

Especialización en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
JUAN N. CORPAS

Educación y Salud de Calidad
con Sentido Social

Trabajo de grado

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE GUAYUSA
(*Ilex guayusa* L.)

CAMILA FLORENZA CÁRDENAS TAVERA
JENNY CAROLINA CASTAÑEDA VILLATE
MAYERLY JOHANNA HERNÁNDEZ ROA

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA
VEGETAL
BOGOTÁ D.C
2020

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE GUAYUSA
(*Ilex guayusa* L.)

CAMILA FLORENZA CÁRDENAS TAVERA
JENNY CAROLINA CASTAÑEDA VILLATE
MAYERLY JOHANNA HERNÁNDEZ ROA

TRABAJO FINAL DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
ESPECIALISTAS EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y
FARMACOLOGÍA VEGETAL

LUIS MIGUEL POMBO OSPINA, DIRECTOR CENTRO DE INVESTIGACIÓN
FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N CORPAS

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA
VEGETAL
BOGOTÁ D.C
2020

Dedicamos este trabajo a Dios,
por darnos la vida, la sabiduría y
el conocimiento en este proceso.
A nuestras familias por siempre
ser nuestro apoyo incondicional.
Infinitas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación Universitaria Juan N. Corpas por darnos la oportunidad de participar y desarrollar nuestro tema de investigación con la ayuda de los ingenieros Luis Miguel Pombo y Oscar Eduardo Rodríguez del grupo de investigación de terapéuticas alternativas y farmacología vegetal, quien con su experiencia y apoyaron y orientaron a desarrollar este proyecto. También al Doctor Víctor Hugo Forero Supelano, profesor titular de nuestra facultad con Magíster en Epidemiología Clínica, Especialista en Medicina Familiar Integral y Especialista en Gerencia en Salud, por brindarnos las herramientas necesarias para llevar a cabo este estudio de investigación. Por último, queremos agradecer a Dios y nuestras familias, por el apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	17
2.2 JUSTIFICACIÓN	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 GENERALIDADES DEL GENERO <i>Ilex</i> .	18
3.2 ESPECIES REPRESENTATIVAS DE LA FAMILIA <i>Aquifoliaceae</i>	18
3.3 GENERALIDADES DE <i>Ilex guayusa</i> L.	19
3.3.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y TAXONÓMICAS	19
3.3.2 HISTORIA Y USOS TRADICIONALES	20
3.3.3 FITOQUÍMICA Y NUTRIENTES	21
3.3.4 TOXICIDAD	22
3.3.5 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	23
3.4 RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO	26

3.5 ANTIOXIDANTES	28
3.6 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO	31
3.7 COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	34
3.8 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	36
3.8.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	36
3.8.2 EXTRACCIÓN POR DISOLVENTES	37
3.8.3 CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	38
3.8.4 TIPO Y CONCENTRACIÓN DEL DISOLVENTE	38
3.8.5 MÉTODO SOXHLET	38
3.8.6 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	39
4. METODOLOGÍA	41
4.1 MATERIALES	41
4.2 APARATOS Y EQUIPOS EMPLEADOS	42
4.3 MÉTODOS	43
4.3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	43
4.3.2 EXTRACCIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES TOTALES	44
4.3.3 IMPLEMENTACIÓN MÉTODOS ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	45
4.3.4 MÉTODO DE COLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS	45
4.3.5 MÉTODO DE COLORACIÓN DEL CATION RADICAL DPPH	46
4.3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	47
4.3.7 COMPARACIÓN MÉTODOS AAO – ANALISIS DE VARIANZA	48
5. DESARROLLO DEL PROYECTO	48

5.1 RESULTADOS	48
5.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	51
6. CRONOGRAMA	53
7. CONCLUSIONES	54
8. RECOMENDACIONES	55
9. BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies representativas del género <i>Ilex</i> .	18
Tabla 2. Contenido de metabolitos secundarios presentes en el extracto de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	22
Tabla 3. Principales especies reactivas de oxígeno.	26
Tabla 4. Tipo de antioxidantes.	29
Tabla 5. Efectos atribuidos a los compuestos fenólicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.	35
Tabla 6. Ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción.	37
Tabla 7. Análisis de extractos con DPPH con sus respectivos IC50, AAR con respecto a ácido ascórbico y la rutina. AAR: actividad antioxidante relativa.	49
Tabla 8. Análisis de extractos con ABTS con sus respectivos IC50, AAR con respecto a ácido ascórbico y la rutina. AAR: actividad antioxidante relativa.	49

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Grafica 1. Resultados tratamientos con mayor actividad antioxidante ANOVA DPPH.	50
Grafica 2. Resultados tratamientos con mayor actividad antioxidante ANOVA ABTS.	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características taxonómicas de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	20
Figura 2. Factores y consecuencias de la excesiva formación de radicales libres.	27
Figura 3. Mecanismo de acción de los radicales libres/Antioxidantes.	28
Figura 4. Producción y estabilización de un radical libre.	30
Figura 5. Estrés oxidativo en envejecimiento.	34
Figura 6. Ejemplos de figuras de compuestos fenólicos.	34
Figura 7. Clasificación de los compuestos fenólicos.	35
Figura 8. Métodos de extracción de compuestos bioactivos en plantas.	36
Figura 9. Extracción con método de soxhlet.	39
Figura 10. Reacción del DPPH y un antioxidante.	40
Figura 11. Estructura del ABTS antes y después de la reacción antioxidante.	41
Figura 12. Sendero ambiental Mogambo (Recolección de material vegetal <i>Ilex guayusa</i> Loes).	43
Figura 13. Hojas de <i>Ilex guayusa</i> L.	44
Figura 14. Extractos de <i>Ilex guayusa</i> Loes en roto evaporación.	45
Figura 15. Estructura química del trolox.	47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Recolección de material vegetal (<i>Ilex guayusa</i> Loes).	64
Anexo B. Extracto de <i>Ilex guayusa</i> Loes.	64
Anexo C. Proceso de cuantificación de actividad antioxidante.	66
Anexo D. Extracción por método soxhlet.	67
Anexo E. ANOVA DPPH.	68
Anexo F. ANOVA ABTS.	69

GLOSARIO

- **ANTIOXIDANTE:** aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción.
- **ESTRÉS OXIDATIVO:** a la rotura del equilibrio entre la producción de especies oxidantes y las defensas antioxidantes.
- **ESPECIE *Ilex*:** *Ilex* / aɪləks / o acebo, es un género de 400 a 600 especies de plantas con flores en la familia Aquifoliaceae, y el único género vivo en esa familia. Las especies son árboles de hoja perenne y caducifolios, arbustos y escaladores desde zonas tropicales hasta zonas templadas en todo el mundo.
- ***Ilex guayusa* L:** Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, que pertenece a la familia Aquifoliaceae, esta especie alcanza un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, posee un diámetro a la altura del pecho de 50-80 cm, tienen una copa irregular y presentan un follaje denso
- **RADICALES LIBRES:** son especies químicas que tienen un electrón no apareado, que las habilita como fragmentos moleculares muy reactivos.
- **ACIDO ASCORBICO** o ácido L-ascórbico (AA), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante hidrosoluble, que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa, mediante una serie de reacciones enzimáticas
- **RUTINA:** es un glicósido del flavonol conocido como vitamina P (quercetina-3-ramnosil glucósido), es un antioxidante formado por una molécula de quercetina unida a una glicosilación.
- **TROLOX:** es un análogo de la vitamina E soluble con actividad antioxidante utilizado para reducir el daño por estrés oxidativo
- **DPPH:** técnica que emplea el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo como radical sintético, para evaluar la actividad antioxidante de compuestos extraídos de plantas. Su función es ser un radical oxidante que va a ser reducido por el antioxidante.
- **ABTS:** técnica que emplea el Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) como radical sintético para evaluar la actividad antioxidante de compuestos extraídos de plantas.

RESUMEN

Algunos compuestos con propiedades antioxidantes favorecen la homeostasis de oxido-reducción cumpliendo un papel importante en el control del estrés oxidativo implicado en la fisiopatología de múltiples enfermedades de origen inflamatorio, isquémico, neurodegenerativo, entre otras. Por décadas, las plantas medicinales han sido una fuente importante de compuestos con actividad biológica. *Ilex guayusa* L. es un árbol originario de América del Sur; sus hojas son empleadas por tribus indígenas amazónicas para aliviar dolores y prevenir efectos no deseados a nivel del sistema nervioso central. Los compuestos fenólicos y los carotenoides son los metabolitos secundarios mayoritarios. Por lo anterior, ésta especie es una excelente candidata para explorar sus propiedades terapéuticas relacionadas con la prevención de procesos patológicos.

Objetivos: evaluar la actividad antioxidante de extractos y fracciones obtenidos a partir de las hojas de *Ilex guayusa* Loes.

Material y métodos: Los extractos y fracciones se obtuvieron por Soxhlet con solventes de polaridad creciente. La actividad antioxidante se evaluó de acuerdo con los métodos de decoloración con el radical catiónico ABTS y por el radical libre DPPH*, en un rango de concentraciones de 40 a 200 ppm. El Ácido Ascórbico y la rutina fueron utilizados como controles positivos.

Resultados: Para los extractos y fracciones evaluados, extracto etanólico total, fracciones en diclorometano, acetato de etilo y etanol, por el método de DPPH, se obtuvieron los siguientes valores de índice de captación media de electrones en ppm (IC50): 23,58, 414,96, 64,18 y 4,58 y por el método de ABTS se encontraron los valores de IC50: 10,66, 93,35, 32,89 y 3,82, respectivamente. Los valores de IC50 para los controles positivos (Ácido Ascórbico y Rutina), fueron de 0,52 y 9,2 (DPPH) y 0,50 y 6,93 (ABTS).

Conclusión: La fracción etanólica obtenida a partir de las hojas de *Ilex guayusa* L. mostró la mayor actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS con valores de IC50 bajos (4,58 y 3,82) y menores a los obtenidos con los controles positivos, en el caso del ABTS. El efecto antioxidante de la fracción etanólica puede ser atribuible a la presencia de compuestos fenólicos, específicamente a los flavonoides

Palabras clave: Guayusa, *Ilex guayusa* Loes, cáncer, actividad antioxidante, composición química.

Keywords: Guayusa, *Ilex guayusa* Loes, cancer, antioxidant activity, phytochemical composition.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el aumento por el conocimiento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) ha revolucionado la medicina (1). El sistema antioxidante es conocido debido a su rol en el mantenimiento del pH y la neutralización de los radicales libres, evitando el daño celular (2). La naturaleza de la asociación entre radicales libres y la génesis de diferentes enfermedades es compleja y paradójica ya que se ha demostrado que los radicales libres y el estrés oxidativo pueden inducirlos. (3)

Actualmente, ya son bien conocidos los beneficios de una dieta rica en alimentos de origen vegetal para la salud humana. Esto porque cuentan con diversidad de fitoquímicos con acción antioxidante (4).

El género *Ilex* (Aquifoliaceae) se reconoce por sus diferentes usos tradicionales, componentes químicos y su importancia farmacológica. La mayoría de las plantas de este género son fuentes ricas en triterpenoides y saponinas. Además, estas plantas también contienen flavonoides, alcaloides, antocianinas y otros fenólicos lo que les confiere numerosas actividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, anti inflamatoria, neuro protectora y hepatoprotectoras (5,6).

Una de las principales representantes es Guayusa (*Ilex guayusa* L.) quien es reconocida por muchas de estas propiedades además de su actividad antiviral, hipoglucemiante, antifúngica y estrogénica. Es por ello que merece una exploración para desarrollar tratamientos alternativos y costo-efectivos, que optimicen y aporten a la prevención y terapéutica de procesos patológicos (7,8).

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antioxidante de extractos y fracciones obtenidas a partir de la planta *Ilex guayusa* Loes.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto de la planta *Ilex guayusa* Loes mediante la técnica de Soxhlet.
- Investigar la actividad y el contenido de compuestos antioxidantes de la especie *Ilex guayusa* Loes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El estrés oxidativo desempeña un papel primordial en diferentes desórdenes fisiológicos y la agudización de la enfermedad hasta llegar a alterar el desempeño físico y/o psíquico de una persona “supuestamente” sana.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Se ha entendido en los últimos años la importancia de conocer a cabalidad acerca de las especies reactivas de oxígeno y su relación con los diversos procesos patológicos. Actualmente, está documentado que son generados por diferentes factores, exógenos o endógenos. También se reconoce que para mantener una homeostasis en el organismo debe existir un equilibrio entre radicales libres y antioxidantes. Sin embargo, son más las condiciones que favorecen la producción de radicales libres generando así un estado conocido como estrés oxidativo, proceso desencadenante de estados clínicos tales como la aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer, entre otras. Ahora bien, se postula que el promover la acción antioxidante producirá beneficios a gran escala en este tipo de condiciones. (1)

Si bien las enfermedades crónico-degenerativas tienen múltiples presentaciones y los radicales libres son factores de gran importancia, no se deja de lado todos los otros factores desencadenantes de las mismas. La producción de oxidantes en las dietas actuales ha sido desbordada, por lo que sería de gran importancia consumir alimentos que tengan un grado de protección antioxidante. (9)

Estos son los temas que motivaron este proyecto de investigación, encontrando una alternativa desde la farmacología vegetal, con el extracto de la planta *Ilex guayusa* Loes, reconocido por sus beneficios antioxidantes. (10)

Aportando así conocimiento científico que permita la apertura y avances de nuevos estudios a partir de éste, facilitando así una opción de manejo costo-efectivo frente a estas patologías en la población de países subdesarrollados como el nuestro.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Ilex*

El género *Ilex* es el único género que comprende cerca de 600 especies de la familia Aquifoliaceae, está ampliamente distribuido. Se reconoce por sus diferentes usos tradicionales además de componentes químicos y su importancia farmacológica. Sus aplicaciones se basan en la elaboración de bebidas tipo té para consumo diario como hábito que promueva el bienestar y la salud (11).

Está conformado por árboles o arbustos por lo general dioicos, que habitan en zonas tropicales y templadas de ambos hemisferios, principalmente en Centro y Sudamérica, donde se presenta su centro de diversificación (12).

Se les atribuye entre sus usos tradicionales propiedades curativas “purgativas, vomitorias, diuréticas y estimulantes”, se utilizan en actividades ceremoniales y en épocas navideñas las ramas con frutos de por lo menos dos especies son utilizadas como adornos (13).

3.2 ESPECIES REPRESENTATIVAS DE LA FAMILIA AQUIFOLIACEAE

NOMBRE DE LA ESPECIE	PRINCIPALES COMPONENTES	ACCIONES SOPORTADAS POR LA LITERATURA
<i>Ilex paraguariensis</i>	Ácido clorogénico, ácido cafeico, flavonoides, derivados del ácido hidroxicinámico. (14,15)	Antioxidante, antimicrobiano (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. Cloacae</i> , <i>S. enteritidis</i>) también antimicótico excepto <i>A. niger</i> , antiinflamatorio, neuroprotector, hipolipemiante, aterosclerosis, antiproliferativa. (16,17,18,19)
<i>Ilex cornuta</i>	Saponinas triterpenoides. (20)	Efecto protector del cardiomiocito en enfermedades cardiovasculares, antiinflamatorio. (20,21)
<i>Ilex latifolia Thunb</i>	Saponinas, flavonoides. Ácido clorogénico, 3,4-di-O- cafeoilquínico y éster metílico del ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico (22)	Antioxidante, citotóxico contra células tumorales, antiinflamatorio, neuroprotector en isquemia transitoria, deterioro de memoria (Enf. Alzheimer). (23,24,25)
<i>Ilex pubescens</i>	Flavonoides (26,27)	Enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, tolerancia a isquemia cerebral (26,27)

<i>Ilex hainanensis</i> Merr	Triterpenoides, flavonoides y ácidos orgánicos. (28)	Hipolipemiante. (28).
<i>Ilex asprella</i>	Triterpenoides, flavonoides, ácido fenólico y compuestos fenólicos alcaloides. Los más característicos son los triterpenoides y sus saponinas. (29)	Anticancerígenas, antiinflamatorias y antiviruses. (29).
<i>Ilex spinigera</i>	Flavonoides La xantina teobromina e ilexantina (30,31)	Antiinflamatoria, antioxidante. (30,31)
<i>Ilex laurina</i>	Cafeína, teobromina, ácido clorogénico y p-cumárico (32).	Antioxidante (32).
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Cafeína, escualeno, alfa amyryna. (33).	Antioxidante, antimicrobiano. (33).

Tabla 1. Especies representativas del género *Ilex*. Fuente: Elaboración propia

3.3 GENERALIDADES DE *Ilex guayusa* L.

3.3.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y TAXONÓMICAS

Ilex guayusa L. Es un árbol miembro de la familia Aquifoliaceae, nativo de América del sur y emblemático de la región amazónica colombiana, ecuatoriana y peruana formando parte de los bosques tropicales (7,34,35). También conocida como guayusa, guañusa, huayusa, aguayusa y wuayusa (34).

Respecto a su distribución altitudinal *Ilex guayusa* L. crece en Colombia a 2,000 metros sobre el nivel del mar. En Ecuador la distribución varía desde el nivel del mar hasta 1,500 msnm (34). En general se distribuye en altitudes entre 200 y 2,000 msnm.

Este árbol tiene una amplia distribución geográfica en diversos departamentos de Colombia como Nariño, Putumayo, Caquetá y Cundinamarca, y municipios como Viotá lugar representativo por su sendero ecológico ambiental conocido como Mogambo (34).

Ilex guayusa L. es un árbol de hoja perenne con una esperanza de vida de más de 2 años. La planta es dioica caracterizada por tener pies masculinos y femeninos

individuales, la cual alcanza entre 6 y 10 metros de altura, incluso hasta los 15 metros, con un tronco ramificado de hasta 1 metro de diámetro (8,34)

Sus características taxonómicas se desglosan en la figura 1.

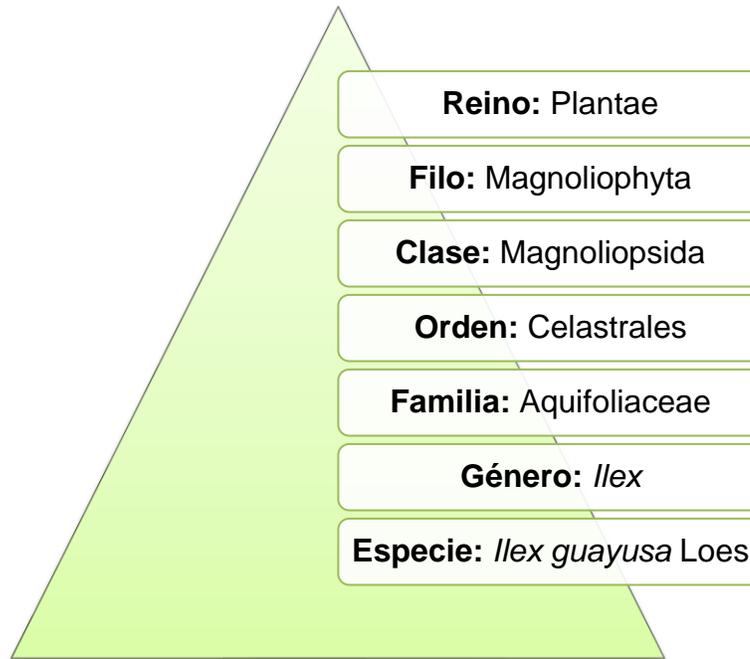


Figura 1 . Características taxonómicas de *Ilex guayusa* Loes Fuente: Elaboración propia

3.3.2 HISTORIA Y USOS TRADICIONALES

La *Ilex guayusa* L. ha sido una planta reconocida e importante en diversos estudios arqueológicos. Se destaca su uso desde la época precolombina, en las comunidades amazónicas kichwa.

Su uso se describe por lo menos hace 1500 años en actividades ritualistas y ceremoniales, tal como lo evidenció el biólogo estadounidense Schultes en uno de sus hallazgos arqueológicos donde se encontró la tumba de un chamán en Bolivia, en la cual se observó hojas secas y prensadas de guayusa, un mortero y una maja. (8)

Según el concepto de "cosmovisión" de los grupos étnicos amazónicos, *Ilex guayusa* L. podía ser utilizado como una bebida mágica dado su efecto purificador y detoxificador gastrointestinal y como inhibidor del apetito. Además, lo utilizaban en altas concentraciones para mejorar sus habilidades y destrezas, soñar, prever y adivinar el futuro. (8,34).

A mediados del siglo XIX, y en base a diversos estudios etnobotánicos históricos se evidenció el efecto y uso de *Ilex guayusa* L. en el tratamiento de personas intoxicadas, alteraciones menstruales, diarrea, dolor de cabeza y estómago. Asimismo, se le atribuye acción diurética, hipotensora, hipoglucemiante, energizante y estimulante. Además, en cuadros de asma, fiebre; infecciones venéreas, infección bucal o periodontal, infertilidad, pérdida de peso, y mejoría de la función de próstata y riñón. (34,36)

3.3.3 FITOQUÍMICA Y NUTRIENTES

Análisis fitoquímicos recientes han proporcionado evaluaciones cualitativas y cuantitativas del contenido nutricional y la composición química de esta planta. Diversos estudios científicos han descrito la importancia de la presencia de varios compuestos entre estos las metilxantinas: cafeína a 36 mg/ml y teobromina 0.3 mg/ml, consideradas alcaloides. (36,37); al primer componente se le atribuye su propiedad estimulante (1972 Holmstedt y Lindgren) (35). En un estudio realizado en el 2013 el contenido de cafeína en guayusa en peso seco oscilaba entre 2.90 a 3.28% (38) y en una publicación más reciente Wise and Santander (2018) describieron un rango de concentración entre 19.08 ± 0.31 mg/g en hojas frescas de guayusa. (37)

De acuerdo a sus componentes nutricionales y dietéticos *Ilex guayusa* L., se compone principalmente de carbohidratos (64.1 ± 1.5 g/100g), su componente principal es fibra cruda (37.0 ± 1.7 g/100g), y tiene bajos valores de energía, sal, grasa y azúcar (Wise y Santander 2018) (36).

Se han identificado en estos 17 aminoácidos, los de mayor relevancia son la alanina, glutamina y triptófano. Actualmente de forma hipotética describen la presencia de L-teanina un ácido glutámico al que se le atribuye sinergismo con la cafeína. (36) aunque se ha expuesto esto en el momento no se conoce de ningún estudio científico válido que evidencia la presencia de este aminoácido en la planta.

En su análisis químico se describen 16 elementos, incluidos el potasio, fósforo, magnesio, sodio, aluminio, bario, cobre, hierro y zinc entre otros. (36)

En diversas investigaciones se han reportado sus metabolitos secundarios más importantes, entre estos están los carotenoides y compuestos fenólicos (ácido hidroxicinámico, y el ácido clorogénico). Además, de la presencia de triterpenoides pentacíclicos, ácidos oleanólicos y ursólicos, xantinas, flavonoides, saponinas y derivados del ácido clorogénico, ésteres de amirina y palmitato de amirina. (34,35,36,37)

El ácido ursólico en un estudio científico mostró actividad biológica importante, este permite la activación de la Proteína G acoplada al receptor de ácido biliar (TGR5), jugando así un papel importante en la regulación del metabolismo de los lípidos y

glucosa, lo que sugiere su asociación en tratamientos para la diabetes y el síndrome metabólico. (35)

Así mismo, en el año 2017 se expuso que la quercetina-3-O-hexosa y el ácido clorogénico son las principales moléculas bioactivas del extracto de guayusa, dichos compuestos son los encargados de proveer las propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias de *Ilex guayusa* L. (35)

Adicionalmente esta planta presenta cantidades importantes de esteroides, terpenos y compuestos lactónicos o cumarinas, saponinas, fenoles, taninos, aceites esenciales, azúcares reductores, flavonoides y quinonas. Por otra parte, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina en tisanas se encuentra en menor cantidad. (8,38)

COMPUESTO	CONTENIDO MG/ML
Cafeína	36
Teobromina	0.3
Ácidos clorogénicos	52
Polifenoles totales	10
Catequina	2
Isoflavonas	0.8
Epicatequina	0.179
Epicatequina galato (ECG)	0.199
Galato de epigalocatequina (ECG)	0.0876
Epigalocatequina (EGCG)	1.11
Kaempferol	Trazas
Naringina	Trazas

TABLA 2. Contenido de metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Ilex guayusa* L. (Kapp et al. 2016)

3.3.4 TOXICIDAD

Se han realizado diversos estudios con modelos animales y humanos. En el estudio de Kapp et al. del 2016 describieron que guayusa no tiene genotoxicidad (36,40). La dosis letal (LD 50) descrita para guayusa es > 5,000 mg/kg en ratas hembras. (36)

En un estudio subcrónico (90 días) realizado en ratas, se administró el extracto de guayusa a concentraciones de 1.200, 2.500 y 5.000 mg/kg/día, sin evidenciar reacciones adversas en el grupo expuesto a la planta. (36, 40)

Por último, un ensayo clínico aleatorizado doble ciego de 12 hombres adultos comparó los efectos en el sistema nervioso central y a nivel sistémico del extracto

de guayusa y la cafeína sintética, cada dosis contenía 200 mg de cafeína (Krieger et al. 2016), en donde no se observaron reacciones adversas.

Por lo que se concluye que *Ilex guayusa* L. es una planta de uso seguro según lo descrito en la literatura. (36)

3.3.5 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

El estudio fitoquímico de las plantas ha aumentado en los últimos años otorgándoles un papel muy importante en su aplicación frente a diversas patologías gracias a sus propiedades medicinales.

Los compuestos bioactivos de *Ilex guayusa* L. le han atribuido diversas acciones, entre estas, su efecto antioxidante, antitumoral, hipoglucemiante, hipolipemiante, antimicrobiano, estimulante del sistema nervioso central, antiinflamatorio, diurético, antienvjecimiento, entre otras. Es por esto que varios estudios de esta planta han descrito entre sus componentes más relevantes los compuestos polifenólicos, los alcaloides (metilxantinas), los terpenos (saponinas) y las cumarinas. (37,38)

Investigar y conocer cada día más sobre las plantas permite ir más allá del uso empírico de estas, desarrollar nuevos fármacos con validez científica, brindando nuevas alternativas terapéuticas costo-efectivas y accesibles.

- **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE:** Se ha descubierto que la *Ilex guayusa* L. posee un gran contenido en fenoles y carotenoides (37,38,41). Los carotenos son de gran interés pues se les atribuyen varios efectos benéficos en la salud dado su efecto antioxidante (42), al que se le atribuye la actividad de desactivar moléculas sensibilizadoras excitadas electrónicamente, responsables de generación de radicales y especies reactivas de oxígeno. Los compuestos fenólicos deben su actividad antioxidante principalmente a sus propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores donadores de hidrógeno y electrolitos (43,44)

La actividad antioxidante del té de guayusa usando varios bioensayos, informan del contenido polifenólico total, determinando la actividad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) entre 1728 - 2019 MmolTE / g de masa seca. (36)

En diferentes estudios sobre la especie *Ilex guayusa* L. se han podido identificar 14 compuestos fenólicos de acuerdo con su estado de maduración, dentro de estos se destacan 9 ácidos hidroxicinámicos y sus derivados , 5 flavonoides sobre todo en hojas jóvenes (41), dentro de los ácidos hidroxicinámicos está su compuesto el ácido clorogénico que corresponde a su vez a los ácidos cafeolquínicos (37, 38, 45), los cuales poseen funciones antioxidantes, antiinflamatorias y actividad hipoglucemiante

reforzando aún más la importancia de la guayusa en estos estados fisiopatológicos.

La quercetina, compuesto flavonoide de la planta, tiene múltiples funciones clínicas entre ellas actividad anticancerígena y antiinflamatoria; además es usado en múltiples patologías como las alergias, diabetes y protector cardiovascular. Otros derivados encontrados son el kaempferol productor de coenzima Q10 antioxidante intracelular y catequina sustancia en estudio para la prevención y tratamiento del cáncer (45). Con respecto a los compuestos carotenoides en los estudios se han descrito de 5 a 7 de sus componentes, los más relevantes son la neoxantina, la luteína y los alfa y beta carotenos, estos compuestos son muy susceptibles de ser modificados durante el proceso de preparación de la planta, esto debido a que existe una mayor concentración en plantas jóvenes y en las expuestas a luz solar contrario de la planta madura o poco expuesta al sol. (42)

El aislado proteico de *Ilex guayusa* L. nos muestra como la actividad antioxidante varía de acuerdo al pH y la concentración del mismo, entre un rango de 3,0 y 5,0 con mayor actividad en pH de 4,5 a concentraciones de 100 y 1000 ug/ml. Estos hallazgos destacan su uso como suplemento alimenticio. (46).

- EFECTO ANTITUMORAL: Se han realizado diversos estudios que le atribuyen a *Ilex guayusa* L. su efecto antitumoral y que han permitido desarrollar nuevas alternativas terapéuticas frente al cáncer. Entre ellos podemos destacar los compuestos activos de polifenoles; los derivados de ácido fenólico mono, di-cafeoilquínico, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, ácido neoclorogénico; los terpenos entre ellos las saponinas y los alcaloides como la cafeína y la teobromina los cuales tiene particular propiedad supresora en células tumorales metastásicas. (37,39)

En publicaciones realizadas en 2019 y 2020, se estudiaron los extractos de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF- 7, en los cuales se evidenciaron que su funcionamiento en conjunto generaba en la célula una mayor susceptibilidad a sufrir apoptosis dada la sobreexpresión del gen Bax, en homodimeros (Bax: Bax). Además, *Ilex guayusa* L. presentó un efecto concentración-dependiente, es decir mientras mayor sea la cantidad en la dilución mayor será su efecto; *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentaron un efecto muy favorable sobre la línea celular MCF-7 lo que permite atribuirles la actividad anti-metastásica. (39)

- EFECTO CONTRA MICROORGANISMOS: Diversos estudios describen en *Ilex guayusa* L. sus efectos antibacterianos, antiparasitarios y antifúngicos,

acciones atribuidas a la presencia de cumarinas en sus compuestos activos (38).

Frente a *Staphylococcus aureus* presenta halos de inhibición de 14 mm (34). Además, mencionan su efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*. (36)

Así mismo, es utilizada en diversos procesos infecciosos periodontales y bucales actuando sobre patógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*. (36)

Por último, *Ilex guayusa* L. muestra importantes efectos antiparasitarios en patologías como la leishmaniasis, malaria, chagas y su actividad antifúngica contra *Candida albicans*. (34).

- EFECTO NEUROESTIMULANTE: Teniendo en cuenta el alto contenido de cafeína en la planta, se ha encontrado estímulo directo sobre el sistema nervioso central y simpático, generando un efecto en el sistema circulatorio, dando como respuesta el aumento del estado de alerta y mejorando la actividad para realizar tareas físicas. (34) Además genera un estímulo que mejora el estado de ánimo y la cognición; siempre y cuando su consumo total no exceda de 400 mg/d. (40)

Ante la presencia de L-teanina se describe la reducción de la fatiga física y mental, el estrés, la ansiedad y la esquizofrenia dando a este un efecto neuroprotector a destacar. (37,38)

- EFECTO HIPOGLUCEMIANTE: Se conoce que los mecanismos de acción de las plantas para disminuir los niveles de glucosa se pueden atribuir a los siguientes factores:
 - Aumento de los niveles de insulina por estimulación sobre las células beta del páncreas
 - Resistencia a las hormonas que aumentan la glucemia
 - Aumento del número y sensibilidad de sitios receptores de insulina
 - Disminución de la pérdida de glucógeno
 - Aumento de glucosa en los tejidos y órganos

Lo que se busca con el desarrollo de nuevos fármacos es prevenir la absorción de los carbohidratos después de su consumo. Esta idea se centra en aquellas enzimas que permiten la descomposición de los almidones complejos, es decir las glucosidasas (enzimas localizadas en el borde en cepillo del intestino delgado), estos inhibidores al unirse a las glucosidasas intestinales inhiben su acción, logrando interferir en la hidrólisis de los oligosacáridos y de los disacáridos, disminuyendo y retardando su absorción. En estudios del extracto de *Ilex guayusa* L. se evidencia que el extracto

metanólico presentó mayor efecto dosis respuesta IC50 de 437,48 mg/ml. (43)

Además, se observó en un estudio en ratones con *diabetes mellitus* tipo I efectos tales como la reducción de la hiperglucemia, polidipsia, pérdida de peso y hemoglobina glicosilada, resultados secundarios a la inhibición de las enzimas a y b glucosidasas. (34)

La Guanidina, uno de los compuestos de *Ilex guayusa* L. puede también explicar su efecto hipoglicemiante. Se describe un estudio en ratones no diabéticos que reduce niveles de glucosa sin afectar parámetros normales en su homeostasis. (34).

3.4 RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Dada su naturaleza dual, el oxígeno tiene potenciales efectos tóxicos y benéficos. Esto se le confiere a su estructura que tiene la actividad de presentar reacciones químicas en nuestro organismo. Uno de sus resultados es la producción exagerada de radicales libres, especie química que tiene una elevada capacidad y reactividad frente a ciertos compuestos por su estructura de uno o más electrones no apareados, lo que los hace muy inestables. (47)

Los radicales libres hacen parte de las especies reactivas de oxígeno (ERO) de las cuales las más comunes y de mayor importancia biológica son: oxígeno singlete (1O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$), radical alcoxilo ($\cdot RO$), radical-anión superóxido ($O_2\cdot^-$), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito ($ONOO^-$). (47,48)

Especie reactiva	Símbolo	Vida media (s)	Origen y reactividad
Superóxido	$O_2\cdot^-$	10^{-4}	Producto metabólico de la fosforilización oxidativa generado en la mitocondria, sistema vascular, entre otros.
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	10^{-9}	Altamente reactivo, generado durante la sobrecarga de hierro y diversas reacciones en el organismo.
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Estable	Generado en el organismo como producto de la reacción $O_2\cdot^-$ catalizada por superóxido dismutasa y a través de un gran número de reacciones.
Radical peroxilo	$\cdot OOR$	Rango de los segundos	Formado como producto del daño oxidativo a lípidos, ADN y carbohidratos.
Hidroperóxido orgánico	ROOH	Estable	Producto del daño oxidativo a lípidos, ADN y carbohidratos; puede reaccionar con metales de transición y formar nuevos radicales.
Oxígeno singlete	1O_2	10^{-6}	Altamente reactivo, formado durante la fotosensibilización y reacciones químicas.
Ozono	O_3	Rango de los segundos	Presente en la atmósfera, puede reaccionar con diversas moléculas.

Tabla 3 . Principales Especies Reactivas de Oxígeno (Ortiz y Medina, 2020)

La producción de ERO en el cuerpo humano es necesaria para el funcionamiento y equilibrio de diversos sistemas. Dentro del metabolismo celular cumple funciones como la interpretación de señales celulares, expresión de genes, protección inmunológica, respiración celular, entre otras. Los procesos endógenos que las generan son la respiración mitocondrial, la activación de polimorfonucleares, el metabolismo del ácido araquidónico, las acciones enzimáticas y la catálisis por liberación de hierro y cobre. (47,48)

Los factores exógenos que pueden desencadenar producción de especies reactivas de oxígeno son múltiples, entre ellos: exposición a infecciones microbianas, que producen activación fagocitaria, durante una actividad física intensa, por la acción de sustancias contaminantes como el humo de cigarro, el alcohol y estupefacientes, la ionización de rayos ultravioleta, la alimentación inadecuada, la exposición a sustancias tóxicas (fertilizantes y pesticidas), el metabolismo de algunos fármacos y un elevado estrés físico o psíquico. Es decir, el organismo se encuentra sometido, de una forma continua, a la producción de ERO por la acción de factores externos que no son posibles de controlar por la persona. (47,49)

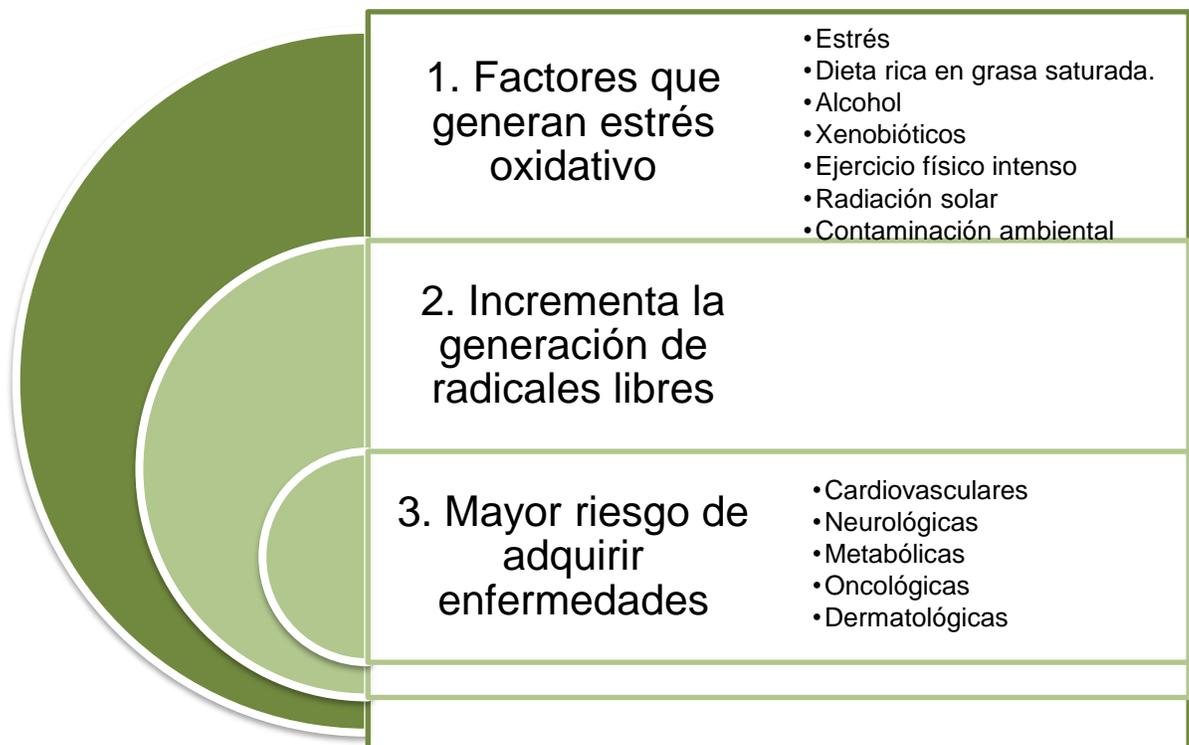


Figura 2. Factores y consecuencias de la excesiva formación de radicales libres. Fuente: Elaboración propia

El estrés oxidativo tiene lugar en la célula y los tejidos cuando se produce un desbalance a favor de las sustancias pro-oxidantes ya descritas y los antioxidantes,

este incremento descontrolado puede dar origen a una activación de las rutas de generación de más ERO o a una inhibición de las rutas responsables de su inactivación, esto dando lugar a la génesis de enfermedades. Esto dado a su elevada reactividad y baja selectividad que finalmente compromete la homeostasis celular dañando biomoléculas de gran importancia en el organismo como ADN, proteínas, carbohidratos, y lípidos; lo que conduce a daños celulares, ocasionando una cascada de alteraciones. (48,50)

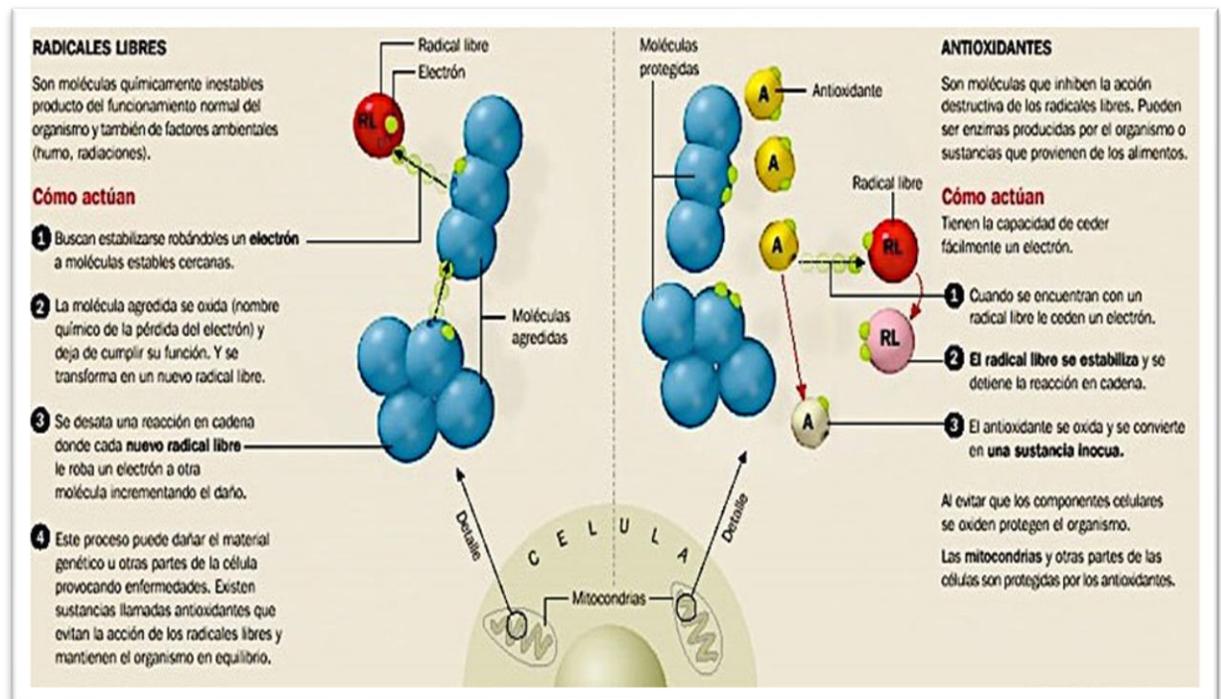


Figura 3: Mecanismo de acción de los radicales libres/antioxidantes. (Diaz et al. 2020)

3.5 ANTIOXIDANTES

Al definir el concepto de antioxidante biológico nos referimos a los compuestos que al estar presentes a una menor concentración en comparación con la de un sustrato oxidable, son capaces de retrasar la oxidación del sustrato. Los antioxidantes juegan un papel fundamental en la reducción del estrés oxidativo mediante la protección del ADN contra las transformaciones malignas, así como otros parámetros de daño celular (49).

Existe una amplia gamma de antioxidantes que están presentes en fluidos corporales y tejidos. Se clasifican en dos amplios grupos, hidrofílicos o hidrofóbicos. Los hidrofílicos reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma

sanguíneo, mientras que los hidrofóbicos protegen las membranas celulares contra la peroxidación de lípidos (50).

El organismo cuenta con 3 mecanismos antioxidantes:

- Mecanismo preventivo: involucra diversas proteínas que tienen la capacidad de realizar enlaces con metales, entre ellas la albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, que poseen un núcleo central de cobre; y la ferritina, transferrina y mioglobina, que poseen un núcleo central de hierro. La deficiencia de estos complejos deja al organismo sin protección sobre la sobreproducción endógena de ERO.
- Mecanismo reparador: Del cual forman parte enzimas que restauran o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de ERO. El estrés oxidativo se refuerza cuando este factor es inhibido. Las más conocidas son: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y metionina-sulfóxidoreductasa (MSR).
- Mecanismo secuestrador: Por medio del cual se elimina el exceso de ERO. Entre las enzimas encargadas de esto se encuentra la superóxidodismutasa (SOD), GPx, catalasa y otras metaloenzimas. También hacen parte los ácidos grasos poliinsaturados, úrico y ascórbico (vitamina C), los tocoferoles vitamina E, la bilirrubina, los carotenoides y flavonoides (47).

ENZIMÁTICOS	<ul style="list-style-type: none"> *Catalasa *Superóxido dismutasa (SOD) *Sistema glutatión *Glucosa fosfato deshidrogenasa (genera NADPH) 	NO ENZIMÁTICOS	<p>Endógenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> *Glutatión *NADPH *Tocoferoles *Ácido ascórbico *Carotenoides (albúmina, ceruloplasmina, ácidos grasos) <p>Exógenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> *Etanol *Etildimetiltiourea *Dimetilsulfóxido (DSO) *N-acetilcisteína y otros tioles
--------------------	---	-----------------------	--

Tabla 4 : Tipos de antioxidantes (Diaz et al,2020)

A continuación, se exponen la acción de algunos antioxidantes sobre las especies reactivas de oxígeno:

-Vitamina C: Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales hidroxilo. Regenera la forma oxidada de la vitamina E.

-Vitamina E: Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales hidroxilo. Captura anión superóxido. Neutraliza peróxidos.

-Betacarotenos: Neutraliza el oxígeno singlete.

-SOD: Eliminan el anión superóxido.

-CAT y GPX: Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo (53).

Es importante mantener una ingesta diaria de frutas y vegetales frescos además de procurar controlar factores xenobióticos, periodos prolongados de estrés psíquico y físico para prevenir la generación excesiva de ERO (47).

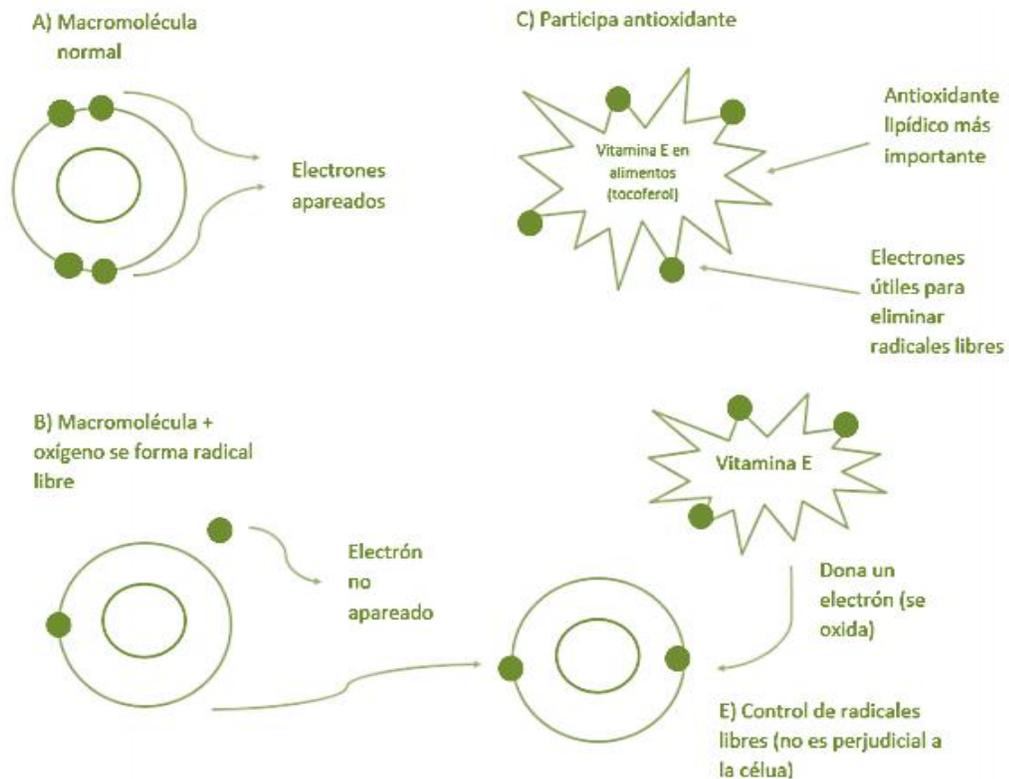


Figura 4 : Producción y estabilización de un radical libre (Coronado et al, 2020)

3.6 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

Estudios correlacionan el estrés oxidativo con la patogénesis de numerosas enfermedades como aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, cáncer entre otras (55). A continuación, mencionaremos algunas de ellas.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: Dado que las células neuronales muestran un alto consumo de oxígeno son altamente vulnerables al daño provocado por el estrés oxidativo, además poseen un gran contenido de ácido graso poliinsaturado el cual es más sensible a ser oxidado en comparación con niveles normales de antioxidantes (56).

Al llegar los radicales libres a la membrana celular, estos reaccionan con los ácidos grasos presentes provocando la destrucción de la misma y por tanto afectando su permeabilidad lo que producirá graves daños celulares. Se han encontrado lípidos hidroperóxidos tóxicos resultado de la oxidación de ácidos en pacientes con Alzheimer. (48)

La progresión de la Enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con una interacción entre el estrés oxidativo y el péptido Beta Amiloide ($A\beta$) en un círculo vicioso. Se continúa estudiado el efecto del uso de antioxidantes como un factor para preservar o mejorar el rendimiento cognitivo en estos pacientes (56).

ASMA: El proceso de la producción de ERO en la fisiopatología del asma ya se encuentra bien documentado. Estudios han demostrado que los eosinófilos y neutrófilos son generadores activos de estos radicales libres de acuerdo a la severidad de la hiperreactividad. Se produce una anormalidad en el redox del pulmón el cual, a pesar de tener gran variedad de antioxidantes, es superado por la superproducción de los oxidantes. Se sugiere que el consumo de glutatión en la vía aérea del paciente asmático está en constante estimulación, por lo que, a mayor obstrucción del paso de aire, hiperreactividad, remodelación, infecciones recurrentes, exposición a la polución y alérgenos en los sujetos atópicos se aumenta más el desbalance (57).

ENFERMEDAD RENAL: El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la insuficiencia renal aguda y crónica. Estudios indican que las lesiones renales ROS están elevados tanto en modelos humanos como animales (58).

La superproducción de ERO en la enfermedad renal están dadas por las vías de la enzima NADPH oxidasa (NOX), la hiperuricemia, hiperglucemia y las citoquinas inflamatorias a su vez que la disminución del óxido nítrico endotelial. (59)

Los anteriores factores contribuyen al daño mitocondrial el cual es un factor determinante en la progresión de la enfermedad. Esta afectación de la mitocondria disminuye la actividad mitofágica y los sistemas de defensa mitocondriales llevando a una sobreproducción de ROS. Este daño podría verse reflejado en otros órganos

como el corazón, evidenciándose remodelamiento fibroso tanto a nivel renal como a nivel cardíaco (59).

OBESIDAD: Estudios han demostrado el papel del tejido adiposo blanco como productor de ciertas sustancias bioactivas llamadas adipocinas, algunas de ellas con funciones inflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), estas adipocinas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo. Entre los mecanismos para producir ROS se encuentran la oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos, el consumo excesivo de oxígeno y las dietas ricas en lípidos porque pueden alterar el metabolismo del oxígeno. El aumento del tejido adiposo disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Finalmente se produce disfunción endotelial, principalmente al disminuir biodisponibilidad de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), lo que favorece la enfermedad aterosclerótica (60,61).

ATEROSCLEROSIS: Enfermedades como la aterosclerosis han sido relacionadas como muchas otras con la destrucción oxidativa de las proteínas. Las ERO atacan a las proteínas fragmentándolas, produciendo ruptura de los enlaces peptídicos y modificando sus aminoácidos. El radical hidroxilo en particular puede incluso modificar casi todos los residuos de aminoácidos. Por lo anterior se considera que la oxidación de lipoproteínas contribuye a la progresión de la enfermedad (48).

Debido al aumento de la morbilidad respecto a enfermedades cardiovasculares se ha despertado el interés por aumentar el consumo de alimentos ricos en polifenoles dada su actividad frente a la lipoproteína LDL, el colesterol, la presión arterial, la función endotelial y su efecto frente a la inflamación (62).

La yerba mate por ejemplo aparece como un potente inhibidor de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los compuestos fenólicos tienen propiedades captadoras de radicales libres e inhiben la oxidación químicamente inducida de lípidos en las membranas (62,63). También se documenta que la yerba mate normaliza la hiperviscosidad sanguínea y promueve un flujo sanguíneo en pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular para mitigar posibles isquemias de miocardio (64).

CÁNCER: El cáncer está relacionado directamente con las diversas mutaciones presentadas en el ADN, uno de los puntos críticos en los que se puede presentar es la división celular (Inicio o detención), la cual se regula por la proteincinasa. Las especies reactivas de oxígeno tienen la capacidad de alterar esta proteína la cual no llevará a cabo su función adecuadamente produciéndose cúmulos de células dañadas denominadas tumores (48,65).

Los polifenoles poseen actividad antiinflamatoria y citotóxica al modular los factores de transcripción que regulan la actividad de enzimas antioxidantes. Estos efectos

son mediados por la inhibición de la translocación del núcleo NF- κ B y en sí favorece la acción de las vías proliferativas (66,67).

ARTRITIS REUMATOIDEA: En pacientes con artritis reumatoidea según diversos estudios se presenta un aumento en sangre y en los monocitos de ROS de cinco veces, en comparación con sujetos sanos. A los radicales libres se les atribuye el daño articular dada su función como segundo mensajero en la respuesta inflamatoria e inmunológica. Además, la exposición de las células T a un mayor estrés oxidativo, perpetúa la respuesta inmunitaria anormal. Por otro lado, los radicales libres pueden degradar directamente el cartílago articular, atacando sus proteoglicanos e inhibiendo su síntesis. El daño oxidativo del ácido hialurónico, las proteínas y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad están implicados también en la fisiopatología de ésta. Adicionalmente, se ha relacionado con la mutación de p53 en sinoviocitos similares a fibroblastos derivados de la artritis. Por último, se ha asociado a una disminución de tocoferoles, β -carotenos, retinoides y de la baja actividad de la enzima superóxido dismutasa. Al estrés oxidativo crónico en la membrana sinovial se le ha atribuido el aumento de la presión intraarticular, induciendo ciclos repetitivos de hipoxia / reoxigenación (68, 69).

DIABETES MELLITUS: Como parte de las enfermedades metabólicas existe una relación directa en la patogénesis, evolución y/o complicaciones derivado de la sobreproducción de ERO. El aumento en la concentración de glucosa intracelular induce un incremento en la glucólisis y consiguiente formación de piruvato, de esta manera se aumenta la producción de cofactores reducidos del ciclo de ácidos tricarbónicos, aumentando la cadena respiratoria y la formación de radicales libres además de favorecer la glicación directa de las proteínas (70).

ENVEJECIMIENTO: El envejecimiento es un proceso caracterizado por la pérdida progresiva de la función de los tejidos y órganos. Las especies reactivas de oxígeno están directamente relacionadas con la teoría del estrés oxidativo del envejecimiento dada la acumulación de daños inducidos por ROS. Están involucrados en varias condiciones relacionadas con la edad como la sarcopenia, enfermedades metabólicas, entre otras (71).

Recordemos que los radicales libres son un subproducto del metabolismo de los alimentos, de la respiración y del ejercicio físico; pero asimismo consecuencia de la contaminación industrial, del tabaquismo, de las radiaciones, del uso de pesticidas y aditivos alimentarios. Actuando como elementos tóxicos atacando de forma principal las membranas lipídicas celulares, alterando su fluidez y elasticidad, con ruptura de la misma depositando lipofuscina a nivel de la epidermis cutánea, a nivel de las neuronas y en las células miocárdicas. Por último, actúan contra las proteínas, las enzimas, el tejido conectivo y contra el mismo ADN siendo un factor precipitante del envejecimiento en el cual se debe intervenir dados los múltiples factores implicados para su control (72).



Figura 5 : Estrés oxidativo en envejecimiento (Solé,2005)

3.7 COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los compuestos fenólicos son sintetizados por las plantas, estos están constituidos por un grupo hidroxilo unido directamente a un grupo hidrocarburo aromático.

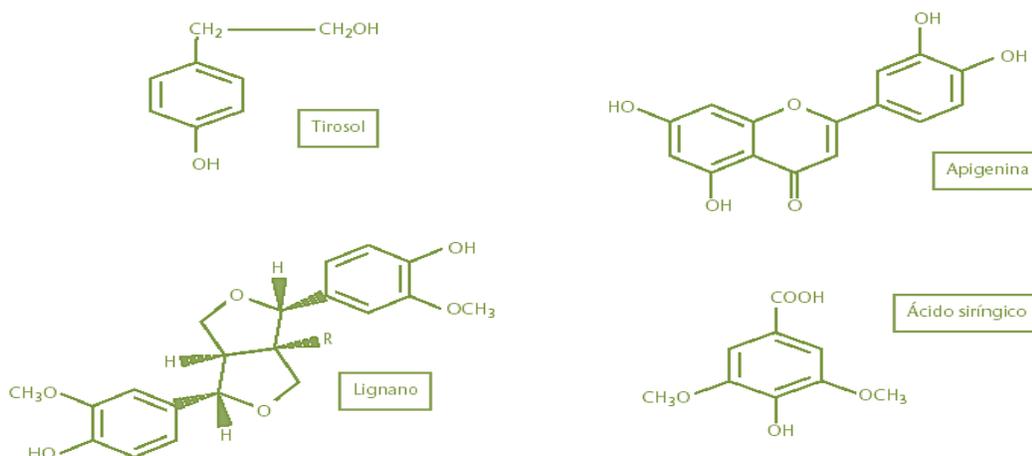


Figura 6 : Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos. (Gimeno, 2004)

Estos se clasifican según su estructura química en 2 grandes grupos.

No flavonoides	Flavonoides
<ul style="list-style-type: none"> • Fenoles no carboxílicos • Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado: • <i>Subgrupos</i>: Antocianos, Flavonas, flavononas, flavanoles, flavanonoles, flavanoles, taninos condensados y lignanos.

Figura 7 : Clasificación de los compuestos fenólicos (Gimeno, 2004)

Dentro del grupo de fenoles son muy importantes los flavonoides, estos son compuestos con una alta actividad antioxidante que están presentes en la mayoría de las plantas. Los flavonoides constituyen las clases más importantes de polifenoles, con más de 5.000 compuestos ya identificados, los cuales no son sintetizados por el cuerpo humano (73).

Los compuestos fenólicos son reconocidos por su importancia e impacto con su acción antioxidante, tanto como captadores de radicales libres como quelantes de metales. El grupo de los flavonoides es el más extendido en la naturaleza y dentro de ellos, los flavonoides son los que poseen una mayor actividad antioxidante (73).

Actividad estrogénica/antiestrogénica
Inhibición de la proliferación celular: inhibición del ciclo celular o inducción de apoptosis en células tumorales
Inhibición del daño oxidativo del ADN
Activación de las enzimas de detoxificación de carcinógenos
Disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)
Disminución del proceso inflamatorio en la placa de ateroma
Inhibición de la agregación plaquetaria
Estimulación de la síntesis de óxido nítrico
Estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial
Actuación como fitoestrógenos(isoflavonas y lignanos)

Tabla 5: Efectos atribuidos a los compuestos fenólicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. (Gimeno, 2004)

La importancia de estos compuestos recae sobre su capacidad de prevenir el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras patologías que afectan de forma ascendente la población (73).

3.8 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

3.8.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

El proceso de extracción es fundamental para la obtención de compuestos bioactivos en plantas y se define como la acción de dividir con un líquido una fracción específica de una muestra, conservando al máximo el resto de los compuestos. Son denominados de la siguiente manera: extracción sólida/líquido; extracción líquida/líquido y extracción gas/líquido (74). Es decir, existen diversos métodos para extraer los principios activos contenidos en una planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo.(75)

Existen diferentes métodos de extracción en la actualidad los cuales se mencionan en la figura 8.



Figura 8: Métodos de extracción de compuestos bioactivos en plantas (Castro,2017)

Teniendo en cuenta el método existen diferentes ventajas y desventajas en cada uno de ellos. A continuación, se exponen algunas de ellas:

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	APLICACIONES
<i>Extracción con solventes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Amplia gama de disolventes (agua, metanol, etanol, hexano, etc.). • Fácil de instalar • Bajo costo de instalación • Se obtiene producto purificado con fluidos supercríticos (CO2) 	<ul style="list-style-type: none"> • Exposición prolongada a disolventes a altas temperaturas • Alto riesgo de degradación de los compuestos • Se requiere una cantidad enorme de disolvente • La purificación posterior al proceso es una necesidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • Semillas de uva • Cáscara de granada
<i>Extracción asistida por microondas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de exposición corto (1-3 minutos) • Menor degradación de los compuestos • Reducción del uso de disolventes 	<ul style="list-style-type: none"> • Procesamiento por lotes • Es necesario un procesamiento posterior 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • Radix astragali • Hypericum perforatum y Thymus vulgaris
<i>Extracción asistida por ultrasonido</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Configuración sencilla y fácil de escalar • No se requiere procesamiento posterior • Aplicación a baja temperatura • Puede ser usado para compuestos termolábiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de extracción largo • Falta de uniformidad en la distribución de las olas 	<ul style="list-style-type: none"> • Té verde • Pulpa de manzana • Saponina del ginseng

Tabla 6: Ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción (Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015)

En el presente estudio fueron utilizados la extracción por disolventes y el método Soxhlet.

3.8.2 EXTRACCIÓN POR DISOLVENTES

Esta técnica separa los compuestos solubles utilizando una matriz líquida que sería el disolvente. Dado que esta técnica permite por medio de la roto-evaporación del extracto que los solventes orgánicos sean posteriormente removidos, se logran aislar los compuestos bioactivos fácilmente. Es una técnica por ello muy utilizada. Inicialmente la absorción del disolvente produce edema del tejido vegetal por acción de la capilaridad por expulsar el aire contenido en el citoplasma. Esto induce un

momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. De esta manera las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente (76).

3.8.3 CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Son importantes las condiciones de extracción puesto que estas actúan directamente en la eficiencia de la extracción y en la calidad obtenida del extracto.

3.8.4 TIPO Y CONCENTRACIÓN DEL DISOLVENTE

Se deben emplear diferentes soluciones debido a que los compuestos bioactivos poseen variadas características y polaridades que pueden o no ser solubles a un solvente en particular, entre las diferentes soluciones acuosas está el etanol, metanol, acetona y acetato de etilo. El disolvente se elegirá de acuerdo a la finalidad de la extracción, en el caso de las plantas se utilizan disolventes con altas polaridades pues se quiere obtener la mayor parte de los compuestos, los disolventes de baja polaridad son más selectivos y se usan para extraer un constituyente determinado (77).

Otros factores a tener en cuenta son: la seguridad, salud ocupacional, medio ambiente, riesgo de impurezas (calidad), punto de ebullición, temperatura de congelación, densidad, reciclabilidad y costo (78).

3.8.5 MÉTODO SOXHLET

Es otro de los métodos de extracción utilizados para obtener compuestos bioactivos en plantas. En su proceso inicialmente se realiza colocación del solvente en un balón. Posteriormente por ebullición el solvente se evapora hasta un condensador a reflujo. Este condensado llega a un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. Posterior a ello, se produce el ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón. Este proceso se repite lo necesario hasta que la muestra se agota. El resultado de la extracción se va concentrando en el balón del solvente (74).

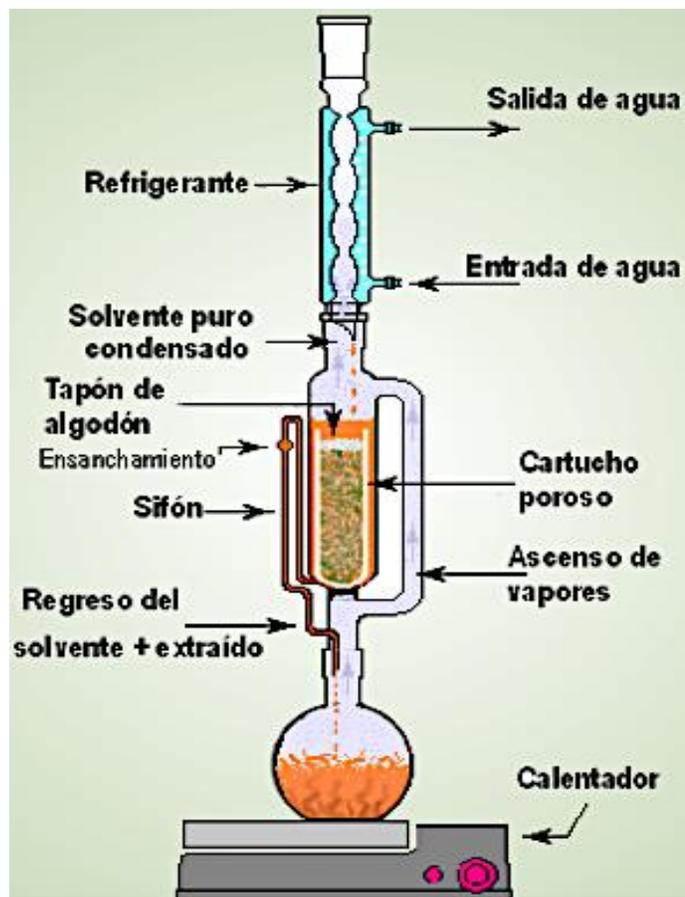


Figura 9: Extracción con método de soxhlet (Nuñez,2020)

3.8.6 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En los últimos años se han descrito múltiples técnicas para evaluar la actividad antioxidante tanto en plantas como en alimentos, a continuación, se describirán las 2 técnicas utilizadas en este trabajo.

- Ensayo de decoloración con radical libre 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH)

Esta técnica se basa en un radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido como DPPH, este radical tiene una gran reactividad por los compuestos antioxidantes pues logra quitar el átomo de hidrógeno de los mismos, durante este proceso cinético se produce una reacción en primera fase muy rápida seguida de una reacción lenta, esta última es atribuida por la disminución en la absorbancia en función del tiempo. Este cambio de coloración es

monitoreado por el espectrofotómetro donde se observa la pérdida de su color violeta inicial (79).



Figura 10: Reacción del DPPH y un antioxidante (Guija et al,2020)

Los resultados de esta prueba se pueden presentar de diferentes maneras, pero la mayoría de los estudios expresan su resultado como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC50), esto demarca la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la cantidad inicial de DPPH al 50%, para los extractos de plantas este valor IC50 cambia en proporción final del DPPH utilizado (79).

- Ensayo de decoloración con el Radical catiónico Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

Este método se basa en la capacidad del ABTS para retener aniones de los radicales de larga vida, los ensayos del ABTS muestran el radical catiónico es oxidado por radicales peróxidos, por persulfato de potasio, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano, entre otros. Este compuesto presenta un color verde-azul y en su medición al reaccionar va disminuyendo su color (80).

Los resultados son expresados como inhibición y luego llevados a una concentración de trolox, este radical presenta solubilidad en medios polares y apolar, no se afecta por la fuerza iónica, por lo que puede ser utilizado para evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos (80).

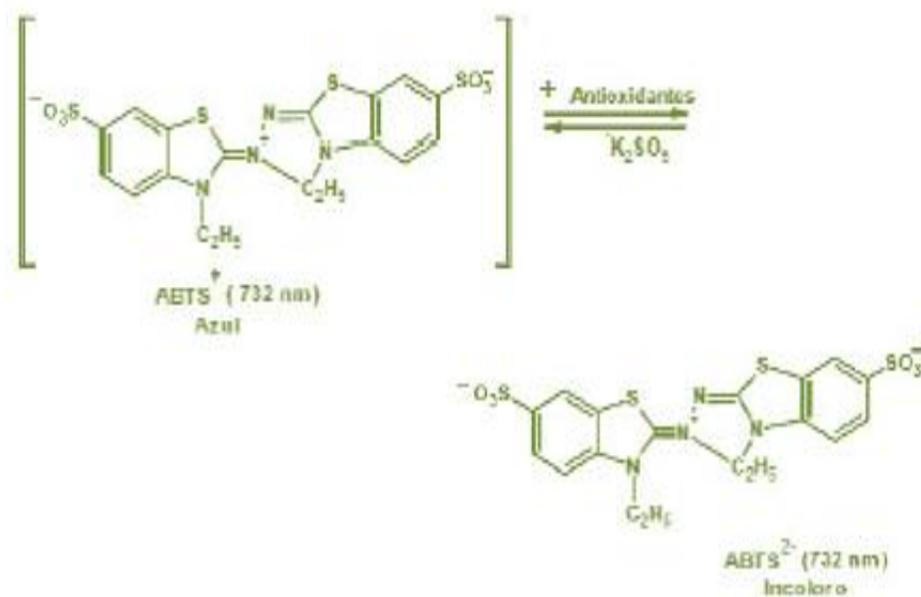


Figura 11: Estructura del ABTS antes y después de la reacción antioxidante. (Bohorquez,2016)

4. METODOLOGÍA

Las etapas en las que se desarrolló este trabajo experimental fueron:

- Selección de materiales, solventes y reactivos.
- Aparatos y equipos empleados.
- Recolección material vegetal.
- Obtención de extractos totales y fracciones.
- Implementación métodos de actividad antioxidante.
- Comparación métodos de AAO – Análisis estadístico.
- Análisis instrumental por HRGC/MSD.

4.1 MATERIALES

SOLVENTES Y REACTIVOS: Todos los solventes fueron grado reactivo de Merck (Darmstadt, Alemania), a saber: Etanol, Acetato de Etilo, Éter de petróleo, Cloroformo y Diclorometano fueron usados en los procesos de extracción, fraccionamiento e implementación de métodos de actividad antioxidante.

Los compuestos patrón fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA), tales como:

- Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS).
- Radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH•).
- Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX).
- Ácido ascórbico (Vitamina C).
- Persulfato de potasio.
- Rutina (rutósido, quercetin-3-rutinósido)

MATERIALES

- Columnas en vidrio (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA).
- Plancha de calentamiento y agitación magnética IKA (MS1 S1, Wilmintong, USA).
- Viales de 3.0 y 5.0 mL.
- Tubos cónicos de polipropileno de 1.5 mL,
- Equipo de extracción Soxhlet sólido-líquido modo continuo (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA).
- Micro jeringa de 10 μ L (Hewlett-Packard)
- Cubetas en cuarzo 10 x 10 x 45 mm
- Frascos de 50, 250 y 500 mL (Schott, Hofheim, Alemania)
- Pipetas volumétricas y aforadas de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL, balones aforados de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL, vasos de precipitados de 50, 100, 250, 600 y 1000 mL (Schott, Hofheim, Alemania).

4.2 APARATOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

1. pH metro Oyster (Extech Instruments, USA).
2. Baño ultrasonido con calentamiento (LC 20H. Elma, Alemania)
3. Balanza analítica Mettler Toledo AG160 \pm 0.1 mg.
4. Micropipetas de 1-10, 10-100, 100-1000 μ L (Eppendorf Research. Alemania).
5. Espectrofotómetro Sanyo SP50.
6. Masas Agilent Technologies 5975B VL MSD.
7. Series II Network GC System, equipado con Detector Selectivo de Masas Agilent Technologies 5975B VL MSD; y operado bajo las siguientes condiciones:

4.3 MÉTODOS

4.3.1 RECOLECCIÓN MATERIAL VEGETAL

Las muestras de material vegetal fueron recolectadas en Mogambo Sendero Ambiental, ubicado en Viotá Cundinamarca provincia del Tequendama a 90 km de Bogotá; su altitud es de 1310 msnm, su temperatura promedio anual es de 20.5° C, el año se divide en 4 temporadas, 2 de lluvia y 2 de verano. Es un ecosistema de bosque húmedo ubicado en el pie de montaña, bajo el código plus (código postal) CG78+QW, allí se realizó toma de 5 Kg de hojas frescas de *Ilex guayusa* L. (81)

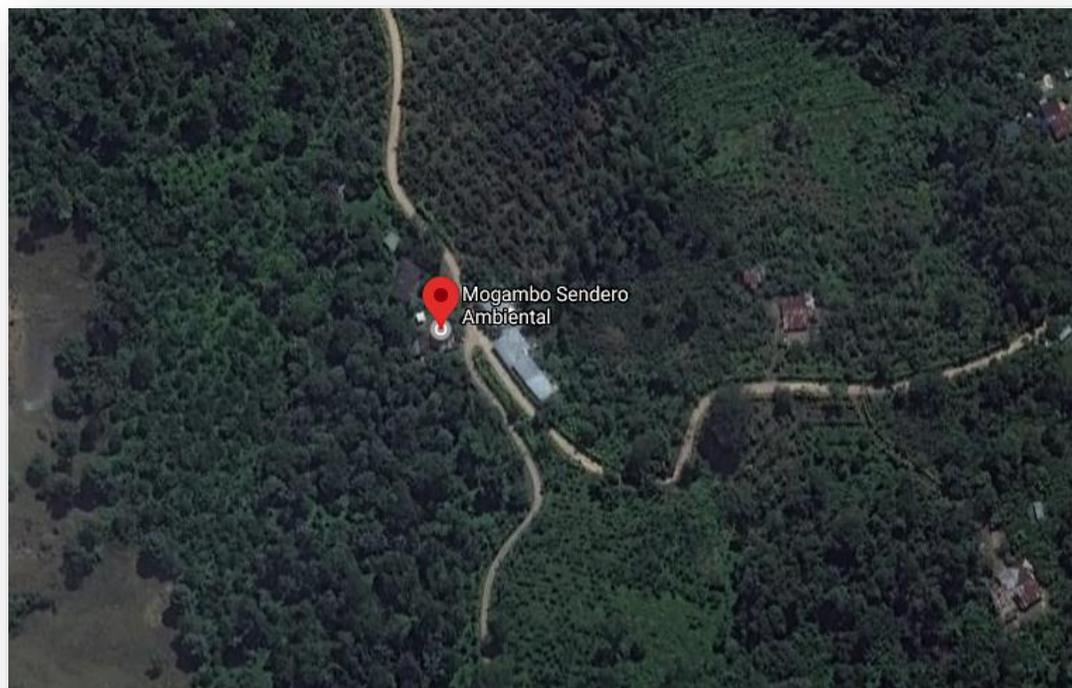


Figura 12: Sendero ambiental Mogambo (Recolección de material vegetal *Ilex guayusa* Loes) (Barreto et al, 2019)



Figura 13: Hojas de *Ilex guayusa* L. (Arias, 2018)

Las muestras fueron secadas al medio ambiente durante aproximadamente 3 días, hasta obtener una humedad aproximada entre el 7 y 15 %. Posteriormente, las muestras fueron trituradas en molino de cuchillas para reducir el tamaño de partícula hasta aproximadamente 5 mm, para posteriormente realizar los procesos de extracción de metabolitos secundarios.

4.3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES TOTALES

El material vegetal seco (hojas), entre 40 y 600 gramos, fue sometido a extracción sólido-líquido por la técnica soxhlet, durante 10-15 días, para obtener los extractos totales en Etanol (EtOH).

Posteriormente fueron realizadas extracciones parciales líquido-líquido modo continuo (fraccionamiento), durante 10-15 días, con diferentes polaridades, mediante el uso de solventes (aprox. 2 litros) como éter de petróleo, diclorometano y etanol/butanol; los extractos fueron concentrados mediante el uso de vacío (rota evaporadora) a 40°C.



Figura 14: Extractos de *Ilex guayusa* Loes en roto evaporación

4.3.3 IMPLEMENTACIÓN MÉTODOS ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

De acuerdo con la revisión de la literatura hecha se tomaron como métodos de valoración los siguientes:

4.3.4 MÉTODO DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS^{•+}

En los extractos totales y parciales la actividad antioxidante fue determinada por el método ABTS donde la solución stock fue preparada solubilizando 20 mg de ABTS en 10 mL de agua desionizada, luego fueron adicionados 2.45 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈); la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 hrs en la oscuridad. Luego fueron preparadas soluciones de trabajo en MeOH, logrando una absorbancia en 0.70 ± 0.02 a 744 nm en un espectrofotómetro Sanyo SP50 y usando cubetas de cuarzo de 10 x 10 x 45 mm (83).

Al adicionar un compuesto antioxidante, la solución de ABTS^{•+} pierde su color azul-verde hasta llegar a ser incolora, disminuyendo la absorbancia de la solución, que es medida a 744 nm, la cual se expresa como porcentaje de inhibición. Ver ecuación (84).

$$\% \text{.Inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100$$

Donde:

A inicial = Absorbancia al minuto 0 (t0) sin adición de alícuota

A final = Absorbancia al minuto 6 (t6) después de agregar alícuota del posible antioxidante, estado estacionario.

El estado estacionario de la reacción del extracto AAO con el radical cromóforo es donde la absorbancia medida a través del tiempo no cambia, indicando que la reacción ha finalizado y con ello la respectiva AAO.

4.3.5 MÉTODO DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL DPPH•

En la metodología empleada se utilizaron 17.1 mg de DPPH• que fueron solubilizados en 10 mL de MeOH (4.34 mM), luego se prepararon soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de 0.750 ± 0.050 para todos los casos, a una longitud de onda de 514 nm y leídas en un espectrofotómetro Sanyo SP50, usando celdas de cuarzo de 10 x 10 x 45 mm (85, 86).

El radical DPPH•, pierde su color violeta cuando se le adiciona un compuesto antioxidante, se origina la disminución de la absorbancia inicial ocasionando una inhibición, la cual se cuantifica de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{.Inhibición} = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (87)$$

Donde:

Ainicial = Absorbancia al minuto 0 (t0) sin adición de alícuota

Afinal = Absorbancia al minuto 20 (t20) después de agregar alícuota del posible antioxidante, estado estacionario.

El estado estacionario de la reacción del extracto AAO con el radical cromóforo es donde la absorbancia medida a través del tiempo no cambia, indicando que la reacción ha finalizado y con ello la respectiva AAO.

Cuando se llega al estado estacionario se logra el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH• la absorbancia no cambia a través del tiempo, y la propiedad

antioxidante se cuantifica por la cantidad del extracto necesario para reducir la concentración inicial del radical DPPH• al 50% (EC50), (87, 88).

4.3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

La efectividad del método, se encuentra en la equivalencia de los resultados y comparación de los mismos, al compararlo con una sustancia patrón con alta actividad antioxidante como el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E, en el rango de milimolar (mM) entre 0.0 y 1.0 mM.

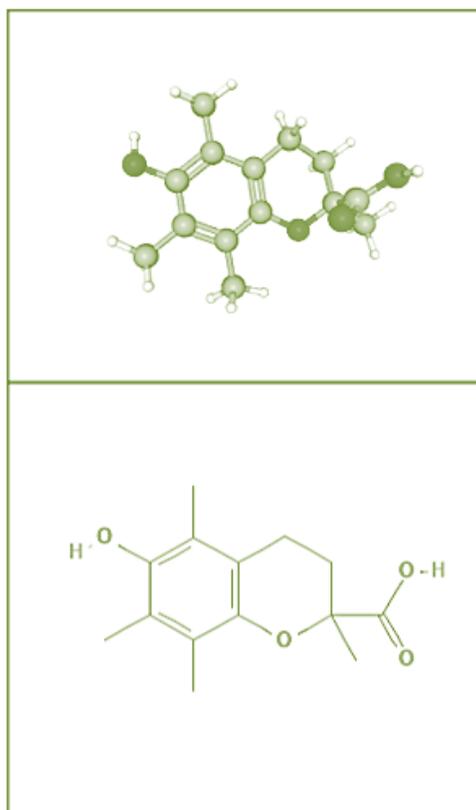


Figura 15: Estructura química del Trolox (Biblioteca Nacional de Medicina,2005)

Este método permite estudiar ampliamente los efectos del pH sobre los mecanismos de los antioxidantes, además de permitir determinar esta actividad en extractos hidrofílicos y lipofílicos. Es soluble en soluciones acuosas y en solventes orgánicos y no se afecta por el valor de la fuerza iónica de la solución. (90).

El método de la Actividad Antioxidante Total (AAT) o actividad Antioxidante Equivalente al Trolox (CAET), conocido como Método del Cation Radical ABTS•, fue avalado en el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes

en el año 2005, fue validado y aplicado a múltiples ensayos dada la alta demanda de publicaciones en el campo de investigación de antioxidantes. (91).

4.3.7 COMPARACIÓN MÉTODOS AAO - ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de Varianza (ANOVA) para contrastar la hipótesis nula (H0) y la hipótesis alterna (H1) fue el método utilizado para analizar los resultados obtenidos en el presente estudio:

H0: 1 (ABTS) = 2 (DPPH) = 3 (DMPD)

H1: Al menos una es diferente.

Sí, la H0 se rechaza, indica que al menos una es diferente aceptando de inmediato la hipótesis alterna H1.

Para identificar cual tratamiento es diferente se procede a evaluar el estadístico de Tukey. Se considera que existen diferencias significativas para una $p < 0,05$ (92)

5. DESARROLLO DEL PROYECTO

5.1 RESULTADOS

La actividad antioxidante de los extractos y fracciones de la especie *Ilex guayusa* Loes (hojas) fue evaluada mediante los métodos de decoloración DPPH y ABTS en un rango de concentraciones de 40 a 200 ppm, los controles positivos se realizaron con Ácido ascórbico y Rutina.

Para los extractos y fracciones evaluados, extracto etanólico total, fracciones en diclorometano, acetato de etilo y etanol, por el método de DPPH, se obtuvieron los siguientes valores de índice de captación media de electrones en ppm (IC50): 23,58 - 414,96 - 64,18 y 4,58 y por el método de ABTS se encontraron los valores de IC50: 10,66 - 93,35 - 32,89 y 3,82, respectivamente. Los valores de IC50 para los controles positivos (Ácido Ascórbico y Rutina), fueron de 0,52 y 9,2 (DPPH) y 0,50 y 6,93 (ABTS).

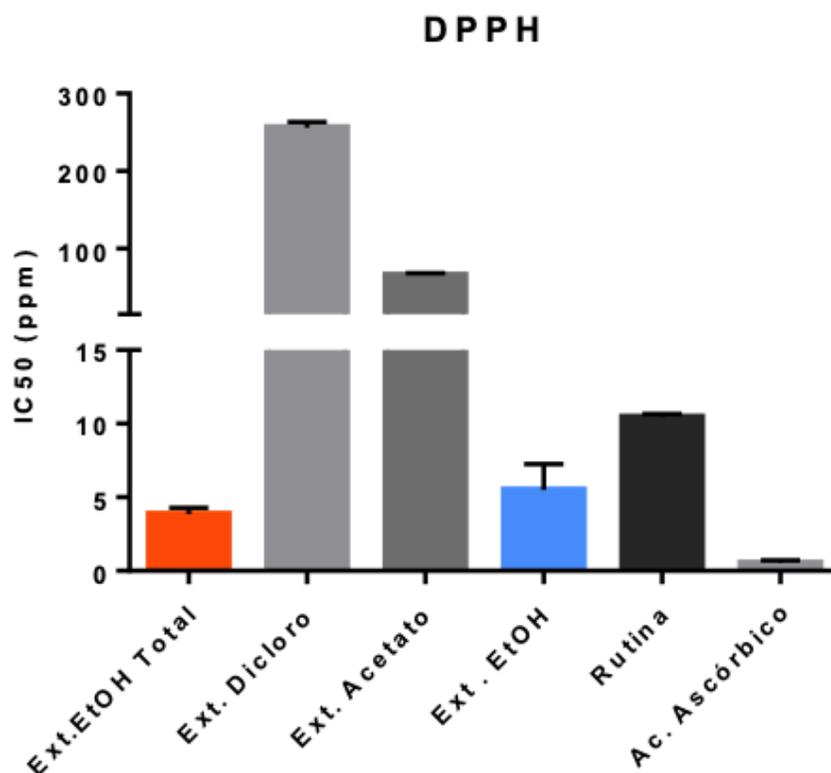
El extracto etanólico de las hojas fue el que presentó mayor actividad antioxidante tanto en el método DPPH como en el ABTS con valores IC50 bajos (4,58 y 3,82). En comparación con los controles positivos, ácido ascórbico y rutina en DPPH presentó una actividad antioxidante relativa (AAR) de 8,7 y 0,5, respectivamente y en ABTS una actividad AAR de 7,5 y 0,6 respectivamente. Valores cercanos a 1 se traducen como un efecto antioxidante mayor. En las tablas 6 y 7 y Graficas 1 y 2, se reporta el resumen de los valores calculados de IC50 por los métodos de DPPH y ABTS, respectivamente.

EXTRACTOS Y PATRONES	INDICE DE CAPTACIÓN DE ELECTRONES 50 DPPH	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE RELATIVA CON RESPECTO AL ÁCIDO ASCÓRBICO	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE RELATIVA CON RESPECTO A LA RUTINA
	IC50	AAR ASCÓRBICO	AAR RUTINA
EXTRACTO DICLOROMETANO	414.966	789.9	45.1
EXTRACTO ACETATO DE ETILO	64.185	122.2	7.0
EXTRACTO ETANOLICO	4.587	8.7	0.5
EXTRACTO ETANOLICO TOTAL	23.580	44.9	2.6
ÁCIDO ASCÓRBICO	0.525	1.0	0.1
RUTINA	9.201	17.5	1.0

Tabla 7. Análisis de extractos con DPPH con sus respectivos IC50, AAR con respecto a ácido ascórbico y la rutina. AAR: actividad antioxidante relativa.

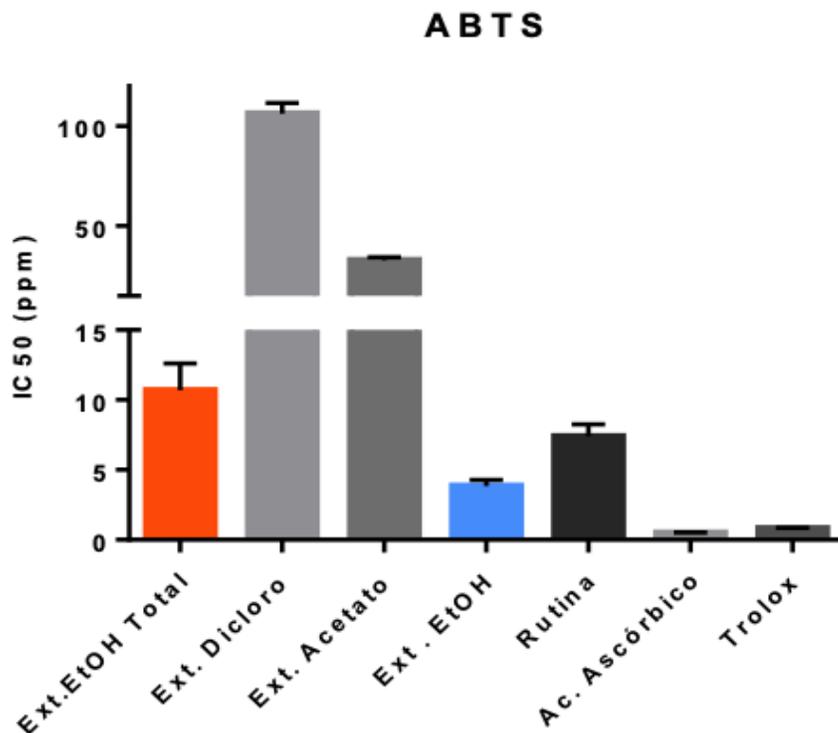
EXTRACTO Y PATRONES	INDICE DE CAPTACIÓN DE ELECTRONES 50 DPPH	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE RELATIVA CON RESPECTO AL ÁCIDO ASCÓRBICO	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE RELATIVA CON RESPECTO A LA RUTINA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE RELATIVA CON RESPECTO AL TROLOX
	IC50	AAR ÁSCORBICO	AAR RUTINA	AAR TROLOX
EXTRACTO DICLOROMETANO	93.351	183.9	13.5	114.5
EXTRACTO ACETATO DE ETILO	32.891	64.8	4.7	40.3
EXTRACTO ETANÓLICO	3.826	7.5	0.6	4.7
EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL	10.668	21.0	1.5	13.1
ÁCIDO ASCÓRBICO	0.508	1.0	0.1	0.6
RUTINA	3.931	13.7	1.0	8.5
TROLOX	0.816	1.6	0.1	1.0

Tabla 8. Análisis de extractos con ABTS con sus respectivos IC50, AAR con respecto a ácido ascórbico y la rutina. AAR: actividad antioxidante relativa.



Gráfica 1. Resultados tratamientos con mayor actividad antioxidante ANOVA DPPH.

En colores naranja y azul se resaltan los tratamientos con mayor actividad antioxidante (menor IC50). Para los extractos etanólico total y etanólico no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles positivos (Rutina y Ácido Ascórbico; ANOVA una vía, tukey ($p > 0,05$)), evidenciándose una actividad antioxidante equivalente.



Grafica 2. Resultados tratamientos con mayor actividad antioxidante ANOVA ABTS.

En colores naranja y azul se resaltan los tratamientos con mayor actividad antioxidante (menor IC₅₀). Para el extracto etanólico no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles positivos (Rutina, Ácido Ascórbico y trolox; ANOVA una vía, tukey ($p > 0,05$)), evidenciándose una actividad antioxidante equivalente.

5.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Para los extractos y fracciones evaluados, extracto etanólico total, fracciones en diclorometano, acetato de etilo y etanol, por el método de DPPH, se obtuvieron los siguientes valores de índice de captación media de electrones en ppm (IC₅₀): 23,58, 414,96, 64,18 y 4,58 y por el método de ABTS se encontraron los valores de IC₅₀: 10,66, 93,35, 32,89 y 3,82, respectivamente. Los valores de IC₅₀ para los controles positivos (Ácido Ascórbico y Rutina), fueron de 0,52 y 9,2 (DPPH) y 0,50 y 6,93 (ABTS).

En el presente estudio se encontró que el extracto etanólico de las hojas obtenido por soxhlet de *Ilex guayusa* L, presentan actividad antioxidante moderada a alta mostrando la mayor actividad con respecto a los demás extractos.

Previas observaciones y estudios sobre la etnobotánica de la especie *Ilex guayusa* L. han evaluado y confirmado su actividad antioxidante además de sus componentes, para sustentar sus usos tradicionales en los pueblos indígenas (36).

El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides ha aumentado el interés en diversas investigaciones durante los últimos años dada su relación con la actividad antioxidante del género *Ilex*. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de los grupos hidroxilo fenólicos (44).

En el 2013 Jara y col. evaluaron la actividad antioxidante de guayusa junto con otras especies, mediante el método de eliminación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidriilo) y el blanqueo de β -caroteno, determinando su importante composición polifenólica y de flavonoides. Mediante diferentes bioensayos Pardau y col. (2017) determinaron la actividad antioxidante del té de guayusa, exponiendo el contenido polifenólico total y determinando la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) entre 1728-2019 $\mu\text{molTE} / \text{g}$ de masa seca. Según los hallazgos de los estudios se concluyó que la guayusa era una buena fuente de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (44,45).

Se determinó para *Ilex guayusa* L. valores para 14 compuestos fenólicos y 5 carotenoides gracias a García-Ruiz et al. (2016; 2017) quienes aplicaron ensayos DPPH y ORAC. Obteniendo como resultado que la actividad antioxidante de esta planta está asociada directamente con el contenido fenólico. En el año 2018, Villacis-Chiriboga y col. con referencia al trabajo de García-Ruiz et al. identificó que las propiedades fenólicas de las hojas de guayusa dependen de la edad de la hoja y el tiempo de cosecha (42).

Otra investigación realizada por Ruiz y Roque 2009, mencionó un ensayo fitoquímico preliminar sobre extractos etanólicos, metanólicos e hidroalcohólicos de *Ilex guayusa* L., el cual evidenció la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos y quinonas (93).

Se requiere aún más estudios para lograr expandir el conocimiento de la bioactividad de guayusa, dado que existe mayor evidencia sobre otras especies como la *Ilex paraguariensis*, la cual reporta ser una fuente importante de polifenoles con contenido moderado de metilxantinas (58 compuestos fenólicos y dos metilxantinas); atribuyendo su alta actividad antioxidante principalmente a su composición polifenólica (Mateos et al 2018). Otras investigaciones han evidenciado que el consumo de infusiones preparadas a partir de *I. paraguariensis*, *I. vomitoria* e *I. kudingcha* contienen un alto poder reductor evidenciado con la técnica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), exhibiendo sus actividades inhibitoras de la peroxidación de lípidos concluyendo su efecto ante el estrés oxidativo; esta revisión de la literatura permite ser el punto de partida para la futura caracterización y relación de las propiedades antioxidantes de guayusa (14,94).

6. CRONOGRAMA

Por medio de una gráfica muestra el periodo de tiempo que empleaste en el desarrollo de tu trabajo.

	FECHA
Problema	Febrero 2019
Pregunta	Marzo 2019 a octubre 2019
Elaboración de proyecto	Octubre de 2019 a marzo 2020
Recolección de datos	Junio/Agosto 2020
Análisis de datos	Septiembre 2020
Resultados	Octubre 2020
Comunicación de resultados	06 Noviembre del 2020

7. CONCLUSIONES

1. Se implementaron métodos de actividad antioxidante mediante ensayos de decoloración del catión radical ABTS y el catión DPPH, para evaluar la actividad antioxidante relativa de los extractos y fracciones de hojas frescas de *Ilex guayusa* Loes.
2. Para los extractos etanólico total y etanólico no se encontraron diferencias significativas con relación a los controles positivos (Rutina y Ácido Ascórbico; ANOVA una vía, tukey ($p>0,05$)), evidenciándose una actividad antioxidante equivalente en el método DPPH.
3. En el método ABTS para el extracto etanólico no se encontraron diferencias significativas con relación a los controles positivos (Rutina, Ácido Ascórbico y trolox; ANOVA una vía, tukey ($p>0,05$)), evidenciándose una actividad antioxidante equivalente.
4. Los extractos etanólicos de *Ilex guayusa* Loes. probados muestran una actividad antioxidante prometedora que está relacionada con el contenido total de compuestos fenólicos como flavonoides; lo anterior sugiere que estos extractos pueden ser usados como coadyudante en diferentes condiciones patológicas en un contexto de estrés oxidativo.
5. Los resultados presentados en este trabajo, demuestran la importancia de conocer científicamente las propiedades biológicas y componentes activos que apoyan el uso tradicional de *Ilex guayusa* L., siendo una guía para futuras investigaciones y aplicaciones.

8. RECOMENDACIONES

1. Los resultados de la AAO evidencian que *Ilex guayusa* Loes posee efectos antioxidantes significativos, por ello se requiere una mayor investigación para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos para evaluar la contribución de cada compuesto a la actividad antioxidante total.
2. Se sugiere continuar la investigación con el efecto antioxidante a nivel celular, ya que se puede obtener estudios promisorios en este campo.
3. Se recomienda realizar estudios futuros sobre el efecto de adicionar extractos de guayusa; puesto que, al ser una fuente natural de antioxidantes podrían reducir la oxidación lipídica previniendo múltiples patologías prevalentes.
4. Se debe evaluar el uso de diferentes otros solventes y explorar la eficiencia de las diferentes técnicas de extracción del contenido de polifenoles y de la actividad antioxidante sobre los extractos de *Ilex guayusa* L.
5. Se recomienda realizar el método DPPH y ABTS expresado como IC50 (gramos de muestra necesaria para inhibir en 50% un gramo de radical) lo que permite la comparación con la evidencia de la literatura con respecto a dichas técnicas.
6. Para una mayor investigación del contenido fenólico de *Ilex guayusa* Loes se recomienda realizar un ensayo cromatográfico que permita evaluar su tipo de polifenoles y cuáles de ellos se degradan fácilmente por la temperatura.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N., Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*.2010;4(8), p.118.
2. Mut-Salud N, Álvarez P, Garrido J, Carrasco E, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;1-19.
3. Adachi, M., Synergistic Effect of Histone Deacetylase Inhibitors FK228 and m-Carboxycinnamic Acid Bis-Hydroxamide with Proteasome Inhibitors PSI and PS-341 against Gastrointestinal Adenocarcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*.2004;10(11), pp.3853-3862.
4. Cardozo Junior E, Morand C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. 2020.
5. K. Kothiyal, S., C. Sati, S., S. M. Rawat, M., D. Sati, M., K. Semwal, D., B. Semwal, R., Sharma, A., Rawat, B. and Kumar, A., Chemical Constituents and Biological Significance of the Genus *Ilex* (Aquifoliaceae). *The Natural Products Journal*. 2012;2(3), pp.212-224.
6. Yuan Y, Pan S, Yang S, Liu y, Xu Q. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex cornuta* on myocardial ischemia injury. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2017;15(2):94-104.
7. Radice M, Scalvenzi L, Sablón Cossio N. *Ilex guayusa* L.: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *Proceedings of Mol2Net 2016, International Conference on Multidisciplinary Sciences*, 2 edición. 2017.
8. Xu D, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1):96.
9. Wojsiat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018.
10. Galina M, Ortiz M, Guerrero M. Estrés oxidativo y antioxidantes. *Av en Investig Agropecu* [Internet]. 2018;22(1):47–61. [Consultado 10 mayo 2020]. Disponible en: <<http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/4.pdf>>
11. Gan RY, Zhang D. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*. 2018;10(11).
12. Cabral E, Cabral S, Medina W, Salas R, Cabaña A, Martín S et al. Core Eudicotiledóneas diversidad vegetal biotaxonomía de spermatofitos. Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. Argentina: Asterideas-Euasterídeas II: Aquifoliales: Aquifoliaceae; 2010.

13. Carranza González E. Aquifoliaceae*. Instituto de Ecología, AC Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. 2004; Fascículo 127.
14. Mateos R, Baeza G, Sarriá B, Bravo L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. Food Chem. 2018; Feb 15;241:232-241.
15. Cuelho CHF, Alves G de AD, Lovatto MO, Bonilha IF, Barbisan F, da Cruz IBM, et al. Topical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. J Photochem Photobiol B Biol; 2018.
16. Fernandes, C.E.F., Scapinello, J., Bohn, A. et al. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. J Food Sci Technol.2017; 54, 98–104.
17. Kungel, P., Correa, V., Corrêa, R., Peralta, R., Soković, M., Calhelha, R., Bracht, A., Ferreira, I. and Peralta, R., Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). International Journal of Biological Macromolecules. ; 2018; 114, pp.1161-1167.
18. Gao H, Liu Z, Wan W, Qu X, Chen M. Aqueous extract of Yerba Mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. Phytother Res.2013;27(8):1225-31.
19. Garcia-Lazaro, R., Lamdan, H., Caligiuri, L., Lorenzo, N., Berengeno, A., Ortega, H., Alonso, D. and Farina, H., In Vitro And In Vivo Antitumor Activity Of Yerba Mate Extract In Colon Cancer Models. 2020.
20. Shanshan, L., Jianping, S., Yanli, L. y Zhong, C., New Triterpenoid Saponins from *Ilex cornuta* and Their Protective Effects against H₂O₂-Induced Myocardial Cell Injury. Revista de química agrícola y alimentaria. 2014 ;(62), págs. 488-496.
21. Kim, J., Kang, W. and Min, H. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Ilex cornuta* Extract Mediated by Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation. Journal of Medicinal Food. 2017;20(10), pp.981-988.
22. Hu, T., He, X. W., & Jiang, J. G. Functional analyses on antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative effects of extracts and compounds from *Ilex latifolia* Thunb., a Chinese bitter tea. Journal of agricultural and food chemistry.2014;62(34), 8608–8615.
23. Kim, J., Jeong, H., Lee, H., Yoo, J., Bae, K. and Seong, Y. Protective effect of *Ilex latifolia*, a major component of “Kudingcha”, against transient focal ischemia-induced neuronal damage in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2011;133(2), pp.558-564.
24. Kim, JY, Lee, HK, Hwang, BY y col. Neuroprotección de *Ilex latifolia* y derivados del ácido cafeoilquínico contra daño excitotóxico e hipóxico de neuronas corticales de rata cultivadas. Arco. Pharm.2012; Res. 35, 1115–1122.

25. Kim, J., Lee, H., Jang, J., Yoo, J. and Seong, Y. *Ilex latifolia* Prevents Amyloid β Protein (25–35)-Induced Memory Impairment by Inhibiting Apoptosis and Tau Phosphorylation in Mice. *Journal of Medicinal Food*.2015; 18(12), pp.1317-1326.
26. Fang X, Li Y, Qiao J, Guo Y and Miao M: Neuroprotective effect of total flavonoids from *Ilex pubescens* against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Med Rep*. 2017; 16: 7439-7449,.
27. Mingsan M, Lihua C, Cun X, Wenyun X. Intervention action of total flavonoids from root of *Ilex pubescens* in cerebral ischemic tolerance with blood stasis. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;(24):729-736
28. Cui WX, Yang J, Chen XQ, Mao Q, Wei XL, Wen XD, et al. Triterpenoid-rich fraction from *Ilex hainanensis* merr. attenuates non-alcoholic fatty liver disease induced by high fat diet in rats. *Am J Chin Med*. 2013.
29. Wang Ruibing, Ye Wencai, Liu Hui y col. Triterpenoids and their Saponins from *Ilex asprella*: Types and Biological Studies. Nueva York: Nova Science Publishers, 2016.
30. Mohadjerani M, Vosoghi Roodgar M. In-vitro Evaluation of Protective Effects on DNA Damage and Antioxidative Activities of *Ilex Spinigera* Loes. Extracts. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2016;15(1):283-292.
31. Mohadjerani M, Vosogui M. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Ilex spinigera*. Department of molecular and cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran. 2013;(15).
32. Pérez J, Cardona W, Urango L, Alzate F, Rojano B, Maldonado M. Aspectos nutricionales y fisicoquímicos de *Ilex Laurina Kunth* (Aquifoliaceae): un estudio comparativo con *Ilex paraguariensis*. *Perspectivas en Nutrición Humana*. 2017;19(1):41-54.
33. Cadena-Carrera S, Tramontin D, Bella Cruz A, Bella Cruz R, Müller J, Hense H. Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019;152:104543.
34. Sequeda-Castañeda L, Modesti Costa G, Celis C, Gamboa F, Gutiérrez S, Luengas P. *Ilex guayusa* Loes. (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plan. *PharmacologyOnLine*. 2016;3:193-202.
35. Arteaga-Crespo Y, Radice M, Bravo-Sanchez L, García-Quintana Y, Scalvenzi L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*. 2020;6(1):e03043.
36. Wise, G. and Negrin, A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019. pp.1-12.
37. Gan R, Zhang D, Wang M, Corke H. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*. 2018;10(11):1682.

38. Castro Carrera L. Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la extracción etanólica de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) [Licenciatura]. Universidad Tecnológica Equinoccial; 2017.
39. Cortez Pinto J. Actividad anti-metastásica y anti-proliferativa de los extractos de plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, en la línea celular MCF7 de cáncer de mama [Licenciatura]. Universidad Técnica de Ambato; 2020.
40. Kapp R, Mendes O, Roy S, McQuate R, Kraska R. General and Genetic Toxicology of guayusa Concentrate (*Ilex guayusa* L.). International Journal of Toxicology. 2016;35(2):222-242.
41. 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 Mar 30;98(5):1927–34.
42. 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 Sep 1;97(12):3929–36.
43. Carrión GN. Aislamiento biodirigido (in vitro) de compuestos antioxidantes y antihiperoglucemiantes a partir de *Ilex guayusa*;2011.
44. Gutierrez M, Jara A, Rodriguez Y, Cornejo J, Cazar M, Astudillo L. Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador. Proceedings of The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry;2013.
45. Pardau MD, Pereira ASP, Apostolides Z, Serem JC, Bester MJ. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. Food Funct. 2017 Dec 1;8(12):4601–10.
46. Cobo Urvina C. Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal in vitro en proteínas de hoja de *Ilex guayusa*. [pregrado]. Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos carrera de ingeniería en alimentos; 2016.
47. Núñez Sellés A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. Revista Cubana de Salud Pública. 2011;37(supl.5):644-660.
48. Ortiz J, Medina M. Estrés oxidativo ¿Un asesino silencioso?. Educación Química. 2020;(31):1-11.
49. Galina M, Ortiz M, Guerrero M. Estrés oxidativo y antioxidantes. Av en Investig Agropecu [Internet]. 2018;22(1):47–61. [Consultado 12 Julio 2020]. Disponible en: <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/4.pdf>
50. Viada E, Gómez L, Campaña I. Estrés oxidativo. Correo Científico Médico. 2017;21(1):171–86.
51. Díaz G, Escobar W, Pizarro E. Estrés Oxidativo Cuando el equilibrio se pierde. Dialnet Revista Motricidad y persona universidad central - facultad de ciencias de la educación. 2020;13(1):45-60.

52. Paredes Salido, F. and Roca Fernandez, J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *OFFARM*, 2002; 21(7), pp.96-100.
53. Mayor Oxilia R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Instituto de Medicina Tropical, Asunción Paraguay. 2010;5(5):23-29.
54. Coronado H Marta, Vega y León Salvador, Gutiérrez T Rey, Vázquez F Marcela, Radilla V Claudia. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev. chil. nutr.* [Internet]. 2015 Jun [citado 2020 Agos 02]; 42(2):206-212. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014&lng=es.http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014.
55. Lopez, A., A, C., Lazarova, Z. y Bañuelos, R., 2012. Antioxidantes, Un Paradigma en el Tratamiento de enfermedades . [en línea] ResearchGate. [Consultado 15 Julio 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Argelia_Lopez-Luna/publication/264233113_Antioxidantes_un_paradigma_en_el_tratamiento_de_enfermedades/links/53d53f600cf228d363ea0852/Antioxidantes-un-ferdades-tratamiento
56. Wojsiat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018
57. Erzurum SC. New insights in oxidant biology in asthma. In: *Annals of the American Thoracic Society*. 2016.
58. Ratliff B, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin M. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016;25(3):119-146.
59. Fernández Agudelo S, Zeledón Corrales N. *Rol del estrés oxidativo en la enfermedad renal crónica*. *Rev.méd.sinerg.* 2020;5(5):e481.
60. Fernández-Sánchez, A.; Madrigal-Santillán, E; Bautista, M.; Esquivel-Soto, J; Morales-González, Á.; Esquivel-Chirino, C.; Durante-Montiel, I.; Sánchez-Rivera, G.; Valadez-Vega, C.; Morales-González, JA. *Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity*. *En t. J. Mol. Sci.* 2011 , 12 , 3117-3132.
61. Bravo L, Mateos R, Sarriá B, Baeza G, Lecumberri E, Ramos S, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia*. 2014 ;Jan;92:219–29
62. Cardozo Junior E, Morand C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. 2020.
63. Gao H, Long Y, Jiang X, Liu Z, Wang D, Zhao Y, Li D, Sun BL. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. *Exp Gerontol*. 2013;Jun;48(6):572-8.
64. Yu S, Yue S, Liu Z, Zhang T, Xiang N, Fu H. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 2020.

65. Garcia-Lazaro, R., Lamdan, H., Caligiuri, L., Lorenzo, N., Berengeno, A., Ortega, H., Alonso, D. and Farina, H., 2020. *In Vitro And In Vivo Antitumor Activity Of Yerba Mate Extract In Colon Cancer Models*. [en línea] Wiley Online Library. [Consultado 12 Agosto 2020]. Disponible en: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.15169>>
66. Noratto G, Kim Y, Talcott S, Mertens-Talcott S. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, *Aquifoliaceae*) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co cells. *Fitoterapia*. 2011;82(4):557-569.
67. Puangpraphant S, Berhow M, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF-κB nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(10):1509-1522.
68. Quinonez-Flores CM, Gonzalez-Chavez SA, Del Rio Najera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. Vol. 2016, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2016.
69. Correa VG, De Sá-Nakanishi AB, Gonçalves GDA, Barros L, Ferreira ICFR, Bracht A, et al. Yerba mate aqueous extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Food Funct*. 2019 Sep 1;10(9):5682–96.
70. Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG, Quintanar Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB Rev Educ bioquímica*. 2013
71. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D et al. Oxidative stress, aging, and diseases [Internet]. *Pubmed*. 2018 [Consultado 12 Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29731617/>
72. Solé B. El envejecimiento, ¿puede retrasarse?. *Revista Mexicana de urología*. 2005;65(2):79-84.
73. Gimeno Creus E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*. 2004;23(6):80-84.
74. Nuñez c. Extracciones con equipo soxhlet [Internet]. *Cenunez.com.ar*. 2020 [Consultado 12 Agosto 2020]. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
75. Carrion Jara A, Garcia Gomez C. “Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica” [licenciatura]. Universidad de Cuenca Facultad de ciencias químicas escuela de bioquímica y farmacia; 2010.
76. Pasrija D, Anandharamakrishnan C. Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2015;8(5):935-950.
77. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 2009;14(6):2167-2180.

78. Prat D, Hayler J, Wells A. A survey of solvent selection guides. *Green Chem.* 2014;16(10):4546-4551.
79. Guija-Poma E, Inocente-Camones M, Ponce-Pardo J, Zarzosa-Norabuena E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*. 2015;15(1):57-60.
80. Bohorquez Fajardo R. Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd [Pregrado Ingeniería Ambiental]. Universidad del bosque; 2016.
81. Barreto H. Ardila J. Cardenas Y, Mogambo sendero ambiental [Internet]. *Diversidadecologicahy.blogspot.com*. 2019 [Consultado 1 Octubre 2020]. Disponible en: <https://diversidadecologicahy.blogspot.com/2019/05/mogambo.html>
82. Arias D. Sendero Ambiental Mogambo [Internet]. *Senderoambientalmogambo.blogspot.com*. 2018. [Consultado 1 Octubre 2020]. Disponible en: <http://senderoambientalmogambo.blogspot.com/2018/>
83. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231-1237.
84. Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2001;127(1):183-198.
85. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
86. Villaño D, Fernández-Pachón M, Moyá M, Troncoso A, García-Parrilla M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 2007;71(1):230-235.
87. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein H. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 2010;3(1):43-53.
88. Chakraborty M, Mitra A. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. *Food Chemistry*. 2008;107(3):994-999.
89. Trolox [Internet]. *Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. 2005. Consultado 12 Julio 2020] Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>
90. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10):4290-4302.
91. Finley J. Introduction: White Papers from the "First International Congress on Antioxidant Methods". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10):4288-4289.
92. Daniel W. *Bioestadística*. México [etc.]: Limusa; 1993.
93. Ruiz JR and Roque MR. Antimicrobial activity of four plants from Peruvian north-east. *Ciencia e Investigación*. 2009, 12(1): 41-47.
94. Boaventura, B.C.; Di Pietro, P.F.; Stefanuto, A.; Klein, G.A.; de Moraes, E.C.; de Andrade, F.; Wazlawik, E.; da Silva, E.L. Association of mate tea (*Ilex*

paraguariensis) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition* 2012, 28, 657–664.

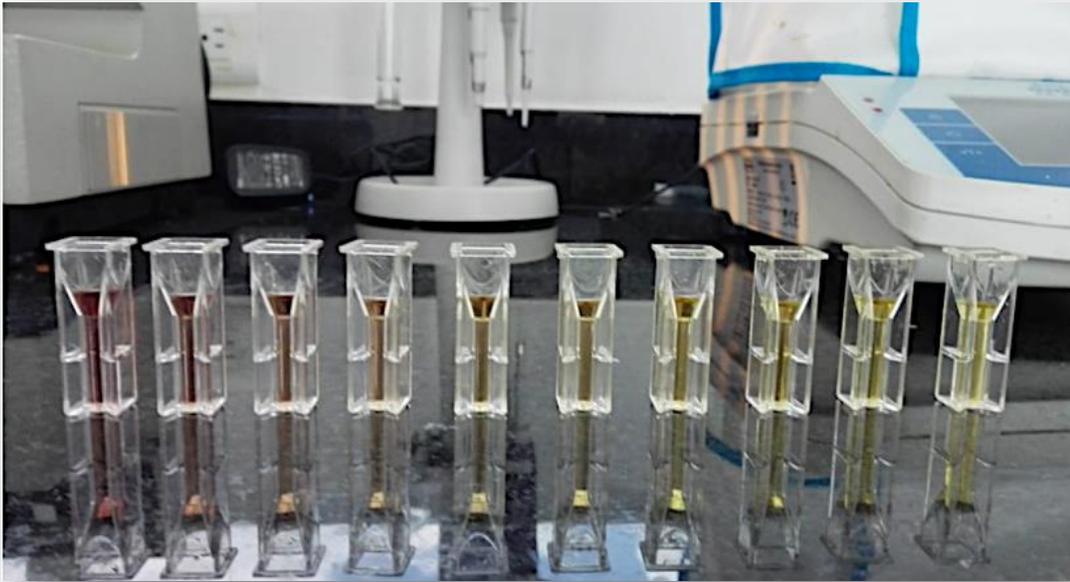
ANEXOS

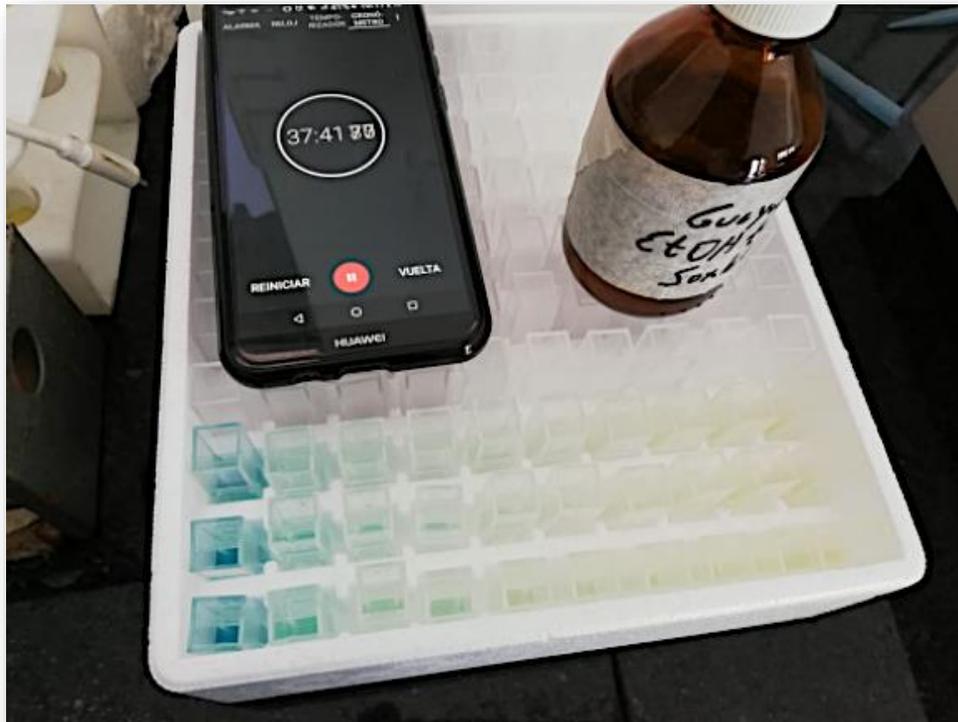
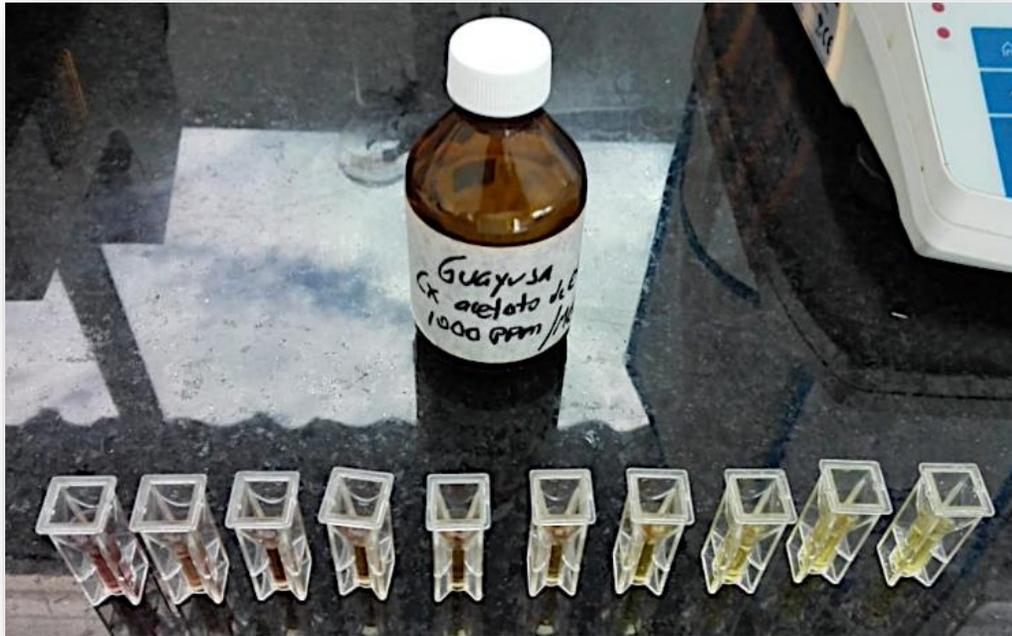


Anexo A. Recolección de material vegetal (*Ilex guayusa* Loes.)



Anexo B. Extracto de *Ilex guayusa* Loes.





Anexo C. Proceso de cuantificación de actividad antioxidante



Anexo D. Extracción por método soxhlet

Number of families	1					
Number of comparisons per family	15					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	
Ext. Dicloro vs. Ext.EtOH Total	252,0	244,5 to 259,5	Yes	****	< 0,0001	B-A
Ext. Acetato vs. Ext.EtOH Total	61,60	54,09 to 69,11	Yes	****	< 0,0001	C-A
Ext . EtOH vs. Ext.EtOH Total	1,666	-5,848 to 9,179	No	ns	0,9790	D-A
Rutina vs. Ext.EtOH Total	6,611	-0,9027 to 14,12	No	ns	0,1039	E-A
Ac. Ascórbico vs. Ext.EtOH Total	-3,303	-10,82 to 4,210	No	ns	0,7282	F-A
Ext. Acetato vs. Ext. Dicloro	-190,4	-197,9 to -182,9	Yes	****	< 0,0001	C-B
Ext . EtOH vs. Ext. Dicloro	-250,3	-257,9 to -242,8	Yes	****	< 0,0001	D-B
Rutina vs. Ext. Dicloro	-245,4	-252,9 to -237,9	Yes	****	< 0,0001	E-B
Ac. Ascórbico vs. Ext. Dicloro	-255,3	-262,8 to -247,8	Yes	****	< 0,0001	F-B
Ext . EtOH vs. Ext. Acetato	-59,94	-67,45 to -52,42	Yes	****	< 0,0001	D-C
Rutina vs. Ext. Acetato	-54,99	-62,50 to -47,48	Yes	****	< 0,0001	E-C
Ac. Ascórbico vs. Ext. Acetato	-64,90	-72,42 to -57,39	Yes	****	< 0,0001	F-C
Rutina vs. Ext . EtOH	4,945	-2,568 to 12,46	No	ns	0,3342	E-D
Ac. Ascórbico vs. Ext . EtOH	-4,969	-12,48 to 2,545	No	ns	0,3295	F-D
Ac. Ascórbico vs. Rutina	-9,914	-17,43 to -2,400	Yes	**	0,0061	F-E

Anexo E. ANOVA DPPH

Number of families	1					
Number of comparisons per family	21					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	
Ext. Dicloro vs. Ext.EtOH Total	95,51	90,31 to 100,7	Yes	****	< 0,0001	B-A
Ext. Acetato vs. Ext.EtOH Total	22,19	16,99 to 27,39	Yes	****	< 0,0001	C-A
Ext . EtOH vs. Ext.EtOH Total	-6,857	-12,06 to -1,658	Yes	**	0,0051	D-A
Rutina vs. Ext.EtOH Total	-3,298	-8,497 to 1,901	No	ns	0,4084	E-A
Ac. Ascórbico vs. Ext.EtOH Total	-10,19	-15,39 to -4,989	Yes	****	< 0,0001	F-A
Trolox vs. Ext.EtOH Total	-9,880	-15,08 to -4,681	Yes	****	< 0,0001	G-A
Ext. Acetato vs. Ext. Dicloro	-73,32	-78,52 to -68,12	Yes	****	< 0,0001	C-B
Ext . EtOH vs. Ext. Dicloro	-102,4	-107,6 to -97,17	Yes	****	< 0,0001	D-B
Rutina vs. Ext. Dicloro	-98,81	-104,0 to -93,61	Yes	****	< 0,0001	E-B
Ac. Ascórbico vs. Ext. Dicloro	-105,7	-110,9 to -100,5	Yes	****	< 0,0001	F-B
Trolox vs. Ext. Dicloro	-105,4	-110,6 to -100,2	Yes	****	< 0,0001	G-B
Ext . EtOH vs. Ext. Acetato	-29,05	-34,25 to -23,85	Yes	****	< 0,0001	D-C
Rutina vs. Ext. Acetato	-25,49	-30,69 to -20,29	Yes	****	< 0,0001	E-C
Ac. Ascórbico vs. Ext. Acetato	-32,38	-37,58 to -27,18	Yes	****	< 0,0001	F-C
Trolox vs. Ext. Acetato	-32,07	-37,27 to -26,87	Yes	****	< 0,0001	G-C
Rutina vs. Ext . EtOH	3,558	-1,641 to 8,757	No	ns	0,3243	E-D
Ac. Ascórbico vs. Ext . EtOH	-3,331	-8,530 to 1,868	No	ns	0,3971	F-D
Trolox vs. Ext . EtOH	-3,024	-8,223 to 2,175	No	ns	0,5073	G-D
Ac. Ascórbico vs. Rutina	-6,890	-12,09 to -1,691	Yes	**	0,0049	F-E
Trolox vs. Rutina	-6,582	-11,78 to -1,383	Yes	**	0,0076	G-E
Trolox vs. Ac. Ascórbico	0,3077	-4,891 to 5,507	No	ns	> 0,9999	G-F

Anexo F. ANOVA ABTS