UEA Agroindustria
PrePrint UEA

Sección Agroindustria
Vol. AGI2324. ep04–204

| Recibido: 15/03/2024 |
| Aceptado: 13/09/2024 |
| Publicado: 12/11/2026 |

# Guayusa soluble liofilizada a partir de extractos acuosos con propiedades antioxidantes

## Freeze-dried soluble guayusa from aqueous extracts with antioxidant properties

Jessica Paola Morales Albán[1], Yasiel Arteaga Crespo[1]

https://doi.org/10.59410/PREPRINT-UEA-vAGI2324ep04-204 Crossref

**Resumen**

El objetivo del presente estudio fue elaborar productos liofilizados hidrosolubles a partir de extractos acuosos de guayusa, tanto en su forma pura como combinada con limón, Jamaica y maracuyá. Se aplicó un diseño tipo Optimal mediante el software Design-Expert para evaluar el efecto del tiempo, relación sólido líquido, potencia y aditivo en la extracción asistida por ultrasonido de cafeína y polifenoles con su actividad antioxidante. La concentración de cafeína se obtuvo mediante el método del patrón externo. El contenido de polifenoles totales se determinó a través del método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante el ensayo Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). Se obtuvieron cuatro productos liofilizados a partir del extracto acuoso conseguido en las condiciones óptimas de extracción. Los parámetros fisicoquímicos evaluados en los productos liofilizados dieron valores de pH (5,11-5,33), humedad (2,80-3,10 %), cenizas (12,83-13,21 %) y solubilidad en agua fría (1,45-1,58 minutos) y caliente (19-21 segundos). Los valores de metales pesados determinados por espectrofotometría de absorción atómica fueron: cobre (1,82-14,91 mg/kg), zinc (20,90-48,20 mg/kg), cadmio (0,01-0,02 mg/kg) y plomo (0,005-0,015 mg/kg). Los resultados obtenidos fueron coherentes con la normativa NTE INEN 1122:2013 relacionada a los requisitos de café soluble obtenido por liofilización. La presente investigación sienta las bases para el desarrollo industrial de un producto hidrosoluble a base de extracto acuoso de las hojas de guayusa rico en cafeína y polifenoles.

**Palabras clave**

actividad antioxidante, cafeína, polifenoles

**Abstract**

The objective of the present study was to prepare water-soluble freeze-dried products from aqueous extracts of guayusa, both in its pure form and combined with lemon, Jamaica and passion fruit. An Optimal type design was applied using the Design-Expert
software to evaluate the effect of time, solid-liquid ratio, power and additive in the ultrasound-assisted extraction of caffeine and polyphenols with their antioxidant activity. The caffeine concentration was obtained using the external standard method. The content of total polyphenols was determined through the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity through the FRAP assay. Four lyophilized products were obtained from the aqueous extract obtained under optimal extraction conditions. The physicochemical parameters evaluated in the lyophilized products gave values of pH (5.11-5.33), humidity (2.80-3.10 %), ash (12,83-13,21 %) and solubility in cold water. (1.45-1.58 minutes) and hot (19-21 seconds). The values of heavy metals determined by atomic absorption spectrophotometry were: copper (1.82-14.91 mg/kg), zinc (20.90-48.20 mg/kg), cadmium (0.01-0.02 mg/kg) and lead (0.005-0.015 mg/kg). The results obtained were consistent with the NTE INEN 1122:2013 regulations related to the requirements of soluble coffee obtained by freeze-drying. The present research lays the foundations for the industrial development of a water-soluble product based on aqueous extract of guayusa leaves rich in caffeine and polyphenols.

**Keywords**

antioxidant activity, caffeine, polyphenol

**Direcciones**

[1]Universidad Estatal AmazónicaMorales Albán. Pastaza, Ecuador. Email: agi2015373@uea.edu.ec, yarteaga@uea.edu.ec,

**Autor para la correspondencia**

Jessica Paola Morales Albán. Universidad Estatal AmazónicaMorales Albán. Pastaza, Ecuador. Email: agi2015373@uea.edu.ec

**Cómo citar**

MORALES ALBÁN, Jessica Paola , ARTEAGA CRESPO, Yasiel and , 2026. Guayusa soluble liofilizada a partir de extractos acuosos con propiedades antioxidantes. PrePrint UEA. Vol. AGI2324. p. ep04–204. https://doi.org/10.59410/PREPRINT-UEA-vAGI2324ep04-204

**Editores Académicos** Willan Orlando Caicedo Quinche

**Editorial** Editorial de la Universidad Estatal Amazónica 2026

**Copyright**

Derechos de autor 2026 | PrePrint UEA.
Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.
Los autores del artículo autorizan a la RACYT a que este artículo sea compartido bajo las condiciones de la Licencia Creative Commons 4.0 (CC-BY 4.0).

# 1. Introducción

**La Amazonía ecuatoriana, destacada por su excepcional biodiversidad, ha capturado la atención de investigadores y empresas en sectores como la alimentación, la cosmética y la farmacología (Gan et al. 2018). La región alberga una riqueza botánica que aún es en gran parte desconocida para la ciencia contemporánea (Mena et al. 2019). Sin embargo, las comunidades indígenas han empleado diversas plantas, como la guayusa, con propósitos terapéuticos y rituales desde tiempos ancestrales (Schuster y Mitchell 2019). La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) de la región amazónica de Ecuador, ha ganado reconocimiento a nivel mundial debido a sus propiedades antioxidantes, energéticas y estimulantes (Noriega et al. 2023).**

Investigadores como Mendoza et al. (2020) y Cuesta-Parra et al. (2018) han explorado los usos etnobotánicos de esta especie identificando evidencias de su uso medicinal y ritual desde la época colonial. Este interés no solo se basa en su

valor cultural, sino también en su potencial económico para la región amazónica ecuatoriana (Washicta-Andi 2020). Se reconoce a esta planta como un recurso prometedor que conecta con la tradición local y puede servir como un vector de sistemas productivos sostenibles que contribuyan a reducir la deforestación (Chianese et al. 2019).

A pesar de la abundante literatura sobre los compuestos polifenólicos y la cafeína como ingredientes activos para alimentos funcionales, medicamentos y cosméticos, y del desarrollo de varios productos a base de guayusa (Luna Fox et al. 2023), ninguno ha logrado alcanzar un alto valor agregado mediante técnicas agroindustriales de vanguardia que garanticen una mayor estabilidad y aprovechamiento.

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo elaborar productos liofilizados hidrosolubles a partir de extractos acuosos de guayusa, tanto en su forma pura como combinada con limón (*citrus limon*), jamaica (*hibiscus sabdariffa*) y maracuyá (*passiflora edulis*), utilizando técnicas de extracción asistida por ultrasonido. Se busca desarrollar productos innovadores con propiedades antioxidantes, que no solo aprovechen las características naturales de guayusa, sino que también ofrezcan alternativas saludables y funcionales para la industria alimentaria y el consumidor final (Villacís-Chiriboga 2017). Este enfoque pretende aportar al conocimiento científico y a la generación de valor en la cadena productiva de la región amazónica ecuatoriana.

# 2. Metodología

### *2.1. Ubicación del experimento y materia prima*

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Bromatología, localizado en el campus principal de la Universidad Estatal Amazónica, ubicado en el kilómetro 2 ½ de la vía hacia Tena, en el cantón y provincia de Pastaza, a una altitud de 940 msnm. La ubicación geográfica es latitud de 00° 59´ -1ƶ a una longitud oeste de 77° 49´0". Las hojas de guayusa, flores de Jamaica, maracuyá y limón fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Puyo.

### *2.2. Obtención de extractos acuosos*

Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido, utilizando un equipo de baño ultrasónico de la marca Wisd.23, modelo WUC-DO6H. Para cada extracción, se procedió a pesar el 95% hojas de guayusa y 5% del aditivo (flores de jamaica, extracto de maracuyá y cáscara de limón), los cuales se depositaron en un balón de vidrio al que se le adicionaron 100 mL de agua destilada. Posteriormente, los balones se introdujeron en el equipo de baño ultrasónico con temperatura de extracción constante (60°C), y se ajustaron las condiciones de trabajo según el diseño experimental establecido. Luego de la extracción, cada extracto resultante se filtró mediante papel Whatman No 4, y se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis.

### *2.3. Cuantificación espectrofotométrica de cafeína*

Para el análisis se alcalinizaron los 100 mL del extracto acuoso con 1 mL de NaOH 0,1M, después se extrajo la cafeína con dos porciones de cloroformo de 15 mL cada una. Finalmente, se mezclaron los extractos clorofórmicos y se evaporó en baño María. Luego se disolvió la cafeína añadiendo 50 mL de agua destilada caliente (60-90°C), se enfrió, se colocó a un matraz aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua destilada. De la disolución anterior, se tomaron 5 mL hacia un matraz aforado de 25 mL, se agregó 1 mL de HCl 0,01 M y se enrasó con agua destilada. Finalmente, la absorbancia de la muestra fue leída a una longitud de onda de 275 nm (Sanabria, Martínez y Baena 2017) y se calculó la concentración de cafeína en la muestra por el método del patrón externo a partir de la **ecuación (1)**.

$$\frac{Cm}{Am} = \frac{Cp}{Ap} \tag{1}$$

Donde, Cm: concentración de la muestra (cafeína), Am: absorbancia de la muestra, Cp: concentración del patrón ($mgL^{-1}$) y Ap: absorbancia del patrón.

### *2.4. Determinación del contenido total de polifenoles*

A partir de la disolución filtrada en caliente, se tomó 1 mL del extracto en un matraz aforado de 10 mL y se agregó 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada y se dejó en reposo por 5 min, posteriormente se adicionó 0,5 mL de carbonato de sodio al 20% y se enrasó con agua destilada; se agitó, se protegió de la luz por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia se midió a 765 nm en el espectrofotómetro (José et al. 2019).

El contenido total de polifenoles se determinó utilizando una curva de calibración de ácido gálico y la concentración de polifenoles totales se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico, para ello se empleó la siguiente ecuación, obtenida a partir del modelo matemático de la recta de calibrado de la **ecuación (2)**.

$$A = 0,0734C - 0,0028 \tag{2}$$

Donde, A: absorbancia de la muestra, C: concentración de la muestra ($mgL^{-1}$)

### *2.5. Determinación de la actividad antioxidante*

Se determinó según el ensayo FRAP, conforme a la metodología de Benzie & Strain (1996). "La formulación del reactivo FRAP se llevó a cabo de la siguiente manera: El reactivo FRAP fue confeccionado siguiendo un riguroso procedimiento. En primera instancia, se elaboró un tampón acetato de 0,3 mM con un ajuste de pH a 3.6. Para tal fin, se cuantificaron 6.1 mg de acetato de sodio trihidratado, se disolvieron en 200 mL de agua, con una dilución de ácido clorhídrico 40 mM, se ajustó el pH y, finalmente, se completó el volumen hasta 250 mL con agua destilada. La solución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) se preparó mediante la pesada precisa de 31.2 mg, los cuales fueron disueltos en ácido clorhídrico 40 mM hasta lograr un volumen de 10 mL. Posteriormente, se formuló una solución de cloruro de hierro III con una concentración de 20 mM, empleando la sal hexahidratada. Se pesaron 135.2 mg y se disolvieron en agua desmineralizada hasta alcanzar 25 mL. Finalmente, cada solución fue combinada en una proporción de 1:1:10 de cloruro de hierro III: TPTZ: buffer de acetato, culminando en la creación del reactivo FRAP.

Las muestras, tras ser debidamente diluidas en una pro-

porción 1:10 v/v con metanol, fueron analizadas de manera inmediata. Se tomaron 0.5 mL de esta disolución de muestra y se introdujeron en un matraz de 10 mL, donde se adicionaron 5 mL de la disolución de FRAP. El volumen fue completado con agua destilada. El conjunto se colocó en reposo en una estufa a 37ºC por 30 minutos, y las absorbancias fueron registradas a 593 nm.

" Los resultados fueron expresaron en gramos equivalentes a Trolox/ 100g de materia seca (g eq. Trólox/100g ms) para ellos se empleó la **ecuación (3)**.

$$C = \frac{A}{0,1879} \tag{3}$$

donde:

A: absorbancia leída en las muestras.

C: concentración de las muestras ($mgL^{-1}$)

*2.6.Obtención del producto liofilizado*

Se obtuvieron cuatro productos liofilizados a partir de los extractos acuosos de guayusa, guayusa-limón, guayusa-maracuyá y guayusa-jamaica, obtenidos en las mejores condiciones de extracción; para ello se utilizó un equipo liofilizador de marca SCANVAC COOLSAFE. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del condensador -110°C, presión 0,105 Torr y tiempo 5 días.

*2.7. Determinación de pH*

Se determinó con la ayuda de un pH-metro, se pesó 1 gramo de la muestra liofilizada, se disolvió en 15 mL de agua destilada y se midió el valor de pH.

*2.8. Determinación del contenido de cenizas totales*

Se pesó 1 g de muestra liofilizada en un crisol, para luego colocarlas en una plancha de calentamiento a 500 °C para carbonizarla, seguidamente se situaron los crisoles en una mufla a una temperatura de 550 °C por un tiempo de 2 horas, después de haberse cumplido el tiempo, con ayuda de pinzas metálicas se procedió a retirar las muestras y se dejó enfriar en un desecador por una 1 hora (Luna-Fox et al. 2023). El cálculo de las cenizas totales se realizó utilizando la **ecuación (4)**.

$$C = \frac{M1 - m}{M2 - 2} \tag{4}$$

Donde, C: porcentaje de cenizas totales, M1: masa del crisol más la muestra incinerada (g), M2: masa del crisol más la muestra fresca (g), m: masa del crisol vacío (g).

*2.9. Determinación de solubilidad en agua caliente y fría*

En caliente: se pesó 1g de muestra liofilizada en un vaso de precipitación de 250 mL y se disolvieron en 100 mL de agua desmineralizada acabada de hervir. Se agitó moderadamente y se registró el tiempo hasta la total disolución, evidenciado visualmente.

En frío: Se realizó de la misma forma que en caliente, pero utilizando agua desmineralizada a 16 °C±2 °C

*2.10. Determinación de metales pesados mediante espectrofotometría de absorción atómica*

Para el tratamiento por digestión se pesó 0,5 g de muestra liofilizada luego se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno (30%) y 7 mL de ácido nítrico concentrado (65%), seguidamente se colocaron los pocillos con las muestras en el equipo de sistema de digestión de muestras asistida por microondas por un tiempo de 50 minutos. Después se colocaron las muestras en matraces de 25 mL y se aforó con ácido nítrico (1 M). Finalmente, se procedió a la respectiva lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la concentración de los metales Cu, Zn, Cd y Pb. Para la cuantificación se utilizó el método de la curva de calibración, a través de la expresión de la **ecuación (5)**.

$$m = \frac{PPM * DFI}{M} \tag{5}$$

Donde, m: concentración del metal a determinar ($mgkg^{-1}$), PPM: concentración de la disolución de ensayo ($mgL^{-1}$), FDI: factor de dilución, M: biomasa de la muestra (g)

*2.11. Análisis estadístico*

Se planteó un diseño tipo Optimal **Tabla 1** utilizando el software desing expert con un total de 32 experimentos. Se evaluó el efecto del tiempo de extracción, relación sólido/líquido, potencia y aditivo sobre la concentración de cafeína, polifenoles y actividad antioxidante en extractos acuosos de guayusa. Para evaluar la significancia estadística ($p<0,05$) de las variables de estudio se realizó un análisis de varianza y las mejores condiciones de extracción se encontraron mediante la metodología de superficie de respuesta. Los resultados experimentales se ajustaron utilizando la siguiente **ecuación polinómica (6)**.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{n} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} \beta_{ij} x_i x_j \tag{6}$$

**Tabla 1 |** Diseño estadístico

| Factores | Niveles | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Símbolo | Bajo | Central | Alto |
| | | -1 | 0 | 1 |
| Tiempo (min) | A | 5 | 17,5 | 30 |
| Sólido/líquido | B | 5 | 10 | 15 |
| Potencia (%) | C | 20 | 35 | 50 |
| Aditivo | D | Limón | Jamaica | Maracuyá |

# 3. Resultados y discusión

Se analizaron tres modelos matemáticos generados por el software Desing Expert **Tabla 2** para cada variable de respuesta y los mejores resultados se encontraron con los polinomios cuadráticos. Los coeficientes de determinación $R^2$encontrados para cafeína, polifenoles y actividad antioxidante fueron 0,9913, 0,9921 y 0,9926 respectivamente, estos valores cercanos a 1 indican una buena validez del modelo.

**Tabla 2 |** Resumen de los modelos polinómicos analizados por el software Design-Expert para la optimización de las variables de respuesta

| Cafeína | Secuencial p-valor | Falta de ajuste p-valor | $R^2$-Ajustado | $R^2$-Predicho | |
|---|---|---|---|---|---|
| Lineal | < 0.0001 | 0,0013 | 0,5947 | 0,4449 | |
| 2FI | 0,0274 | 0,0067 | 0,8140 | 0,1225 | |
| **Cuadrático** | **< 0.0001** | **0,3409** | **0,9730** | **0,8581** | **Sugerido** |
| **Polifenoles** | **Secuencial p-valor** | **Falta de ajuste p-valor** | **$R^2$-Ajustado** | **$R^2$-Predicho** | |
| Lineal | < 0.0001 | 0,0015 | 0,6338 | 0,4984 | |
| 2FI | 0,0175 | 0,0059 | 0,8319 | 0,2071 | |
| **Cuadrático** | **< 0.0001** | **0,3409** | **0,9756** | **0,8717** | **Sugerido** |
| **FRAP** | **Secuencial p-valor** | **Falta de ajuste p-valor** | **$R^2$-Ajustado** | **$R^2$-Predicho** | |
| Lineal | < 0.0001 | 0,0023 | 0,6115 | 0,4679 | |
| 2FI | 0,0116 | 0,0054 | 0,8217 | 0,1589 | |
| **Cuadrático** | **< 0.0001** | **0,3409** | **0,9741** | **0,8639** | **Sugerido** |

El tiempo de extracción, la relación sólido/líquido, potencia y el aditivo ejercieron un efecto significativo positivo sobre el contenido de cafeína, polifenoles y actividad antioxidante de los extractos acuosos. Estos resultados se indican mediante el análisis de varianza ANOVA presentado en la **Tabla 3**. Además, los modelos encontrados para el efecto las variables independientes fueron estadísticamente significativos ($p<0,05$).

Los resultados experimentales de cafeína, polifenoles y actividad antioxidante, y los predichos por los modelos matemáticos fueron calculados y se presentan en la **Figura 1**. La distribución de los puntos confirma la capacidad de los modelos para cubrir todo el intervalo de los datos experimentales, lo que sugiere que los modelos matemáticos pueden aplicarse con éxito.

**Tabla 3** | ANOVA para los modelos cuadráticos (cafeína, polifenoles y actividad antioxidante)

| Cafeína | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F-valor | p-valor | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Modelo** | 15,04 | 21 | 0,7162 | 54,15 | < 0.0001 | significativo |
| A-Tiempo de extra. | 7,77 | 1 | 7,77 | 587,58 | < 0.0001 | |
| B-Relación S/L | 0,9443 | 1 | 0,9443 | 71,39 | < 0.0001 | |
| C-Potencia | 0,1034 | 1 | 0,1034 | 7,82 | 0,0189 | |
| D-Aditivo | 0,3458 | 3 | 0,1153 | 8,71 | 0,0038 | |
| Falta de ajuste | 0,0788 | 5 | 0,0158 | 1,47 | 0,3409 | no significativo |
| Error puro | 0,0535 | 5 | 0,0107 | | | |
| $R^2$ | 0,9913 | | | | | |
| **Polifenoles** | **Suma de cuadrados** | **gl** | **Cuadrados medios** | **F-valor** | **p-valor** | |
| **Modelo** | 16,66 | 21 | 0,7933 | 59,97 | < 0.0001 | significativo |
| A-Tiempo de extra. | 9,21 | 1 | 9,21 | 497,66 | < 0.0001 | |
| B-Relación S/L | 0,6425 | 1 | 0,6425 | 43,32 | < 0.0001 | |
| C-Potencia | 0,2144 | 1 | 0,21444 | 6,29 | 0,0101 | |
| D-Aditivo | 2,13 | 3 | 0,7085 | 53,57 | < 0.0001 | |
| Falta de ajuste | 0,0981 | 5 | 0,0111 | 2,87 | 0,4415 | no significativo |
| Error puro | 0,0619 | 5 | 0,0311 | | | |
| $R^2$ | 0,9921 | | | | | |
| **FRAP** | **Suma de cuadrados** | **gl** | **Cuadrados medios** | **F-valor** | **p-valor** | |
| Modelo | 15,70 | 21 | 0,7474 | 56,51 | < 0.0001 | significativo |
| A-Tiempo de extra. | 8,74 | 1 | 8,74 | 591,66 | < 0.0001 | |
| B-Relación S/L | 0,7441 | 1 | 0,7441 | 88,21 | < 0.0001 | |
| C-Potencia | 0,3334 | 1 | 0,1034 | 7,19 | 0,0189 | |
| D-Aditivo | 1,19 | 3 | 0,3963 | 29,96 | < 0.0001 | |
| Falta de ajuste | 0,0712 | 5 | 0,0183 | 1,21 | 0,3409 | no significativo |
| Pure Error | 0,0331 | 5 | 0,0201 | | | |
| $R^2$ | 0,9926 | | | | | |

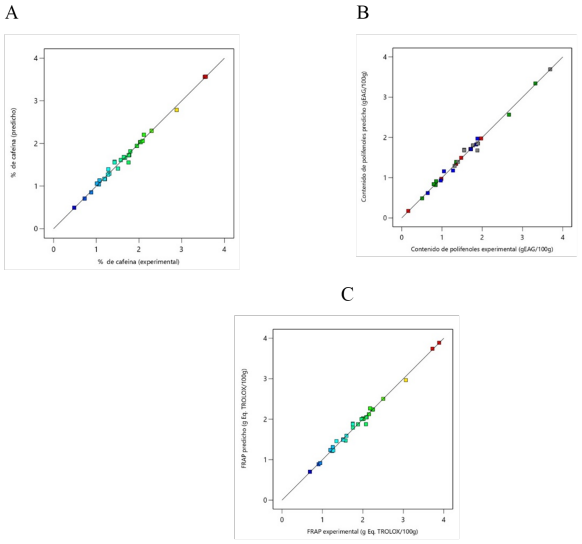


**Figura 1 |** Valores experimentales y predichos de cafeína (A), polifenoles (B) y actividad antioxidante (C).

*3.1. Análisis de la metodología de superficie de respuesta*

La metodología de superficie de respuesta se empleó con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción que maximicen el contenido de cafeína, polifenoles y actividad antioxidante en los extractos acuosos. Los valores óptimos se encontraron mediante el análisis de las gráficas 3D **Figura 2** y los resultados se presentan en la **Tabla 4.**

**Tabla 4 |** Resultados obtenidos en las condiciones óptimas de la extracción asistida por ultrasonido

| Aditivo | Tiempo (min) | Sólido/líquido (m/v) | Potencia (%) | Cafeína (%) | Polifenoles (g EAG/100 g) | A. antioxidante g Eq.Trolox/100 g |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Guayusa | 30 | 15 | 30,5 | 3,56 | 3,69 | 3,89 |
| Limón | 30 | 15 | 49,18 | 3,07 | 2,75 | 3,27 |
| Jamaica | 30 | 15 | 42,02 | 3,65 | 3,43 | 3,83 |
| Maracuyá | 30 | 15 | 40,25 | 2,68 | 2,45 | 2,74 |

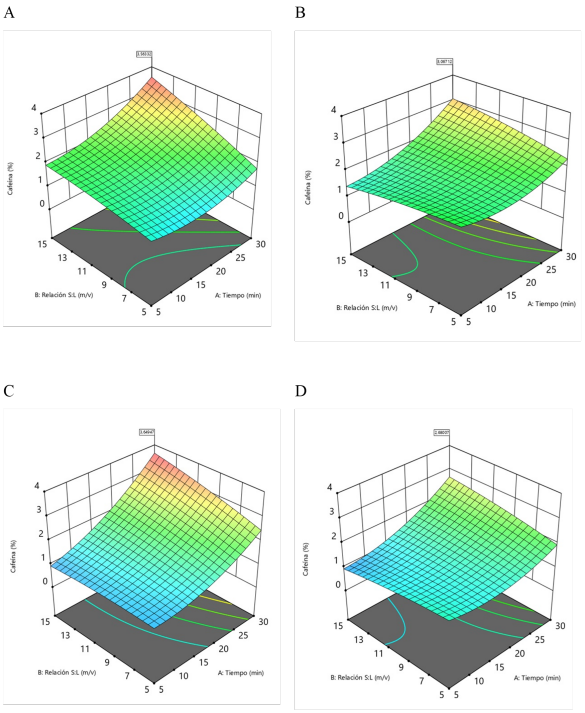


**Figura 2 |** Condiciones óptimas de extracción para guayusa (A), guayusa-limón (B), guayusa-Jamaica (C) y guayusa-Maracuyá (D).

*3.2. Análisis fisicoquímicos de los productos liofilizados*

Los análisis fisicoquímicos **Tabla 5** realizados en los cuatro productos liofilizados mostraron ligeras variaciones. El valor de pH más alto se registró en el liofilizado de guayusa-jamaica (5,33±0,01) mientras que el valor más bajo fue para guayusa-limón (5,11±0,03). El porcentaje de humedad varió entre 2,80±0,15 y 3,10±0,24 % donde el valor máximo fue para el producto guayusa-limón. El mayor contenido de cenizas fue de 13,21±0,19 % encontrado en guayusa y el resultado más bajo fue para guayusa-limón con un valor situado en 12,83±0,32 %. Las pruebas de solubilidad en agua caliente y fría mostraron tiempos bajos, donde el liofilizado guayusa-limón se disolvió más rápido en comparación con los otros liofilizados.

**Tabla 5 |** Parámetros fisicoquímicos de los productos liofilizados

| Producto liofilizado | pH | H (%) | C (%) | SC (s) | SF (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Guayusa** | 5,30±0,01 | 2,91±0,21 | 13,21±0,19 | 21±1 | 1,56±0,26 |
| **Guayusa + limón** | 5,11±0,03 | 3,10±0,24 | 12,83±0,32 | 19±1 | 1,45±0,31 |
| **Guayusa + jamaica** | 5,33±0,01 | 2,80±0,15 | 12,98±0,21 | 24±2 | 1,58±0,12 |
| **Guayusa+maracuyá** | 5,28±0,02 | 2,96±0,10 | 13,18±0,16 | 22±1 | 1,52±0,42 |

H: humedad, C: cenizas, SC: solubilidad en caliente, SF: solubilidad en frío

*3.3. Metales pesados en los productos liofilizados*

El análisis de metales pesados **Tabla 6** en los productos liofilizados reveló concentraciones de cobre de 1,82±0,21 mg/kg para la combinación guayusa-limón y 14,91±0,32 mg/kg para guayusa sola. La máxima concentración de zinc se encontró en la mezcla guayusa-maracuyá (48,20±0,16 mg/kg), en contraste con la mínima concentración registrada en guayusa-jamaica (29,90±0,75 mg/kg). Todos los productos liofilizados evidenciaron valores bajos de cadmio (0,01±0-0,02±0 mg/kg) y plomo (0,005±0-0,015±0 mg/kg). El análisis de varianza (Figura 3) mostró diferencias significativas ($p<0,05$) en la concentración de cadmio (**Figura 3A**) y plomo (**Figura 3C**) en todos los extractos liofilizados. En las muestras de guayusa y guayusa-jamaica no hubo diferencia estadística ($p>0,05$) en la concentración de zinc (**Figura 3B**) y cobre (**Figura 3D**).

**Tabla 6 |** Metales pesados

| Producto Liofilizado | Cobre (mg/kg) | Zinc (mg/kg) | Cadmio (mg/kg) | Plomo (mg(kg) |
|---|---|---|---|---|
| **Guayusa** | 2,33±0,13 | 31,46±0,02 | 0,01±0 | 0,010±0 |
| **Guayusa + Limón** | 14,91±0,32 | 35,24±0,41 | 0,02±0 | 0,005±0 |
| **Guayusa+Jamaica** | 1,82±0,21 | 29,90±0,75 | 0,01±0 | 0,015±0 |
| **Guayusa + Maracuyá** | 10,50±0,28 | 48,20±0,16 | 0,01±0 | 0,006±0 |

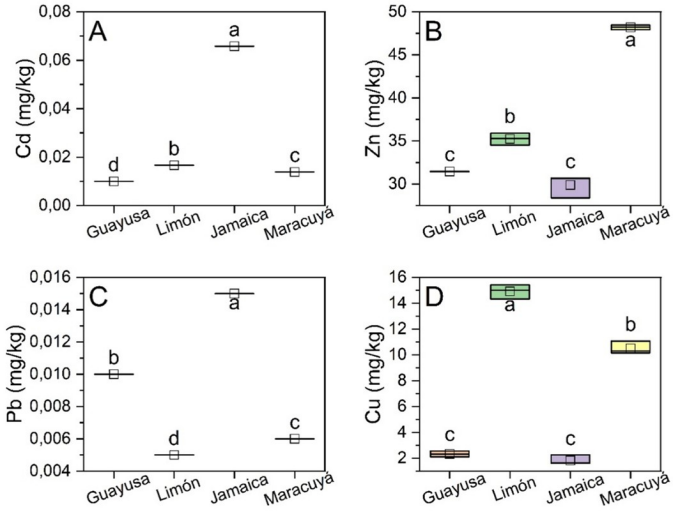


**Figura 3 |** Análisis de varianza (ANOVA) sobre el contenido de metales pesados de las muestras liofilizadas

Diferentes investigadores han reportado el contenido de cafeína presente en hojas de guayusa. Cadena-Carrera et al. (2023) encontraron una concentración de 2,27% en hojas de guayusa mediante HPLC. Los mismos autores Cadena-Carrera et al. (2019) informaron en otra investigación valores de cafeína entre 3-4% obtenida con agua subcrítica. Manzano-Santana et al. (2019) encontraron valores entre 2,98-3,07% de cafeína en hojas secas de guayusa en extractos acuosos obtenidos por decocción. Salazar et al. (2022) encontraron valores situados entre 2,87-3,10%. Los resultados mencionados anteriormente concuerdan con los reportados en la presente investigación. Estudios previos han informado el efecto de la cafeína sobre el rendimiento físico de atletas; por ejemplo, Tandaipan et al. (2023) han indicado que una ingesta diaria de 3 mg/kg de cafeína antes de iniciar la actividad física en deportistas mejora la resistencia física. Peeling et al. (2018) demostraron un aumento en el tiempo de sprint en personas de la tercera edad que ingirieron dosis de cafeína entre 3 y 6 mg/kg. Kizzi et al. (2019) han indicado que la ingesta diario de cafeína en concentraciones de 2,5 a 7,5 mg/kg ayuda a mantener la calidad del rendimiento de los deportistas que compiten frecuentemente. Por otro lado, Ruiz-Moreno et al. (2020) demostraron que la ingesta diaria de 3 mg/kg de cafeína incrementó la presión arterial en un grupo de 20 personas de 30 ± 4 años de edad. En el estudio realizado por Souza et al. (2022) con un grupo de atletas informó que el consumo de dosis de cafeína mayores a 6,1 mg/kg provocó taquicardia, palpitaciones cardiacas y dificultad para conciliar el sueño. Soós et al. (2021) indicaron que la ingesta diaria de dosis de cafeína entre 10-13 mg/kg en un grupo de 50 personas de 26 ± 7 años, provocó efectos secundarios en el sistema gastrointestinal, provocó confusión mental, incapacidad para concentrarse y dificultad para dormir.

Los resultados de compuestos polifenólicos concuerdan con los reportados en estudios previos. Arteaga-Crespo et al. (2020) reportaron valores de polifenoles de 0,49-3,33 g EAG/100 g en hojas secas de guayusa. Cárdenas-Tavera et al. (2022) encontraron concentraciones de polifenoles de 1,9-3,8 g EAG/100 g. Los beneficios de estos compuestos han sido respaldados por diferentes investigaciones. En el estudio desarrollado por Schuster y Mitchell (2019) destacaron el efecto procognitivo del ácido clorogénico mejorando varios parámetros cognitivos en ratas. Rana et al. (2022) destacaron que el consumo de polifenoles en la dieta mejora la presión arterial, inflamación sistémica y los perfiles lipídicos. Bungau et al. (2019) han mencionado que polifenoles como la quercetina y el resveratrol mejoran la salud cardiovascular de las personas. Fraga et al. (2019) han destacado los beneficios de los flavonoides y estilbeno en la reducción del riesgo de accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio y diabetes. Así mismo, mejoran la presión arterial y el flujo sanguíneo.

Otros estudios han destacado la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos presentes en las hojas de guayusa. Cárdenas-Tavera et al. (2022) y Noriega et al. (2023) demostraron las actividad antioxidante mediante los métodos ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). Chóez-Guaranda et al. (2022) y Arteaga-Crespo et al. (2020) demostraron el potencial antioxidante mediante el poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y ABTS. Estos resultados son acordes a los obtenidos en el presente estudio.

Los parámetros fisicoquímicos de los productos liofilizados fueron comparados con los estándares establecidos para el café soluble según la norma NTE INEN 1122: 2013, ya que es el producto más similar disponible tanto a nivel nacional como internacional. La normativa específica que el pH debe estar en un rango de 4,7 a 5,5, el contenido máximo de humedad permitido es del 3,5%, el límite aceptable de cenizas es del 14%, y los tiempos máximos de solubilidad en agua fría y caliente son de 3 minutos y 30 segundos, respectivamente. Los resultados fisicoquímicos obtenidos indican que los productos liofilizados analizados cumplen con los estándares establecidos para el café soluble y, por lo tanto, podrían ser considerados como opciones viables en el mercado de alimentos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que otros aspectos, como el sabor y la aceptabilidad del consumidor, también son relevantes y deben ser evaluados en estudios adicionales.

Los niveles de metales pesados en los productos liofilizados fueron evaluados en comparación con los estándares permitidos según la normativa para el café soluble. Según esta normativa, los niveles de cobre permisibles no deben exceder los 20 mg/kg, la concentración máxima aceptable de zinc es de 50 mg/kg, el contenido de cadmio no debe superar los 0,1 mg/kg, y el límite aceptable más alto para el plomo es de 1 mg/kg. Los resultados obtenidos en este estudio cumplen con estos requisitos. Luna-Fox et al. (2023) reportaron valores similares de cobre, plomo y cadmio, en un producto hidrosoluble de guayusa obtenido mediante *Spray drying*. Este cumplimiento con los estándares establecidos indica que los productos liofilizados analizados no presentan niveles preocupantes de metales pesados, lo que sugiere que son seguros para el consumo humano. La conformidad con estos límites es crucial, ya que la presencia de metales pesados en los alimentos puede representar un riesgo para la salud pública.

# 4. Conclusiones

Los resultados del presente estudio revelaron que los factores de estudio: tiempo, relación sólido líquido, potencia y aditivo tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de cafeína, polifenoles totales y actividad antioxidante en los extractos acuosos de guayusa. Los productos liofilizados de guayusa y guayusa combinada con los extractos acuosos de limón, jamaica y maracuyá obtenidos en las condiciones óptimas de extracción de acuerdo con la metodología de superficie de respuesta presentaron parámetros fisicoquímicos y contenidos de metales pesados acorde los estándares establecidos por la normativa NTE INEN 1122:2013, lo que confirma su seguridad para el consumo humano.

**Contribuciones de los autores:**

**Jessica Paola Morales Albán:** Adquisición y análisis de los datos; redactó el manuscrito, aprobó la versión enviada y la versión sustancialmente editada

**Yasiel Arteaga Crespo:** Concepción del trabbajo; aprobó la versión enviada y la versión sustancialmente editada

Todos los autores aporbaron la version enviada y editada.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

# 5. Referencias


ARTEAGA-CRESPO, Y., RADICE, M., BRAVO-SANCHEZ, L., GARCÍA-QUINTANA, Y. y SCALVENZI, L., 2020. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from Ilex guayusa Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* [en línea], vol. 6, [consulta: 14 marzo 2024]. DOI 10.1016/j.heliyon.2019.e03043. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043.

BENZIE, I. y STRAIN, J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, ISSN 0003-2697. DOI 10.1006/ABIO.1996.0292.

BUNGAU, S., ABDEL-DAIM, M.M., TIT, D.M., GHANEM, E., SATO, S., MARUYAMA-INOUE, M., YAMANE, S. y KADONOSONO, K., 2019. Health Benefits of Polyphenols and Carotenoids in Age-Related Eye Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 3, no. 6, ISSN 19420994. DOI 10.1155/2019/9783429.

CADENA-CARRERA, S., TRAMONTIN, D.P., BELLA CRUZ, A., BELLA CRUZ, R.C., MÜLLER, J.M. y HENSE, H., 2019. Biological activity of extracts from guayusa leaves (Ilex guayusa Loes.) obtained by supercritical CO2 and ethanol as cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 152, ISSN 0896-8446. DOI 10.1016/J.SUPFLU.2019.104543.

CADENA-CARRERA, S., TRAMONTIN, D.P., JACQUES, R., SCAPIN, E., MÜLLER, J.M. y HENSE, H., 2023. Green-based methods to obtain bioactive compounds from Ilex guayusa Loes. using polar solvent. *Natural Product Research* [en línea], vol. 37, no. 18, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 14786427. DOI 10.1080/14786419.2022.2140802. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2022.2140802.

CÁRDENAS-TAVERA, C.F., CASTAÑEDA-VILLATE, J.C., HERNÁNDEZ-ROA, M.J. y RODRÍGUEZ-AGUIRRE, O.E., 2022. High polarity extracts obtained from Ilex guayusa Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity. *Vitae* [en línea], vol. 29, no. 1, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 0121-4004. DOI 10.17533/UDEA.VITAE.V29N1A347297. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042022000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

CHIANESE, G., GOLIN-PACHECO, S., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., COLLADO, J., MUNOZ, E., APPENDINO, G. y POLLASTRO, F., 2019. Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. *Food Research International*, vol. 115, ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/J.FOODRES.2018.10.005.

CHÓEZ-GUARANDA, I., VITERI-ESPINOZA, R., BARRAGÁN-LUCAS, A., QUIJANO-AVILÉS, M. y MANZANO, P., 2022. Effect of solvent-solvent partition on antioxidant activity and GC-MS profile of Ilex guayusa Loes. leaves extract and fractions. *Natural Product Research* [en línea], vol. 36, no. 6, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 14786427. DOI 10.1080/14786419.2021.1882455. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2021.1882455.

CUESTA-PARRA, D.M., CORREA-MAHECHA, F., CUESTA-PARRA, D.M. y CORREA-MAHECHA, F., 2018. Obtención de fenoles a partir de granos verdes de café. *Revista ION* [en línea], vol. 31, no. 1, [consulta: 13 enero 2022]. ISSN 0120-100X. DOI 10.18273/REVION.V31N1-2018005. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-100X2018000100031&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

FRAGA, C.G., CROFT, K.D., KENNEDY, D.O. y TOMÁS-BARBERÁN, F.A., 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function* [en línea], vol. 10, no. 2, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 2042650X. DOI 10.1039/C8FO01997E. Disponible en: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/fo/c8fo01997e.

GAN, R., ZHANG, D., WANG, M. y CORKE, H., 2018. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus Ilex, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients* [en línea], vol. 10, no. 11, [consulta: 21 marzo 2023]. ISSN 2072-6643. DOI 10.3390/NU10111682. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30400635/.

INEN1122:2013, 2013. Café solube: Requisitos. *Norma Técnica Ecuatoriana* [en línea]. [consulta: 27 marzo 2024]. Disponible en: https://docplayer.es/21473111-Cafe-soluble-requisitos.html#google_vignette.

JOSÉ, H., MENDOZA, M., ENRIQUE, R., SOLÓRZANO, B. y GAVILANES-LÓPEZ, P., 2019. Evaluación de procedimientos operativos estandarizados y de saneamiento en el faenamiento de cerdos. *Revista ESPAMCIENCIA, ISSN-e 1390-8103, Vol. 10, N$^{o}$. 2, 2019 (Ejemplar dedicado a: REVISTA ESPAMCIENCIA 2019), págs. 58-62* [en línea], vol. 10, no. 2, [consulta: 10 agosto 2023]. ISSN 1390-8103. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8278206&info=resumen&idioma=SPA.

KIZZI, J., SUM, A., HOUSTON, F.E. y HAYES, L.D., 2019. Influence of a caffeine mouth rinse on sprint cycling following glycogen depletion. *European journal of sport science* [en línea], vol. 16, no. 8, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 1536-7290. DOI 10.1080/17461391.2016.1165739. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27686403/.

LUNA-FOX, S.B., ÁLVAREZ-CASTRO, R.R., PEÑAFIEL-BONILLA, N.J., RADICE, M., SCALVENZI, L., ARTEAGA-CRESPO, Y., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, O.D. y BRAVO-SÁNCHEZ, L.R., 2023. Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de Ilex guayusa Loes. *La Técnica Revista de las Agrociencias*, vol. 13, no. 1, ISSN 1390-6895. DOI 10.33936/LATECNICA.V13I1.5725.

LUNA FOX, S.B., ÁLVAREZ CASTRO, R.R., PEÑAFIEL-BONILLA, N.J., RADICE, M., SCALVENZI, L., ARTEAGA CRESPO, Y., LÓPEZ HERNÁNDEZ, O.D. y BRAVO SÁNCHEZ, L.R., 2023. Elaboración de un preparado hidrosoluble en forma de sólido pulverulento a partir de Ilex guayusa Loes. *La Técnica Revista de las Agrociencias ISSN 2477-8982*, vol. 13, no. 1, ISSN 1390-6895. DOI 10.33936/latecnica.v13i1.5725.

MANZANO-SANTANA, P., QUIJANO-AVILÉS, M., CHÓEZ-GUARANDA, I., BARRAGÁN, A., VITERI-ESPINOZA, R., MARTÍNEZ, D., CAMACHO, C. y MIRANDA -MARTÍNEZ, M., 2019. Effect of drying methods on physical and chemical properties of Ilex guayusa leaves. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* [en línea], vol. 71, no. 3, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 0304-2847. DOI 10.15446/RFNAM.V71N3.71667. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472018000308617&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

MENDOZA, Y., MORALES, P., SÁNCHEZ, J. y PATIÑO, J., 2020. Componentes bioactivos del tomate y su posible poder antimicrobiano: estudio in vitro. *Revista Cubana de Medicina Natural y Tradicional* [en línea], vol. 3,

no. 1, Disponible en: https://orcid.org/0000-0003-1551-5229.

NORIEGA, P., LARENAS, C., NADAL, A., FONSECA, R., SILVA, M., CALDER&ON, L. y MOSQUERA, T., 2023. Valuation study on the extracts of Ilex guayusa Loes. as an antioxidant and anti-aging raw material. *Journal of Medicinal Plants Research* [en línea], vol. 17, no. 1, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 1996-0875. DOI 10.5897/JMPR2022.7265. Disponible en: https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/FA7703570276.

PAOLA ANDREA MENA SILVA, L., YENNY CATHERINE LINAREZ GONZÁLEZ, L., LISET CAMAÑO CARBALLO, L. y ERICKA FERNANDA MEDINA VARGAS, L., 2019. La pigmentación de las resinas microhíbridas Z250 al estar en contacto con bebidas energizantes naturales a base de cafeína. *Dilemas contemporáneos: Educación, Política y Valores* [en línea], [consulta: 4 julio 2022]. ISSN 2007-7890. DOI 10.46377/DILEMAS.V31I1.1234. Disponible en: https://dilemascontemporaneoseducacionpoliticayvalores.com/index.php/dilemas/article/view/1234.

PEELING, P., BINNIE, M.J., GOODS, P.S.R., SIM, M. y BURKE, L.M., 2018. Evidence-based supplements for the enhancement of athletic performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, vol. 28, no. 2, ISSN 15432742. DOI 10.1123/ijsnem.2017-0343.

RANA, A., SAMTIYA, M., DHEWA, T., MISHRA, V. y ALUKO, R.E., 2022. Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry* [en línea], vol. 46, no. 10, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 1745-4514. DOI 10.1111/JFBC.14264. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfbc.14264.

RUIZ-MORENO, C., LARA, B., SALINERO, J.J., BRITO DE SOUZA, D., ORDOVÁS, J.M. y DEL COSO, J., 2020. Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine. *European Journal of Nutrition* [en línea], vol. 59, no. 7, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 14366215. DOI 10.1007/S00394-019-02167-2/METRICS. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-019-02167-2.

SALAZAR, E., LÓPEZ, G., RAMÍREZ, T. y URRUTIA, M., 2022. Vista de Determinación de las propiedades físicas y químicas de una bebida energizante natural a base de hojas de Guayusa. *JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH* [en línea], vol. 7, no. 2, [consulta: 14 marzo 2024]. Disponible en: https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/2834/2335.

SANABRIA, L., MARTÍNEZ, J. y BAENA, Y., 2017. Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* [en línea], vol. 46, no. 2, [consulta: 20 marzo 2023]. ISSN 0034-7418. DOI 10.15446/RCCIQUIFA.V46N2.67956. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182017000200202&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

SCHUSTER, J. y MITCHELL, Ellen, 2019. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 89, ISSN 0278-5846. DOI 10.1016/J.PNPBP.2018.09.005.

SCHUSTER, J. y MITCHELL, Ellen S., 2019. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 89, ISSN 0278-5846. DOI 10.1016/J.PNPBP.2018.09.005.

SOÓS, R., GYEBROVSZKI, Á., TÓTH, Á., JEGES, S. y WILHELM, M., 2021. Effects of Caffeine and Caffeinated Beverages in Children, Adolescents and Young Adults: Short Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [en línea], vol. 18, no. 23, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 1660-4601. DOI 10.3390/IJERPH182312389. Disponible en: https://www.mdpi.com/1660-4601/18/23/12389/htm.

SOUZA, J.G., DEL COSO, J., FONSECA, F. de S. y SILVA, B.V.C., 2022. Risk or benefit? Side effects of caffeine supplementation in sport: a systematic review. *European Journal of Nutrition* [en línea], vol. 61, no. 8, [consulta: 14 marzo 2024]. ISSN 14366215. DOI 10.1007/S00394-022-02874-3/METRICS. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-022-02874-3.

TANDAIPAN, J., GUILLÉN-DEL CASTILLO, A., SIMEÓN-AZNAR, C.P., CARREIRA, P.E., DE LA PUENTE, C., NARVÁEZ, J., LLUCH, J., RUBIO-RIVAS, M., ALEGRE-SANCHO, J.J., BONILLA, G., MORIANO, C., CASAFONT-SOLE, I., GARCÍA-VICUÑA, R., ORTIZ-SANTAMARÍA, V., RIERA, E., ATIENZA-MATEO, B., BLANCO, R., GALISTEO, C., GONZALEZ-MARTIN, J.J., PEGO-REIGOSA, J.M., PROS, A., HEREDIA, S. y CASTELLVÍ, I., 2023. Immunoglobulins in systemic sclerosis management. A large multicenter experience. *Autoimmunity Reviews*, vol. 22, no. 11, ISSN 18730183. DOI 10.1016/j.autrev.2023.103441.

VILLACÍS CHIRIBOGA, J., 2017. Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (Ilex Guayusa Loes). *Etnobiología* [en línea], vol. 15, no. 3, [consulta: 25 septiembre 2021]. ISSN 1665-2703. Disponible en: https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/129.

WASHICTA-ANDI, E.M., 2020. *Estudio de las tradiciones culinarias del cantón Arajuno provincia de Pastaza* [en línea]. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [consulta: 14 agosto 2023]. Disponible en: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/14187.