment
caffeic acid CollisionEnergy:205060		3.35	10	1.007825	180.04225	181.050077	163.0407	-99471.8	0.74 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000010122408
Spectral Match to N-Lauroyl sarcosine from NIST14		8.9413	10	1.007825	271.21475	272.222577	272.2393	62.165924	0.96 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003139717
Spectral Match to N-Lauroyl sarcosine from NIST14		8.9114	10	1.007825	271.21475	272.222577	272.2393	61.431331	0.96 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003139717
Spectral Match to Hexaethiylene glycol from NIST14		3.2469	10	1.007825	282.16785	283.175672	283.1779	7.8677948	0.81 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000003134614
PHENYLACETIC ACID		2.1808	10	1.007825	136.05243	137.060254	135.0414	-14729.683	0.71 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000678485
MassBankEU SM876702 Lauryl diethanolami		8.0913	10	1.007825	287.24603	288.253858	288.2714	60.85597	0.78 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000084203C
MassBank PR811161 Allcin + 2H (not validat		0.3506	10	1.007825	161.00948	162.017303	165.0551	18749.831	0.74 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005747385
MassBank PR811161 Allcin + 2H (not validat		0.7397	10	1.007825	161.00948	162.017303	165.0545	18744.893	0.73 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005747385
MassBank PR811161 Allcin + 2H (not validat		2.0758	10	1.007825	161.00948	162.017303	165.0516	18728.228	0.72 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005747385
MassBank LU071401 N-[3-(Dimethylamino)pr		6.8284	10	1.007825	284.28278	285.290601	285.3089	64.141504	0.87 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005761881
MassBank KW104704 bis(2-ethylhexyl)amin		7.2793	10	1.007825	241.27695	242.284772	242.3003	64.08974	0.70 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005750247
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		1.293	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0091	-167.91274	0.82 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		2.2556	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0071	-186.09	0.82 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		3.3681	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0068	-188.81659	0.82 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		3.3681	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0102	-157.91525	0.80 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		4.1035	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0194	-74.299846	0.83 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		3.0055	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0071	-186.09	0.80 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		3.4706	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0196	-127.48212	0.82 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		4.5426	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.013	-132.46708	0.81 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		2.5928	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0068	-188.81659	0.80 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		3.3269	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0097	-162.45956	0.83 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		0.8665	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0089	-169.73047	0.79 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank KO003085 Hypotaurine [2-Amino		4.0159	10	1.007825	193.0375	110.027575	110.0197	-71.573257	0.79 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000000218686
MassBank FI000569 Caffeine		3.4465	10	1.007825	194.08038	195.088208	195.107	96.25494	0.85 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000214445
MassBank AU335303 DIET [N,N-diethyl-3-met		6.6279	10	1.007825	191.03012	192.138828	193.1509	62.78256	0.76 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000005772288
Cocamidopropyl betaine		6.9535	10	1.007825	342.288	343.295825	343.3178	64.011755	0.90 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000579927
Cocamidopropyl betaine		7.0075	10	1.007825	342.288	343.295825	343.3177	63.720461	0.89 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000579927
CREATININE		3.0617	10	1.007825	113.1179	114.125725	114.0897	-915.66092	0.76 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB000001577915
[S]-(-)-Pentilic acid CollisionEnergy:102040		5.3121	10	1.007825	166.09938	167.107205	167.0917	-92.784939	0.76 http://gnps.ucsd.edu/ProteoSafety/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB0000010012408

Realizado por: Thomas Garzon, 2024