

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

PROYECTO DE TESIS



**“AISLAMIENTO DE CAFEÍNA DE LAS HOJAS DE
Ilex nayana (Guayusa Caspi). DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR
MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS Y ESPECTROMÉTRICOS”**

PRESENTADO POR LOS BACHILLERES:

Bach. Alain Da Silva Rodríguez

Bach. Christian Panduro Sánchez

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESOR:

Q.F. Mario Javier De La Cruz Flores

CO ASESOR:

Ing. Julio Arce Hidalgo

IQUITOS-PERÚ

2014

**“AISLAMIENTO DE CAFEÍNA DE LAS HOJAS DE *Ilex nayana* (Guayusa Caspi).
DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR MÉTODOS FISICOQUÍMICOS Y
ESPECTROMÉTRICOS”**

**Bach. Alain Da Silva Rodríguez
Bach. Christian Panduro Sánchez**

RESUMEN

Producto obtenido de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi) de la familia Aquifoliáceae recolectada en el Arboretum de la Facultad de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Fundo de Zungarocha-Puerto Almendras Distrito de San Juan Bautista-Iquitos, Región Loreto-Perú, se ha aislado Cafeína por el Método de Inclusión usando Oxido de Magnesio (MgO), destruyendo el estroma donde se halla retenido con Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) al 10% y recogiénolo en CHCl₃, luego se procedió a su purificación, dando un rendimiento de 0.95%.

Esta planta guarda cercano parentesco con *Ilex paraguayensis* (Mate del Paraguay), que se usa como sustituto del té en países como: Paraguay, Uruguay, Argentina y parte del Brasil.

En Pruebas Fisicoquímicas tales como Punto de Fusión igual a 238.4 °C, TLC Rf x 100 igual a 41 y Determinación de Peso Molecular dando 193 comprueban que la muestra analizada es Cafeína. Pruebas Espectrométricas con UV-Visible en MeOH el λ_{max} es 273 nm y en Agua el λ_{max} es 278 nm, en espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono-13 confirman este hallazgo que permitirá incorporar una nueva planta con presencia de Cafeína.

De este modo *Ilex nayana* (Guayusa Caspi) puede constituirse en un valioso sustituto del té (*Camelia sinensis*).

Palabras claves:

***Ilex nayana*, Cafeína, Métodos Fisicoquímicos y Métodos Espectrométricos.**

**“ISOLATION FROM CAFFEINE OF LEAVES INTO *Ilex nayana* (Guayusa Caspi).
ESTRUCTURAL DETERMINATION USED PHYSICAL CHEMISTRY AND
SPECTROMETRIC METHODS”**

**Bach. Alain Da Silva Rodríguez
Bach. Christian Panduro Sánchez**

ABSTRACT

In the leaves of *Ilex nayana* (Guayusa Caspi) of the family Aquifoleaceae, collected in the Arboretum of The Faculty of Forestal Engineering, state Zungarococha-Puerto Almendras-San Juan District, Loreto Region-Perú, was isolated caffeine for the Inclusion Methods, used Magnesium Oxide (MgO), how stroma and destroyed with solution of Sulfuric Acid to 10% and and extracted with chloroform is procedure to his purification, it is obtained 0.9 percent of yield.

This plant has narrow relationship with *Ilex paraguayensis* (Mate of Paraguay), that is used like substitute of the tea in countries how Paraguay, Uruguay, Argentina and Brazil side.

The Physical-Chemistry test how: melting point is 234.8 °C, TLC Rf x 100 is 41 and Molecular weight Determination is 193 approved that analyzed sample is caffeine. The Spectrometric Tests as UV-Visible into MeOH is $\lambda_{\max}273$ nm and Water is $\lambda_{\max}278$ nm, also Proton Nuclear Magnetic Resonance and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance make it possible to confirm this discovery, in order to introduced in the Scientifics Literature, of this way *Ilex nayana* can be constitute a substitute a valuable of the tea (*Camelia sinensis*)

Key words:

***Ilex nayana*, Caffeine, Physical Chemistry Methods and Spectrometric Methods**

DEDICATORIA

A DIOS, porque está conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza, sabiduría y humildad para continuar. A mis padres CLOTILDE y MARCO ANTONIO porque son quienes a lo largo de mi vida hicieron magia para darme de lo que me faltaba en mi educación y porque han velado por mi bienestar siendo mi apoyo en todo momento depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento de mi inteligencia y capacidad. A mi Hermana por ser mi compañía desde que tuve uso de razón. Es por ello que soy lo que soy ahora.

Los amo con mi vida.

Alaín Da Silva Rodríguez

A Dios por regalarme el tiempo para llegar hasta este punto de mi vida. A mis padres NANCY y MIGUEL ÁNGEL porque son la luz de mi camino, por el apoyo constante, por la vida que me han dado y por todas las oportunidades que me ha regalado. A mi mamá por regalarme la vida y por darme la oportunidad de vivirla. A mi papá que me ha enseñado a disfrutar cada momento y a vivirlo como si fuese el último. A mi hermana VALERYA MILAGROS por ser un gran ejemplo de superación y ganas, por ser desde niña una mujer luchadora y sobretodo feliz. A mi familia y a mis amigos porque sin ellos quizá los obstáculos hubiesen sido infranqueables. Los quiero del corazón al alma.

Christian Panduro Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En el presente Proyecto de Tesis nos gustaría agradecerte a ti Dios por bendecirnos para llegar hasta donde hemos llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la Universidad Nacional de La Amazonia Peruana y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por darnos la oportunidad de estudiar y ser un profesional Químico Farmacéutico.

A nuestros Asesores de Tesis, Q.F. Mario Javier De La Cruz Flores y el Ing. Julio Arce Hidalgo por su esfuerzo y dedicación, quienes con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en nosotros que podamos terminar nuestro proyecto con éxito.

También, a mis profesores que durante toda nuestra carrera profesional han aportado con un granito de arena a mi formación, y en especial a nuestros profesores el Dr. Charles Ocampo, Ing. Gladys Cárdenas de Reátegui y el Q.F. Luis A. Vílchez Alcalá por sus consejos, su enseñanza y más que todo por su amistad. De igual manera agradecer a nuestros Jurados de Tesis por la visión crítica de muchos aspectos científicos, por su rectitud en su profesión como docentes, por sus consejos que ayudan a formarnos como persona e investigadores

Y por último a los Químicos Farmacéuticos Jimmy Daga, Violeta Marquina, Liliana Mendoza, Francis Pinedo, quienes fueron un gran apoyo mientras estábamos lejos de nuestros hogares, los cuales nos han motivado y dado claro ejemplo de Trabajo y Honestidad durante el principio de nuestra formación Laboral y Profesional.

*Son muchas las personas que han formado parte de nuestra vida profesional a las que nos encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles. Algunas están aquí con nosotros y otras en nuestros recuerdos y en nuestros corazones, sin importar en dónde estén queremos darles las gracias por formar parte de momentos importantes, por todo lo que nos han brindado y por todas sus bendiciones. **Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.***

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	02
ABSTRACT.....	03
DEDICATORIA.....	04
AGRADECIMIENTO.....	05

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCION.....	13
1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	14
1.2.1 Formulación del Problema.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	15
1.3.1 General.....	15
1.3.2 Específicos.....	15

CAPITULO II

2.1 MARCO CONCEPTUAL.....	17
2.1.1 Antecedentes.....	17
2.1.2 Clasificación Botánica.....	18
2.1.3 Descripción Botánica de la Familia.....	18
2.1.4 Distribución y Ecología.....	19
2.1.5 Usos Etnobotánicos y Etnofarmacológicos.....	19
2.1.6 Propiedades Farmacológicas del Género Ilex.....	19
2.1.7 Usos de la Cafeína.....	20
2.1.7.1 Doméstico.....	20
2.1.7.2 Usos Terapéuticos.....	20
2.1.7.3 Usos Complementarios.....	21
2.1.7.4 Mecanismo de Acción de la Cafeína.....	23
2.1.8 Países Consumidores de Cafeína.....	25

2.1.9 Alcaloides.....	26
2.1.9.1 Clasificación de los Alcaloides.....	27
2.1.9.2 Origen Biogénico del Nitrógeno de los Alcaloides: Aminoácidos Precursores.....	28
2.1.9.3 Clasificación de los Alcaloides según sus Propiedades Farmacológicas.....	30
2.1.9.4 De acuerdo a su Clasificación en Familias Botánicas.....	31
2.1.9.5 Biogénesis de la Cafeína.....	32
2.1.10 Procedimientos Químicos para la Identificación de la Cafeína.....	36
2.1.10.1 Métodos de Identificación Preliminar de la Cafeína en <i>Ilex nayana</i> ..	36
2.1.11 Aislamiento de Cafeína de <i>Ilex nayana</i>	37
2.1.12 Determinación de las Propiedades Fisicoquímicas y Espectrométricas.....	37
2.1.12.1 Pruebas Fisicoquímicas.....	37
2.1.13 Identificación de las Características Fisicoquímicas de la Cafeína.....	39
2.1.13.1 Propiedades Organolépticas.....	39
2.1.13.2 Punto de Sublimación.....	39
2.1.13.3 Solubilidad.....	39
2.1.13.4 Determinación de su Peso Molecular (PM).....	40
2.1.13.5 Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	41
2.1.13.6 Pruebas Espectrométricas.....	42
2.2 VARIABLES OPERACIONALES.....	48
2.2.1 Identificación del Estudio.....	47
2.2.1.1 Variable Independiente.....	48
2.2.1.2 Variable Dependiente.....	48
2.2.2 Operacionalización de Variables.....	49
2.3 HIPÓTESIS.....	51
 <u>CAPITULO III</u>	
3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	53
3.1.1 Diseño de la Investigación.....	54
3.1.2 Población y Muestra.....	54

3.1.2.1 Población Vegetal.....	54
3.1.2.2 Criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la selección de la muestra.....	54
3.1.2.3 Criterios de Exclusión.....	54
3.1.3 Procedimiento Experimental.....	54
3.1.3.1 Etapas.....	54
3.1.3.1.1 Recolección de la Muestra.....	54
3.1.3.1.2 Identificación de la Muestra.....	54
3.1.3.1.3 Procesamiento de la Muestra.....	55
3.1.3.1.3.1 Secado.....	55
3.1.3.1.3.2 Molienda.....	55
3.1.3.1.3.3 Desengrase.....	55
3.1.3.1.4 Extracción alcohólica del polvo de hojas desengrasadas.....	55
3.1.3.1.5 Filtración.....	55
3.1.3.1.6 Proceso de Aislamiento de Cafeína.....	56
3.1.3.1.7 Purificación de la Cafeína.....	56
3.1.3.1.8 Rendimiento.....	57
3.1.4 Elucidación de la Estructura Química.....	57
3.1.4.1 Pruebas Físico–Químicas.....	57
3.1.4.1.1 Punto de Fusión.....	57
3.1.4.1.2 Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	57
3.1.4.1.3 Determinación del Peso Molecular: Método de Rast.....	58
3.1.4.1.4 Pruebas Espectrométricas para la Elucidación de la Estructura Química.....	59
3.1.4.1.4.1 Espectrometría UV–Visible.....	59
3.1.4.1.4.2 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.....	60
3.1.4.1.4.2.1 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMNH ⁺).....	60

3.1.4.1.4.2.2 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMNC-13).....	61
3.1.5 Materiales, Reactivos y Equipos utilizados.....	62
3.1.5.1 Materiales de vidrio.....	62
3.1.5.2 Materiales de Metal.....	62
3.1.5.3 Materiales de Filtración.....	62
3.1.5.4 Materiales de Bioseguridad.....	62
3.1.5.5 Reactivos.....	62
3.1.5.6 Equipos.....	63

CAPITULO VI

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Rendimiento Porcentual del Alcaloide de Cafeína de las hojas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	65
4.1.2 Resultados de las Pruebas Fisicoquímicas para la Identificación de Cafeína de las hojas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	65
4.1.3 Resultados de las Pruebas Espectrométricas para la Identificación de Cafeína de las hojas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	66
4.1.3.1 Espectroscopia UV-Visible.....	66
4.1.3.2 En RMNH ⁺	67
4.1.3.3. EN RMN DE C-13.....	69
4.1.4 Resultado de la Prueba Organoléptica.....	71

DISCUSION..... 72

CONCLUSIONES..... 73

RECOMENDACIONES..... 74

BIBLIOGRAFIA..... 75

ANEXOS..... 76

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Contenido de Cafeína en Diferentes Productos.....	22
TABLA N° 02: Demanda de Cafeína de Café a nivel Mundial.....	25
TABLA N° 03: Variable Independiente.....	48
TABLA N° 04: Variable Dependiente.....	49
TABLA N° 05: Resultados de Pruebas Fisicoquímicas.....	64
TABLA N° 06: Resultados de Espectroscopía de UV-Visible.....	65

INDICE DE FOTOS

FOTO N° 01. <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	77
FOTO N° 02. Muestra fresca de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	77
FOTO N° 03. Cartuchos con Polvo de las hojas secas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi)..	78
FOTO N° 04. Sistema Soxhlet. Desengrasado de la muestra de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	78
FOTO N° 05. Muestra desengrasada de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	79
FOTO N° 06. Extracción Alcohólica del Desengrasado.....	79
FOTO N° 07. Evaporación de la muestra.....	80
FOTO N° 08. Muestra desengrasada, evaporada con Oxido de Magnesio.....	80
FOTO N° 09. Muestra seca con Oxido de Magnesio (Método de Inclusión).....	81
FOTO N° 10. Reacción Exotérmica con Ácido Sulfúrico (Liberación de la Cafeína).....	81
FOTO N° 11. Separación del Precipitado (Cafeína Libre + Sulfato de magnesio).....	82
FOTO N° 12. Cafeína Libre + Sulfato de Magnesio.....	82
FOTO N° 13. Filtración quedando Cafeína Libre (MgSO ₄ en el papel filtro).....	83
FOTO N° 14. Evaporación a Temperatura Ambiente.....	83
FOTO N° 15. Cafeína Pura de hoja de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	84

FOTO N° 16. Aparato Nalge Axelrod modificado (Derecha). Observación para análisis de Punto de Fusión (Izquierda).....	85
FOTO N° 17. Muestra de Cafeína y Capilar para la Prueba de Punto de Fusión.....	86
FOTO N° 18. Tres Canales dentro el Aparato de Axelrod modificado para colocar el capilar más la muestra a analizar.....	86

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01: Recorrido de la Biosíntesis de Cafeína.....	33
FIGURA N° 02: Origen Biogenético de la Molécula de Cafeína.....	35
FIGURA N° 03: Rango aproximado de Valores de Desplazamiento Químico de RMN de Carbono-13.....	47

INDICE DE IMÁGENES

IMAGEN N° 01: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones de la Cafeína en hojas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	68,87
IMAGEN N° 02: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 de la Cafeína en hojas de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi).....	70,88
IMAGEN N° 03: Espectro UV - Visible en Metanol y en Agua.....	66,89
IMAGEN N° 04: Constancia de Muestra Botánica.....	90

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA N° 01: Diagrama de Bloque del Proceso Experimental.....	91
--	----

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCION

La cafeína es un polvo inodoro, incoloro y amargo. **Friedrich Ferdinand Runge** la aisló del café en 1819 y del té en 1827, pero su estructura química no se describió hasta 1875 por E. Fischer. La cafeína y los otros alcaloides metilxantínicos, como la teobromina y la teofilina son derivados del grupo de las xantinas, que a su vez se derivan de las purinas. También es conocida por el nombre teína, guaranína o mateína.

La cafeína, es una sustancia que se encuentra en ciertas plantas naturales y puede producirse sintéticamente en laboratorio. Se localiza en cantidades variables en las semillas, las hojas y los frutos de algunas plantas, donde actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertos insectos que se alimentan de las plantas. Se encuentra en el café, té, chocolate, cacao y en bebidas de cola y energéticas. También se encuentran en bebidas que contienen guaraná y a menudo como ingrediente en los suplementos de pérdida de peso y energizantes, las bebidas deportivas, preparaciones herbales y analgésicos.

Ilex nayana, cuatrecaceae conocido con el nombre vulgar de Guayusa Caspi, es un árbol de la familia Aquifoliácea que crece en bosque primario no inundable en la zona media del río Nanay en las localidades de Zungarococha, Puerto Almendras, Nina Rumi, Llanchama, Mishana. No se conoce ningún estudio respecto a los principios activos de esta planta, tampoco acerca de su contenido de cafeína ⁽¹⁾. Esta planta está emparentado cercanamente con *Ilex paraguayensis* (Hierbamate, té de Paraguay), a través del género. *Ilex paraguayensis* usado como bebida en países latinoamericanos como Paraguay, Uruguay, Argentina y limitadamente Brasil, por su actividad energizante debido al contenido de cafeína que posee ⁽²⁾.

Se conocen otras especies de *Ilex*: *Ilex cassini* (Cassina), *Ilex vomitoria* sin ninguna transcendencia. En la Amazonía Peruana se conoce la especie de *Ilex nayana*, que crece promisoriamente en el Ecuador y se ha introducido en Tarapoto como sustituto del Té, en la amazonia baja se conoce *Ilex nayana* (Guayusa Caspi). En relación con esta planta, no se cuenta con referencias etnobotánicas ni estudios previos por esta razón este proyecto de tesis.

1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.2.2 Formulación del Problema

¿Qué posibilidad de ocurrencia de Cafeína se tendrá en las hojas de *Ilex nayana*; que luego de aislada es posible establecer su determinación estructural por métodos Fisicoquímicos y Espectrométricas?

1.2 OBJETIVOS:

1.3.1. General:

- Realizar el Aislamiento y Determinación estructural de Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), mediante métodos Fisicoquímicos y Espectrométricos.

1.3.2. Específicos:

- Aislar Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi).
- Determinar la presencia de Cafeína por métodos Fisicoquímicos y Espectrométricos.
- Determinar las propiedades Fisicoquímicas: Punto de Fusión, Peso Molecular, TLC, propiedades organolépticas.
- Elucidar la estructura química de la sustancia aislada, verificándolo en la práctica la presencia de Cafeína interpretando el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono-13.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO CONCEPTUAL:

2.1.1 Antecedentes

Ilex nayana, especie vegetal de la Amazonía baja, guarda una relación filogenética a nivel de género con *Ilex paraguayensis* (Mate de Paraguay), que es una de las materias primas que suministra Cafeína para la bebida y otros menesteres vinculados con la salud humana, muy usada en Paraguay, Uruguay, Argentina y Brasil.

Trease and Evans. 1991. En su libro “Farmacognosia” señala que la especie *Ilex paraguayensis* contiene: 0.2–2% de cafeína, 10–16% de ácido clorogénico (ácido cafetánico) y trazas de aceites esenciales ⁽²⁾.

Alikaridis, F.1987. En la Revista Etnofarmacológica “Constituyentes Naturales de las Especies del género *Ilex*”. El género *Ilex* contiene: Cafeína, Teobromina, Ciclitoles, Ácido shikimico, Inositol, Saponinas Triterpenoidales y Triterpenos ⁽³⁾.

Antes del análisis previo que realizamos de esta planta, con el propósito de conocer si tiene presencia de cafeína, intuimos que por el parentesco cercano que existe entre ambas, quimiotaxonómicamente se podría decir que *Ilex nayana* podría biosintetizar cafeína como la hace *Ilex paraguayensis*; después de las pruebas que pudieran mostrar resultados positivos, no existiera ninguna duda que sería otra materia prima capaz de suministrar cafeína para el consumo mundial.

No se conocen estudios anteriores relacionados con la presencia de Cafeína en *Ilex nayana*, esta planta es poco conocido en la Botánica Económica como tal, es considerada como una planta marginal.

En la Amazonía Peruana, esta especie pertenece a la familia Aquifoliáceae; carece de estudios previos y se ignora si contiene cafeína en las hojas, por esta razón resulta de vital importancia su verificación, para que sea incluida entre las plantas suministradoras de este importante alcaloide.

Tiene la ventaja de ser un árbol con abundante follaje en cuyas hojas se encuentra la cafeína, crece en bosque primario no inundable y puede llegar a alcanzar con facilidad hasta 24 metros de altura. De modo que su condición de árbol le permite ofrecer abundante follaje y posibilidades de ser una fuente importante de cafeína.

2.1.2 Clasificación Botánica

La planta fue identificada por comparación con patrones que obran en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y corresponde a la taxonomía siguiente:

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Aquifoliales
- **Familia:** Aquifoliácea
- **Género:** *Ilex*
- **Especie:** *Ilex nayana*
- **Nombre vulgar:** Guayusa Caspi

2.1.3 Descripción Botánica de la Familia

Son árboles o arbustos de corteza más o menos lisas algunas contienen alcaloides como la cafeína. Poseen pelos simples, hojas alternas y en espiral, simples, enteras y/o aserradas, los dientes con glándulas deciduas hasta ápice espinoso, con venación pinnada.

Inflorescencia axilar algunas se reducen a una flor solitaria. Flores por lo general unisexuales (plantas dioicas), radial, sépalos de 4-6 débilmente fusionados, imbricados, estambres esencialmente de 4-6 levemente se da una fusión de puntas desiguales en la base de la corola. 3-4 granos de polen colporate o porate (apertura de poros iguales), estaminodes conspicuos en flores carpeladas carpelos usualmente 4-6 levemente fusionados. Ovario súpero, con placentación axilar, estilo muy corto o faltante, flores con un andróceo, óvulos usualmente uno en cada lóculo. Frutas coloridas: rojo, rojo naranja, violeta oscuro o rosado; forman drupa; con una amplia zona estigmática ⁽⁴⁾.

2.1.4 Distribución y Ecología

Ampliamente distribuida, pero especialmente común en los trópicos montañosos, característico en suelos ácidos. Se conoce un solo género y 400 especies, el género *Ilex* es el más simple ⁽⁴⁾.

Ilex paraguayensis (Hierba mate) crece en Paraguay, Uruguay, Argentina y parte del Brasil. *Ilex vomitoria*, abunda en el Sureste de EE.UU. *Ilex guayusa* e *Ilex nayana*, son de la región amazónica la primera de la selva alta y la otra de la selva baja.

Filogenéticamente las relaciones con *Ilex*, son oscuras según Powell, citado por Judd et al (2002). *Ilex* es monofilético (grupo compuesto de un antecesor común y todos ellos de sus descendientes) ⁽³⁾. Las Aquifoliáceas ampliamente están relacionadas a las Helwingiaceae, un grupo de arbustos con hojas alternas y espiraladas, venas pinnadas e inflorescencia epiflora (soportada por las hojas).

Las flores son visitadas por varios insectos especialmente abejas, algunas especies pueden ser polinizadas por el viento. Los frutos son dispersados por los pájaros. La germinación de la semilla es lenta y requiere entre 1 a 3 años ⁽⁴⁾.

2.1.5 Usos Etnobotánicos y Etnofarmacológicos

Contrariamente como es conocido por los Achuales, *Ilex guayusa* (Guayusa), poco se conoce de *Ilex nayana*. En la zona del Nanay algunas personas tuestan las hojas y preparan una infusión y lo mastican para evitar el cansancio ⁽⁴⁾, algo que se hace con la coca agregándole ceniza de *Cecropia membranacea*.

2.1.6 Propiedades Farmacológicas del Género *Ilex*

Está relacionado con la actividad de la Cafeína que contiene *Ilex paraguayensis* (Hierba mate), la cafeína es un psicoestimulante poco adictivo ⁽⁵⁾, muy extendido por el mundo. Es absorbido por vía oral, la concentración se alcanza a los 30 – 40 minutos de la ingesta.

- Su tiempo de vida media es de 3 horas y es metabolizado en un 90%.
- La cafeína posee acción diurética inotrópica, cronotrópica, es broncodilatador y aumenta la secreción de ácido gástrico.

- Sus acciones reforzadoras y psicoestimulantes al parecer son debidas a la liberación de catecolaminas a nivel del sistema límbico medio.
- En general la cafeína disminuye el cansancio y la fatiga pudiendo aumentar la capacidad de realización de determinadas tareas sobre todo nocturnos ⁽⁶⁾.

2.1.7 Usos de la Cafeína

2.1.7.1 Doméstico:

La cafeína se encuentra en numerosos productos de consumo cotidiano resultando su ingesta habitual, por ejemplo:

- En café con leche en el desayuno.
- Infusión de té o de mate para calmar el dolor y el sufrimiento.
- Un helado de moca o una barra de chocolate para degustar y fluidificar la tos.
- Un refresco o bebida gasificada de guaraná para calmar la sed, etc.

Una taza de café de 125 ml contiene 90–125 mg de cafeína, una taza de té de 150 ml entre 60–90 mg de cafeína. Un vaso de Coca Cola de 250 ml aporta entre 8–35 mg de cafeína. 100 ml de Red Bull contiene 30 mg de cafeína ⁽⁷⁾.

2.1.7.2 Usos Terapéuticos:

Aldrich Catalog of Fine Chemical, señala citando la Revista Científica “Nature”(1974) que la Cafeína es un protector contra virus endógenos y contra inductores químicos de carcinogénesis ⁽⁸⁾. En la Farmacopea tiene diversos usos tales como:

- Relajante muscular de acción central, Abefe Bristol Myers Squibb elabora el fármaco “Flexen Compuesto”, en el que uno de sus componentes es Cafeína anhidra. “Mialgin Compuesto”, es usado como relajante y analgésico esquelético. “Darvon N Compuesto”, contiene cafeína que se usa para mejorar la acción del Napsilato de Dextropropoxifeno.

- Para combatir gripe y resfriados comunes está presente en el producto “Yendol”, en el que la cafeína está asociada con paracetamol, salicilamida y maleato de clorfenamina. En el “Coricidin F” usado como antihistamínico, analgésico y antipirético, junto a paracetamol, clorhirato de fenilefrina y maleato de clorfenamina, también está asociado la Cafeína ⁽⁹⁾.

En épocas pasadas Jenkins C. L. y Hartung W (1950) en el Libro de Química Medica Farmacéutica, señala que se usaba como analgésico:

- a) Cafeína Citrato USP.
- b) Cafeína Benzoato Sódico N.F.
- c) Cafeína Salicilato Sódico N. F. y se administraba por vía hipodérmica.

El éster 8–Cloro–Cafeína se usaba como agente hipotensor. ⁽¹⁰⁾.

2.1.7.3 Usos Complementarios:

En la elaboración de bebidas energizantes tipo: Coca Cola, Red Bull, Pepsi Cola Light ⁽⁷⁾.

TABLA N° 01. Contenido de Cafeína en diferentes Productos

	Volumen/peso	Rango de cafeína (mg)	Promedio de cafeína (mg)
Café			
Tostado	100 ml	41-83	60
Instantáneo	100 ml	27-72	50
Tostado descafeinado	100 ml	0,4-7	2,4
Instantáneo descafeinado	100 ml	5-1	3
Té			
Negro	100 ml	10-46	25
Verde	100 ml	8-17	12
Blanco	100 ml	2-11	6
Rojo	100 ml	5-30	18
Té helado	100 ml	4-21	12
Productos de Chocolate			
Grano de cacao	100 g	0,1-0,5	0,2
Cacao en polvo	10 g	10-16	12
Chocolate negro	100 g	17-118	68
Chocolate blanco	100 g		~ 0
Chocolate amargo	100 g	16-34	24
Chocolate con leche	100 g	1-38	20
Chocolate a la taza	100 ml	1-49	34
Leche con chocolate	100 ml	1-7	3
Bebidas de cola			
Colas	330 ml	3-7	4
Colas descafeinadas	330 ml		~ 0
Cola light	330 ml	2-7	4
Colas light descafeinadas	330 ml		~ 0
Bebidas energéticas			
	330 ml	10	9-12
Guaraná			
Bebidas con guaraná	330 ml	0,1-12	8
Pasta de guaraná	100 g	2,5-5	4
Mate			
	100 ml	0,2 - 2	1,5
Postres congelados			
	100 ml	21-35	25
Medicamentos Sin Receta			
	1 dosis	36-200	102

2.1.7.4 Mecanismo de Acción de la Cafeína:

La cafeína es una xantina o dioxipurina, relacionado con las purinas y con el ácido úrico, de ahí es que pueden fijarse a receptores adenosínicos.

La cafeína tiene actividad que supera a la teobromina y teofilina para incrementar la respuesta contráctil del músculo esquelético o respuesta contráctil del estímulo nervioso o a cualquier otro estímulo contráctil. Las xantinas producen una activación prolongada del sistema nervioso central.

En el aparato digestivo relaja la musculatura lisa de las vías biliares, útil en el tratamiento del cólico biliar así como del cardias e intestino, que evitan el espasmo intestinal, estimula la secreción gástrica de ácido y pepsina, lo que con frecuencia origina en los pacientes intolerancia gástrica, esta acción es bloqueada con antihistamínicos H₂.

La cafeína en cierto grado menor que la teofilina estimula la contractibilidad cardíaca en forma más rápida que la digitalina de *Digitalis purpurea* y más prolongada que los β-adrenérgicos.

Aunque durante años se utilizó como agente inotrópico, para ciertos casos de insuficiencia cardíaca en la actualidad se encuentra superado por otros agentes inotrópicos y vasodilatadores aunque su acción puede ser útil en pacientes con CorPulmonale (hipertrofia del hemicardio derecho) a consecuencia de una presión excesiva en caso de enfermedades que modifican de manera primaria la función y/o la estructura pulmonar⁽⁶⁾.

El mecanismo celular por el que las xantinas expresan su acción resulta impreciso, pero se sabe que las xantinas inhiben la Fosfodiesterasa del AMP_C (Monofosfato de Adenosina Cíclica) y del GMP_C (Guanosina Monofosfato Cíclico) aumentando los niveles de dichos nucleótidos, e incrementando la movilización de Ca⁺⁺ intracelular.

La hipótesis actual se basa en la capacidad de las xantinas para bloquear receptores adenosínicos A₁ y A₂, en concentraciones equivalentes a las terapéuticas.

Las acciones de la adenosina en los diferentes órganos son variables. El SNC es la región más rica de receptores adenosínicos de todo el organismo, la activación de los receptores A₁ pre-simpáticos, reducen la liberación de neurotransmisores tanto excitables como inhibidores.

A nivel post simpático la actividad del receptor A₁ y A₂ originan hiperpolarización e inhibición de la actividad neuronal que explica las propiedades de la Adenosina en el sistema nervioso central; ansiólisis, sedación y sueño, depresión respiratoria, asma, crisis epiléptica, hipoxia isquémica e hipoglucemia y acción facilitadora de la actividad anti-inocéptica de los opioides ⁽¹¹⁾.

Sobre el riñón, la Adenosina reduce el flujo sanguíneo, la velocidad de filtración glomerular y la liberación de renina A₁, proteinasa sintetizada en las células epiteliales del aparato yuxtglomerular que transforma su angiotensinógeno en Angiotensina y por lo tanto origina una disminución de la diuresis; es significativo que al tomar cafeína se produce una elevación moderada y prolongada de los ácidos grasos libres en el plasma humano ⁽⁶⁾.

2.1.8 Países Consumidores de Cafeína:

En la Tabla N° 01. Se podrá observar la demanda mundial de Cafeína de Café a nivel mundial.

TABLA N° 02. Demanda de Cafeína de Café a nivel mundial. Tomado de “International Journal of Science and Nature”⁽¹²⁾.

País	Producto	% Cafeína Promedio	Consumo Percapita/kg año de Cafeína	Consumo Percapita/mg por día de Cafeína
Finlandia	Café	1.85	12	608.22
Noruega	Café	1.85	9.99	501.80
Islandia	Café	1.85	9.0	456.20
Países Bajos	Café	1.85	8.7	441
Suecia	Café	1.85	8.4	426
Suiza	Café	1.85	8.2	416
Alemania	Café	1.85	7.9	400.4
Aruba	Café	1.85	6.9	350
Luxemburgo	Café	1.85	6.8	345
Canadá	Café	1.85	6.8	345
Austria	Café	1.85	6.5	329.45
Bosnia Herzegovina	Café	1.85	6.1	309.18
Segovina	Café	1.85	6.1	
Italia	Café	1.85	5.9	298
Eslovenia	Café	1.85	5.8	294
Brasil	Café	1.85	5.6	284
Gracia	Café	1.85	5.5	279
Croacia	Café	1.85	5.1	258.4

En la columna N°01; se hallan los países que más cafeína consumen como bebida a partir de café, aquí no aparece china que es el más grande consumidor de cafeína del té (*Camellia sinensis*).

Sobre una población mundial de 6,000'000'000 (6 mil millones) de habitantes y un consumo promedio de 7.3 Kg/persona x año. El consumo en el año 2013 se estima que es de 43, 800'000 000 Kg de café/persona x año.

Es muy alta la demanda de café para consumo humano que ninguna empresa Farmacéutica utilizaría café como materia prima para la obtención de cafeína para procesos farmacéuticos, lo que queda justificado con creces es el propósito de seguir buscando fuentes alternativas proveedoras de cafeína con fines farmacéuticos.

2.1.9 Alcaloides:

Una gran cantidad de compuestos naturales poseen en sus moléculas átomos de nitrógeno, sin embargo pueden ser aminoácidos, aminas, glicósidos cianógenos, indoles, pirimidinas, citoquininas más no alcaloides⁽¹³⁾.

No existe una definición exacta para los alcaloides aunque puede considerarse como un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal) nitrogenado, donde el nitrógeno se encuentra dentro de la estructura cíclica de la molécula (Intracíclica) que deriva generalmente de aminoácidos de carácter más o menos básicos, aunque no necesariamente, de distribución restringida en ciertas plantas y que posee propiedades farmacológicas importantes a bajas dosis y que para su identificación responde a reacciones comunes de precipitación. Sin embargo los denominados imperfectos como los que derivan de las purinas, tales como teofilina, teobromina y cafeína no tienen respuesta positiva con los reactivos generales para alcaloides tales como: Dragendorff, Mayer, Wagner, etc.,⁽¹⁴⁾

Hoy en día la palabra alcaloide acuñado por Meissner en 1879 para indicar propiedades básicas de sustancias aisladas de plantas y que resultaban posteriormente activas, es usada en sentido restrictivo para señalar a los metabolitos exclusivamente secundarios con propiedades no necesariamente básicas, en los que parte de la estructura incluyendo el nitrógeno procede de los aminoácidos⁽¹⁴⁾.

No se incluye en dicha denominación azúcares, ni lípidos nitrogenados, ni tampoco compuestos en los que el nitrógeno forma parte de funciones neutras no amínicas, ni tampoco amídicas, tales como por ejemplo nitro, -ciano o -isociano, se excluyen asimismo de la denominación de alcaloides a sustancias tales como:

- a) Ciertas aminas bioactivas estructuralmente simples: (etanolamina, adrenalina, dopamina, etc.) que aparecen en el metabolismo desempeñando el papel de mensajeros químicos en otras funciones relacionadas.
- b) Aminoácidos o péptidos raros procedente generalmente de hongos o microorganismos.
- c) Derivados heterocíclicos nitrogenados simples.
- d) Pigmentos pirrólicos.

2.1.9.1 Clasificación de los Alcaloides:

Alberto Marcos J. 2006, en su libro “Química de los Productos Naturales” clasifica a los alcaloides ⁽¹³⁾ en:

- a) **ALCALOIDES VERDADEROS:** Aquellos en los que su estructura parcial o total deriven de los aminoácidos. En la mayoría de los casos el aminoácido retiene la totalidad de la estructura excepto el grupo carboxilo que suele perderse por lo general. A su vez el aminoácido puede constituir la totalidad de la estructura del alcaloide o solo una parte de esta, proviniendo el resto de la estructura de la vía metabólica del acetato–mevalonato, del ácido shikímico, o de algunos precursores isoprenoides-C₅n.

En el otro extremo de la escala puede ocurrir que el aminoácido proporciona únicamente el átomo de nitrógeno a través de un proceso de transaminación, perteneciendo el resto de la estructura a algunas de las vías metabólicas: ácido mevalónico, acetogeninas, ácido shikímico.

- b) **PSEUDOALCALOIDES:** Con este nombre se designa aquellas sustancias que no derivan de los aminoácidos. Goodwin and Mercer 1988, en su libro, *Introduction to Plant Biochemistry* ⁽¹⁵⁾ clasifica a los alcaloides como:

1. Alcaloides verdaderos.
2. Protoalcaloides.
3. Pseudoalcaloides:

Mercer et al (2006) denomina alcaloides verdaderos aquellos que poseen anillos heterocíclicos y derivan de aminoácidos ⁽¹⁵⁾.

Se denominan protoalcaloides a aquellos que no poseen anillos heterocíclicos ⁽¹⁵⁾.

Alcaloides tanto con o sin anillo heterocíclico que no son derivados de aminoácidos son llamados pseudoalcaloides están representados por alcaloides en el que el esqueleto carbonado es un derivado isoprenoidal.

Los alcaloides verdaderos y los protoalcaloides están clasificados de acuerdo al anillo del sistema heterocíclico que ellos contienen o de acuerdo con los aminoácidos del cual derivan.

2.1.9.2 Origen Biogénico del Nitrógeno de los Alcaloides: Aminoácidos Precusores

➤ Alcaloides Verdaderos:

El número de aminoácidos precursores es bastante reducido y se limita salvo raras excepciones a los aminoácidos fenilalanina/tirosina, triptófano, lisina/ornitina, histidina y ácido nicotínico.

a) Los alcaloides procedentes del par fenilalanina/tirosina pueden ser:

- Mezcalina de *Lophophora williamsi*.
- Salsolina de *Salsola* spp.
- Queledomina de *Cheledonium majus*.
- Laudanosina de *Papaverun sommiferum*.
- Colchicina de *Colchicum autumnale*.

b) Alcaloides procedentes del triptófano:

- Psilocybine de *Psilocybe mexicana*.
- Harmina de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca).
- Fisostigmina de *Physostigma venenosum*.
- Ajmalibina de *Rauwolfia serpentina*.
- Yohimbina de *Pausinystalia yohimbe*.
- Ibogaina de *Tabernanthe iboga*.
- Estricnina de *Strychnos nuxvomica*.
- Quinina de *Cinchona peruviana*.
- Camptotecina de *Camptotheca acuminata*.

c) Alcaloides provenientes del parOrnitina/Lisina:

- Higrina de *Erythroylon* spp.
- Hioscimina de *Hyosciamus* sp.
- Cocaina de *Erythroxyton coca*.
- Peletierina de *Punica granatum*.
- Lupinina de *Lupinis luteos*.
- Esparteina de *Sparteum junceum*.

d) Alcaloides procedentes de Histidina:

- Dolicotelina de *Dolichotheles phaerice*.
- Pilocarpina de *Pilicarpus* sp.

e) Alcaloides provenientes del Ácido Nicotínico:

- Nicotina de *Nicotiana tabacum*.
- Anbasina de *Nicotiana* spp.
- Ricinina de *Ricinus communis*.

➤ **Protoalcaloides:**

Son derivados del ácido antranílico que es un intermediario clave en la biosíntesis del L-triptófano.

Por ejemplo Damascenina encontrada en *Nigella* sp almacenada en células papilares de la epidermis de la semilla.

➤ **Pseudoalcaloides:**

- Coneína es un alcaloide encontrado en *Conium aculatum*.
- Efedrina derivado del ácido shikímico encontrado en *Ephedra* spp.
- Actinidina (monoterpeno) obtenida de *Actinidia polígama*.
- Cafeína (origen mixto) contenido en *Coffea arabica* considerada por otros autores como aldehído imperfecto.
- Tomatilina (de origen esteroidal) se ha obtenido en *Lycopersicon esculentum* (Tomate).

2.1.9.3 Clasificación de los Alcaloides según sus Propiedades Farmacológicas:

Pueden ser:

a) Como modificadores del sistema nervioso central:

- Los hay estimulantes nerviosos tales como: Ibogoina obtenida de *Tabernanthe* spp; Estricnina obtenida de nuez vómica.
- Alucinógenos: como mezcalina obtenida del peyote, alcaloides tipo harmina, harmano, harmol, obtenida de *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca), que produce estimulación del sistema límbico y lleva a estados de conciencia alterada.

1. Como modificadores del sistema nervioso autónomo:

- Los hay parasimpaticomiméticos de acción directa, como la Pilocarpina dotada de efectos muscarínicos: hipersecreción salival, gástrica, sudoral, hipermotilidad intestinal, broncoconstricción, bradicardia, en el hombre la pilocarpina contrae los músculos ciliares, facilita el drenaje en el caso de glaucoma crónico, se obtiene de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*).

- Parasimpaticolíticos provocan midriasis (dilatación de la pupila), esta actividad posee la belladona, *Hyoscyamus niger*, Beleño. Contienen hiosciamina/atropina, escopolamina, belladonina y atropanina. Atropina e Hioscianina son antagonistas competitivos de la acetilcisteína. Inhiben los efectos muscarínicos de la acetil-colina, manifestando su capacidad de bloquear prácticamente sobre todo los órganos que reciben inervación parasimpática.

A nivel cardiaco dosis normales de atropina aumentan el ritmo cardiaco (taquicardia sinusal por supresión del tono vagal), mientras que a dosis bajas produce una bradicardia paradójica.

A nivel vascular, aunque capaz de bloquear los receptores colinérgicos vasculares la atropina aumenta solo en pequeña medida la resistencia vascular periférica y los efectos sobre la tensión no son muy marcados existiendo una tendencia moderada hacia la hipertensión.

2.1.9.4 De acuerdo a su Clasificación en Familias Botánicas:

Los alcaloides se encuentran en sustancias como el tabaco de la que se extrae la nicotina, cotinina y anabasina.

1. Alcaloides de Rubiáceas como Mitrafilina, pteropodina, rinchofilina de *Uncaria tomentosa* y *U. guianensis* (uña de gato) o DMT de *Psychotria viridis* (Chacrana)
2. Alcaloides de Malpighiáceas como Harmina, Harmol, Harmalina de *Banisteriopsis caapi*.
3. Alcaloides de Amarilidáceas como Colchicina de *Colchicum autumnale* (Colchico).
4. Alcaloides de Menispermáceas como Tubo-curarina (bis fenilisoquinolina) de *Chondodendrum tomentosa* (Curaré).

2.1.9.5 Biogénesis de la Cafeína:

La cafeína es un alcaloide derivado de bases purínicas entonces por no derivar de los aminoácidos se denomina pseudoalcaloide y no da reacciones positivas con los reactivos para alcaloides verdaderos: Dragendorff, Mayer, Wagner, etc.

Misako Kato et al (1999) señala que los alcaloides de naturaleza purínica como: teobromina (3,7 dimetilxantina), Cafeína (1, 3, 7 trimetilxantina) y theocrina (1, 3, 7, 9 tetrametil úrico ácido) están distribuidas ampliamente a través del reino vegetal en relación a la distribución restringida de ciertos alcaloides como: nicotina y morfina ⁽¹⁶⁾.

Estudios amplios de alcaloides purínicos en hojas de té (*Camelia sinensis*) y Café (*Coffea arabica*) han permitido elucidar el recorrido seguido en la biosíntesis de cafeína con algunos detalles.

La disponibilidad de datos respalda las fases siguientes:

Xantosina → 7-Metilxantosina → 7-Metilxantina → Teobromina → Cafeína.

Este recorrido es considerado la ruta mayor para llegar a la cafeína. Además señala un recorrido menor de la biosíntesis de cafeína en la hoja de té (*Camellia sinensis*)

Metilxantina → Paraxantina → Cafeína.

Se reporta una alteración de entrada en el recorrido que sigue la biosíntesis de cafeína en el café que involucra la conversión siguiente:

Xantinosamonofosfato (XMP) → 7-metil-XMP → 7-metilxantinoso

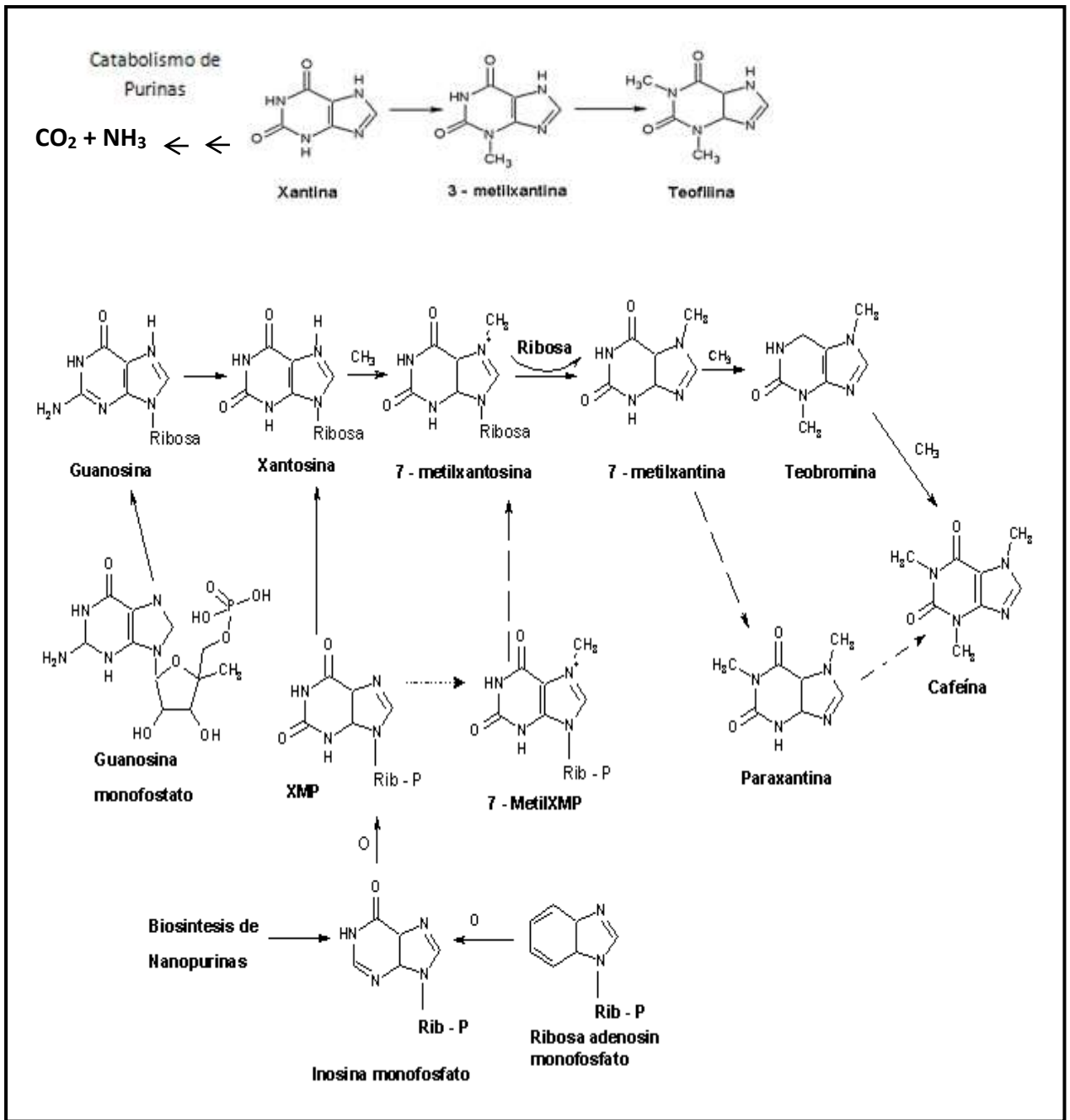


Figura. N°1. Recorrido de la biosíntesis de cafeína:

————> Recorrido mayor.

-----> Recorrido menor que se cumple en hojas de café y Té.

Una que partiendo de la Guanosina Monofosfato pasa a Guanosina de esta a Xantosina, al metilarse la xantosina se transforma en 7-metilxantosina por sustracción de la ribosa se convierte en 7-metilxantina que al metilarse en posición 3 se convierte en Teobromina, la teobromina al metilarse en posición 1 se convierte en cafeína.

La otra vía sigue la ruta de la Adenosina monofosfato que al oxidarse se transforma en Inosina monofosfato, la inosina monofosfato va a oxidarse en posición 2 se convierte en xantina monofosfato, la xantina monofosfato pierde el fosfato y se convierte en xantosina, la xantosina al metilarse en posición 7 se convierte en 7-metilxantina, la 7-metilxantina se metila en posición 3 y da teobromina finalmente, la teobromina se metila en posición 1 y da como producto la cafeína

Misako, K. et al (1999), señala que se conoce poco acerca de las propiedades de las enzimas que participan en el recorrido de la biosíntesis de la cafeína.

El recorrido muestra 3 metilaciones dependientes del 5-Adenosilmetionina indicando que las N-metiltransferasas juegan un rol importante.

La actividad de 7-metilxantina-N-metiltransferasa y teobromina-N-metiltransferasa que catalizan la segunda y tercera etapa de metilación en el recorrido principal fueron hallados en extractos crudos de hojas de té por Suzuki y Takahashi (1975), según señala Misako Kato et al éstas investigaciones demostraron que las 2 enzimas tienen idénticos pH óptimos y son afectados similarmente por iones metálicos e inhibidores⁽¹⁶⁾.

La actividad de la metiltransferasa en la biosíntesis de la Cafeína ha sido detectado en extractos de células libres y en cultivo de hojas de café en suspensión por Baumam et al en 1983⁽¹⁶⁾. La primera enzima de metilación es la xantina-N-metiltransferasa que cataliza la formación de 7-metilxantosina en xantosina fue encontrado en extractos de hojas de té por Nagishi et al en 1985⁽¹⁶⁾.

Fujimori, Masnori et al (1999) ha confirmado la actividad de las 3 metiltransferasas en extractos de hojas de té y encontró que están presente en altos niveles en hojas jóvenes, pero están ausentes en hojas completamente desarrolladas.

La purificación de las N-metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de la cafeína fue identificada por varios investigadores.

Mazzafera, Paulo et al (1994) primero ha reportado la purificación de una N-metiltransferasa del endosperma de las hojas de café y ha demostrado la actividad de 7-metilxantina y la actividad de la teobromina-N-metil-transferasa; sin embargo la actividad del preparado de células libres fue extremadamente lábil y la actividad específica de la enzima disminuía en cada etapa de un procedimiento de purificación secuencial.

Se observa pues que en el origen biogénico de la cafeína la estructura molecular posee fragmentos metílicos del formiato de metionina, el nitrógeno en posición 1 proviene del ácido aspártico, el grupo ceto (C=O) en posición 6 proviene del CO₂, el nitrógeno en posición 7 proviene de la glicina y los nitrógenos 3 y 9 respectivamente proviene de la N-amida de la glutamina⁽²⁾.

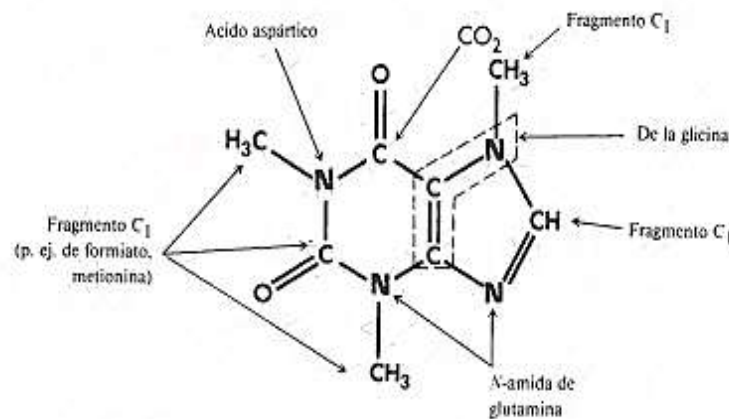


Figura. N° 02. Origen Biogénico de la molécula de Cafeína

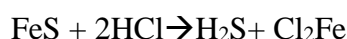
2.1.10 Procedimientos Químicos para la Identificación de la Cafeína.

2.1.10.1 Métodos de Identificación Preliminar de la Cafeína en *Ilex nayana*.

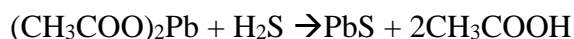
Se pulverizará la hoja de *Ilex nayana*, se tamiza por malla 80 ASTM, de este polvo se toma 100g de muestra, se agrega 500ml de agua se hierve.

Se filtra, al filtrado se le agrega 5mL de acetato de plomo para precipitar taninos, clorofila, otras interferentes.

Se vuelve a filtrar para separar los interferentes del filtrado, el filtrado se le hace burbujear sobre este H₂S que se produce en un aparato de Kipp por reacción del FeS con HCl↑.



El ácido sulfhídrico que se desprende del aparato de Kippal burbujear sobre el filtrado reacciona con el plomo remanente que es lo que precisa eliminar.



Se filtra para separar el sulfuro de plomo y queda un filtrado libre de plomo, se concentra el filtrado en baño maría. Se filtra, el filtrado se trata con hielo, precipitan cristales en forma de agujas (cristales monoclinicos) de cafeína.

➤ ***Prueba de Identificación Colorimétrica de la Cafeína.***

Una pequeña porción de cristales se prueba con Murexida (Amonio purpurate). Los cristales se diluyen en amoniaco y se agrega gotas de agua oxigenada, luego el indicador Complexometrio se forma una coloración rojo naranja que evidencia la presencia de cafeína.

➤ ***Prueba de Identificación de la Cafeína por Cromatografía de Capa Fina (TLC).***

Una muestra de cristales aislados se diluye en solución de amoniaco al 5% se aplica sobre un cromotafolio de sílica gel F₂₅₄ (5x20cm) se corre la muestra en una mezcla de acetona: cloroformo: n-butanol: NH₃ (30: 30: 40: 10).

Se saca la placa de la cámara, se deja secar y se rocía la placa con una solución de Cl_3Fe +Iodo, se debe de observar un color pardo rojizo, color característico de la cafeína.

➤ ***Prueba a la Gota.***

Tal vez es la prueba más barata, consiste en disolver una pequeñísima porción de cristales aislados, diluir con 3 gotas de ácido nítrico concentrado, se evapora a sequedad y se agrega 2 gotas de NH_4OH , aparece un color púrpura, es una prueba irrefutable de la presencia de cafeína.

2.1.11 Aislamiento de Cafeína De *Ilex nayana*

Se utiliza el método de Ikan Raphael citado por Harborne J.B. ⁽¹⁴⁾ y consiste en lo siguiente:

Pulverizar finamente 100g de muestra (*Ilex nayana*) y pasar por malla 80 ASTM, desengrasar en el sistema soxhlet por 100 horas con éter de petróleo (BP. 30–60), el polvo desengrasado se extrae con 500mL de etanol en caliente, se filtra y el filtrado se reduce hasta 250mL; y se vierte sobre 50g de óxido de magnesio para que se forme una inclusión donde el incluido (huésped) que ocupa los espacios vacíos de la estructura cristalina de MgO es la Cafeína, de este modo la cafeína queda adsorbido en el óxido de magnesio, el exceso de líquido se lleva a sequedad en baño maría, cuando se halla completamente seca la inclusión se desmenuza en mortero y el polvo se hace reaccionar con 150 ml de solución de H_2SO_4 al 10% de esta forma se desintegra la inclusión dejando libre la cafeína al reaccionar con el MgO formando MgSO_4 .

Se filtra la solución y el MgSO_4 queda en el papel de filtro mientras que en el filtrado se halla presente la cafeína que se separa por extracción con cloroformo (3 veces), se juntan los extractos clorofórmicos, se filtra y se concentra, se deja en reposo hasta que cristaliza en forma de agujas (cristales monoclinicos).

2.1.12 Determinación de las Propiedades Fisicoquímicas y Espectrométricas:

2.1.12.1 Pruebas Fisicoquímicas:

➤ *Punto de Fusión:*

Se realiza siguiendo el protocolo de **Shriner et al (1976)**, que señala en su libro “Identificación de Compuestos Orgánicos”.

Es una prueba fisicoquímica de importancia para la elucidación de la estructura molecular de un compuesto. Si se dispone de un patrón de una sustancia con el que se puede comparar la sustancia aislada, se mezclan mecánicamente ambas sustancias, si no se observa depresión en el punto de ebullición del patrón y por el contrario funde a la misma temperatura, la sustancia de comparación es idéntica.

En otro caso se mide el punto de fusión de la sustancia en estudio y se busca el valor en la literatura por ejemplo en el Handbook of Chemistry and Physics CRC–Press, Beilstein, etc. Si coincide el valor del punto de fusión de la sustancia de prueba con el de la literatura, se asume que se trata de un mismo compuesto. Los métodos que pueden utilizarse son los siguientes:

➤ *Aparato de Thiele para medir Punto de Fusión*

Es una técnica clásica. El punto de fusión se puede determinar en el aparato de Thiele, un recipiente de vidrio en forma de una pistola en el que se introduce aceite mineral, luego un termómetro al cual va adosado un tubo capilar que contiene la muestra cerca al bulbo del termómetro.

En la parte exterior se coloca otro termómetro paralelo al introducido en el Thiele, se calienta por la parte de abajo el Thiele con mechero de bunsen cuya velocidad de elevación de la temperatura debe ser de 1 a 2°C/Minuto.

Se deberá observar la temperatura a la cual la sustancia prueba empieza a fundirse, es decir aquella a la cual comienza a licuarse (T_1), este valor se anota como el intervalo del punto de fusión.

También debe medirse la temperatura registrada por el termómetro exterior (T_2), la corrección del vástago se calcula por la fórmula:

$$\text{Corrección} = 1N (T_1 - T_2) \times 0.000154$$

- N =grados de recorrido la columna arriba del nivel del baño de aceite
- T_1 =Punto de fusión observado.
- T_2 =Temperatura promedio de la columnilla de mercurio.

Esta corrección se añade al punto de fusión observado y del punto de fusión corregido ⁽¹⁶⁾. En la actualidad existen equipos modernos para detectar el punto de fusión y son los siguientes:

- **Aparato de Fisher John's:**

Consiste en una platina de aluminio que se calienta eléctricamente y está provisto de un termómetro que registra lecturas hasta 300°C. La muestra se coloca entre 2 cubre objetos de 18mm en la depresión de la platina de aluminio.

La temperatura se regula por medio de un transformador variable y el punto de fusión se observa con ayuda de un foco de iluminación y una lupa que agranda el tamaño de la muestra y permite observar desde el primer momento en que se funden los cristales ⁽¹⁶⁾.

- **Aparato Nalge–Axelrod:**

Consiste en un microscopio de 25 aumentos que tiene insertado un filtro polaroide, una fuente de iluminación, una platina de aluminio para el calentamiento eléctrico y un termómetro que registra temperaturas hasta de 400°C. La muestra se coloca entre 2 cubre objetos de 18mm en la depresión de la platina de aluminio, se enciende la luz y se enfoca el microscopio, el tubo se hace girar hasta que casi se crucen los filtros polaroides a medida que se va elevando la temperatura se observa nítidamente como empiezan a fundirse los cristales ⁽¹⁷⁾.

2.1.13 Identificación de las Características Fisicoquímicas de la Cafeína:

- Sólido blanco en forma de agujas blandas y sedosas(cristales monoclinicos)
- Punto de Fusión: 238°C.
- Solubilidad: agua, alcohol, piridina, cloroformo.

2.1.13.1 Propiedades Organolépticas:

Es de sabor amargo pero no persistente ⁽¹⁸⁾.

2.1.13.2 Punto de Sublimación:

Oscila entre 89°C y 178°C ⁽¹⁹⁾

2.1.13.3 Solubilidad:

Soluble en agua, alcohol, cloroformo, piridina.

2.1.13.4 Determinación de su Peso Molecular (PM)

Cuando no se dispone de un equipo de espectrometría de masas (E.M), que sería lo deseable, es fácil determinar el peso molecular (pico padre del compuesto), un procedimiento clásico es el denominado método de Rast que consiste en medir la depresión del punto de fusión del D-Camphor natural. El procedimiento es el siguiente:

- Se toma un tubo pequeño de 8 x 50 mm limpio y seco, se determina su peso.
- En el tubo se coloca 50mg del compuesto (muestra problema) y luego se pesa exactamente, después se añade 500mg de D-Camphor y el tubo se vuelve a pesar. El contenido del tubo se funde en una llama lenta hasta que todo se vuelva un líquido transparente.
- Después que se ha enfriado el contenido del tubo se pasa a una luna de reloj, el material se pulveriza en un mortero pequeño y se determina su punto de fusión se puede utilizar el aparato de Thiele o mejor sería utilizar el de Nalge-Axelrod.

- Se toma la temperatura de fusión cuando la disolución se vuelva totalmente transparente (sin presencia de fase sólida), también se determina el punto de fusión del D-Camphor original. La diferencia entre estos dos el punto de fusión da la depresión que en el punto de fusión del D-Camphor produjo el compuesto problema. El peso molecular se calcula utilizando de formula siguiente:

$$M = \frac{39.7 \times W_1 \times 1,000}{\Delta T \times W_2}$$

W_1 = Peso del compuesto problema.

W_2 = Peso del D-Camphor.

ΔT = Depresión en el punto de fusión.

39.7 = K = Constante de depresión molar de D-Camphor.

2.1.13.5 Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Esta prueba tiene carácter confirmatorio se realiza para saber si el compuesto aislado es cafeína. Stahl-Egon ⁽¹⁹⁾ propone que se puede correr la muestra problema sobre una placa de sílica gel bufferada a pH 6.8 y usar como solventes CHCl_3 : ETOH 96% (v/v), el valor de $R_f \times 100$ debe ser igual a 57, este valor es prueba confirmatoria de que la muestra problema es cafeína.

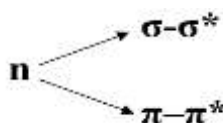
2.1.13.6 Pruebas Espectrométricas

➤ *Espectrometría Ultra Violeta-Visible*

Un Espectrofotómetro UV-Visible es un equipo que consta de una fuente de radiación (Lámpara incandescente de Tungsteno) un monocromador que dispersa la luz de la fuente de radiación en longitudes de onda separadas, suele usarse redes de difracción.

Como la molécula de cafeína posee una enona conjugada formada por el grupo ceto C=O en posición 6 y el doble enlace C=C en posición 4 y 5, además el grupo C=O en posición 2 es un centro cromofórico, en este grupo existe una absorción electrónica manifestada por los electrones no enlazantes que bajo la acción de la radiación con el Espectrómetro UV-Visible, manifiesta las interacciones siguientes:

Banda de los electrones no enlazantes del grupo C=O al absorber energía se promueven a otros niveles energéticos.



- El espectrómetro capta la interacción $\pi-\pi^*$
- Una banda mostrada por la transición $\pi-\pi^*$ del doble enlace C=C
- Una banda $\pi-\pi^*$ del C=N en posición 8-9.

El aparato de Espectrometría UV-Visible muestra una gráfica de intensidad de absorción (Transmitancia o Absorbancia en el eje Y y longitud de onda en el eje X) ⁽²¹⁾

La cafeína en disolución neutra (disuelta en agua destilada) muestra un valor de longitud de onda máxima a 278 nm. Todas las purinas naturales presentan una banda de absorción intensa entre 250-290 nm.

Un fotómetro donde la luz monocromática se transforma en luz pulsante por medio de un interruptor periódico para que los haces pasen al área de la muestra, aquí se colocan pequeñas celdas en la región más cercana del área del detector, en el área de detección se registran los espectros en forma de absorbancia $\left(\frac{1}{T}\right)$ versus longitud de onda.

➤ *Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear*

El Espectrofotómetro de Resonancia Magnética Nuclear es un equipo diseñado para lograr ventajas de las propiedades del núcleo.

Este instrumento consta de un magneto muy fuerte. El corazón del magneto tiene un espiral que suministra energía en el rango de la frecuencia de radioonda del espectro electromagnético.

La energía E de un fotón de radiación electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia (ν) esto es:

$$E \propto \nu, \text{ o como igualdad}$$

$$E = h\nu$$

$$h = 6.626 \times 10^{-27} \text{ ergios x seg. (Constante de Planck)}$$

El núcleo absorbe energía en el rango de radiofrecuencia y excita un spin que se halla en el estado más estable conocido como spin α al estado más alto de energía conocido como spin β .

En sentido contrario, cuando el spin β es puesto en libertad retorna al estado de spin α y se restablece el equilibrio de α - β , esta información de lo acontecido es enviada a una computadora donde es analizada, la computadora interpreta la transformada de Fourier y envía la información a un registrador y este imprime el espectro de absorción dando información acerca de número, tipo y conectividad de protones H^+ y átomos de Carbono-13.

La energía requerida para lanzar un spin del nivel α al nivel β es muy pequeño cerca de 10^{-5} KJ/mol, el rango de energía de absorción es de 5-50 KJ/mol.

Luego, la energía requerida para arrancar un spin desde el estado α y llevarlo al estado β es muy pequeño; sin embargo un pequeño exceso de 0.0005% de núcleo están en el estado de energía de spin más bajo en condiciones de equilibrio, este pequeño exceso es suficiente para medir cuando la energía es absorbida o emitida por un cambio de estado de spin del núcleo.

Hay aparatos de Resonancia Magnética Nuclear de 100 MHz, instrumentos modernos operan a 300, 400, 900 MHz, se espera pronto disponer de aparatos de un GIGA Hertzio.

La muestra que debe ser analizada en un espectrómetro es de aproximadamente 15 mg que se disuelve en 0.6 ml de solvente.

El solvente usado no contiene núcleos que absorban energía de radioondas en el rango en que los protones absorben radiación. Los solventes más comúnmente usados son: Tetracloruro de Carbono, Cloroformo deuterado (CDCl_3) y agua deuterada (D_2O).

➤ ***Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMNH⁺)***

Un protón es un átomo de Hidrógeno sin electrón, la RMN de Protones es un estudio de los átomos de Hidrogeno covalentemente conjugadas con otro átomo, usualmente carbono y no el estudio de protón libre.

La RMN es una herramienta que diagnostica los átomos de Hidrógeno en diferentes ambientes químicos necesarios para absorber radioondas a diferentes frecuencias.

Los núcleos del átomo de Hidrogeno están rodeados por una nube electrónica (densidad electrónica) de sus electrones de enlace. El campo magnético exterior posee una fuerza (Torque) sobre los electrones obligándolos a generar un campo magnético H_{local} que es opuesto al campo magnético externo H_0 .

La densidad electrónica alrededor de un núcleo de Hidrógeno es diferente de los protones que existen en diferentes ambientes químicos. Desde luego la densidad electrónica varía el campo magnético filtrado por un núcleo de Hidrógeno de modo que la diferencia entre campo magnético externo H_0 y campo magnético H_{local} es igual a campo magnético efectivo.

$$\mathbf{H_{\text{eff}} = H_0 - H_{\text{local}}}$$

Si el campo magnético cambia por núcleos filtrados su frecuencia a la cual la radiación es absorbida también cambia.

La frecuencia a la cual la radiación es absorbida da información acerca del medio químico de los protones responsables de estas absorciones.

En un estudio de Resonancia Magnética Nuclear los protones pueden ser: Equivalentes y No Equivalentes, ellos absorben radiación a frecuencias ligeramente diferentes en valores medidos en megahercios.

Es más conveniente expresar estas diferencias a frecuencias relativas en base a un standard.

El standard elegido en la mayoría de los casos es la molécula de TMS (Tetrametilsilano)

Todos los protones se miden en TMS y cuando un medio químico es idéntico a los protones se denomina equivalentes y todos absorben radiación a la misma frecuencia.

La diferencia en frecuencias de absorción de estos valores standard se mide en Hertz.

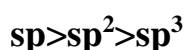
Los desplazamientos químicos (δ) en la escala horizontal que va de cero a 10 de derecha a izquierda. La escala es en ppm o unidades delta (δ)

Las líneas verticales representan la absorción de protones.

Se dice que un desplazamiento es a campo alto cuando el valor se halla entre 5 y cero, cuando es a campo bajo es de 5 a 10.

La mayoría de protones en los compuestos orgánicos están enlazados a átomos de carbonos.

La electronegatividad del carbono varía en función de la hibridización, los átomos de carbono hibridizados como sp son más electronegativos que sp^2 y sp^2 más electronegativo que sp^3 .



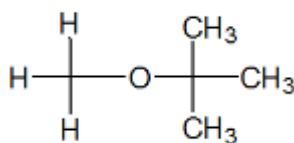
Protones en alcanos sp^3 tienen desplazamientos químicos de 0-1.5 ppm.

Alquenos (vinilos) de hibridización sp^2 absorben entre 4.5-6.5 ppm y protones en alquinos (sp) absorben en el rango de 2.5-3.0.

Los efectos de inducción se dan cuando la dirección del campo magnético inducido está en la misma dirección que el campo magnético exterior.

El área de cada pico es proporcional al número de protones.

El número relativo de átomos de hidrogeno de una molécula depende de los grupos equivalentes y no equivalentes, por ejemplo: la molécula de Ter-butil-éter metílico.



Contiene 3 grupos de protones equivalentes, el grupo Ter-butil tiene 9 protones equivalentes, mientras que el metil del grupo metoxilo tiene 3 protones químicamente equivalentes. Hay moléculas como las del acetato de etilo $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{-CH}_3$ que sufren desdoblamiento spin-spin por eso en él deben aparecer 8 picos:

- Un pico (singlete) corresponde a 3 protones equivalentes del metilo del grupo acetilo.
- 4 protones del grupo resonante metileno o carbeno y 3 del grupo metilo.
- 4 protones a campos bajos centrales a 4.1 ppm que corresponden al grupo carbeno.
- picos a campo alto centrales a 1.3 ppm que corresponde al metilo que interacciona con el carbeno.
- Y un solo pico singlete del metilo del grupo acetilo a 2.1 dado por 3 protones equivalentes.

Un desdoblamiento de la absorción en 2 ó más picos se denomina multiplete, dos picos son un doblete, 3 picos un triplete, 4 un quarteto, 5 un quintuplete, etc.

➤ *Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13*

La identificación de un compuesto por espectrometría de RMNH^+ precisa como complemento de la espectrometría por el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13.

Hay varias diferencias entre la espectroscopia de RMN de C-13 y la de protones, por ejemplo la energía para arrancar un spin de una posición α , llevada a la posición β ocurre a diferente rango de frecuencia (Energía).

La absorción de Carbono-13 no aparece en el espectro de protones, el desplazamiento químico en RMNH^+ aparece en un rango de 0 a 10 ppm, el rango para el espectro de C-13, aparece entre 0 a 220 ppm, lo cual es una ventaja ya que las absorciones de C-13 están mucho más alejadas que las absorciones de protones y hay menos posibilidad de que se superpongan los picos no equivalentes. El rango aproximado de los desplazamientos químicos de átomos de carbono no equivalentes es el siguiente:

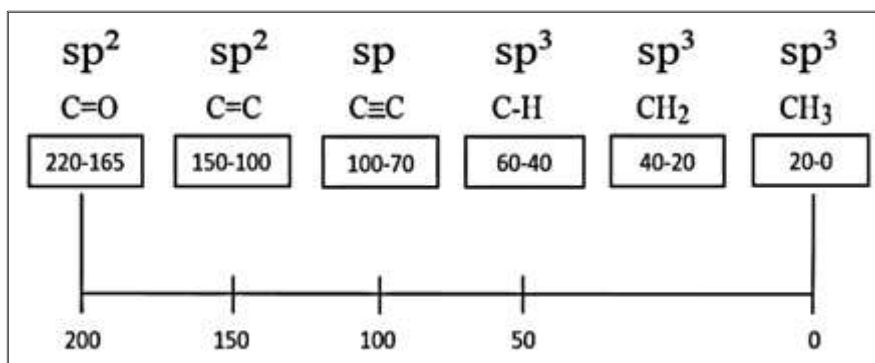


Figura N° 03. Rango aproximado de valores de desplazamiento químico en RMNC-13

Mediante Espectrometría de RMNC-13, se puede determinar el número de carbonos que tiene la molécula en estudio. Cuando los carbonos son equivalentes aparecen en un mismo valor de desplazamiento.

El desacoplamiento de banda ancha elimina toda interacción de acoplamiento spin-spin carbono hidrógeno.

Cuando un espectro está desacoplado el multiplete se transforma en un pico simple, elevando la relación señal-ruido.

2.2 VARIABLES:

2.2.1 Identificación del Estudio: Aislamiento de Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi). Determinación estructural por métodos Fisicoquímicos y Espectrométricos.

2.2.1.1 Variable Independiente:

Aislamiento de Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi).

2.1.1.2 Variable Dependiente:

Determinación estructural por métodos Fisicoquímicos y Espectrométricos.

2.2.2 Operacionalización de Variables

Es el procedimiento que permite pasar de las variables generales a las intermedias y de éstas a los indicadores con el objetivo de transformar las variables abstractas en variables directamente observables e inmediatamente operativas.

TABLA N° 03. Variable Independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA	ÍNDICE
 AISLAMIENTO DE CAFEÍNA DE LAS HOJAS DE <i>Ilex nayana</i>(GUAYUSA CASPI)	La Cafeína como derivado de bases purínicas es considerado como un alcaloide imperfecto. <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi) es una Aquifoliáceae del mismo género que la Hierba mate (<i>Ilex paraguaiensis</i>) abunda en selva baja por su relación de parentesco (biogenético) con <i>Ilex nayana</i> especie aun no estudiada, tiene contenido de Cafeína en sus hojas. Es una planta que no es conocida en relación con su contenido de cafeína.	Se trata de separar la Cafeína de <i>Ilex nayana</i> (Guayusa Caspi) para demostrar su contenido usando sustancias de inclusión o tamices moleculares como el MgO que separa la Cafeína en forma selectiva cuando un extracto alcohólico de Cafeína se vierte sobre el tamiz molecular, los poros absorben la cafeína de la que se la libera con H ₂ SO ₄ al 10% y se la extrae con CHCl ₃ en el alto estado de pureza al cristalizar en medio alcohólico o acuoso.	Presencia de Cafeína.	Intervalo tipo cuantitativo.	Porcentaje de Cafeína en cantidad semejante al que posee el café o té por ser considerado como fuente proveedora de alcaloide

TABLA N° 04. Variable Dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA	ÍNDICE
DETERMINACIÓN POR MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS	Mediante métodos Físicoquímicos podemos caracterizar la forma del cristal, propiedades organolépticas, punto de fusión, punto de sublimación y solubilidad de la cafeína.	Con los cristales de cafeína aislados se desarrolla una cromatografía TLC usando sílica gel F ₂₅₄ y usando como solvente de resolución Benceno acetato de etilo (30:70), para verificar si el compuesto aislado tiene un valor de R _f x 100 de 70 prueba confirmatoria de cafeína.	Propiedades organolépticas	Sabor amargo	No persistente
			Punto de Sublimación	89°C a 178°C	Grados centígrados
			Punto de Fusión	238°C	Grados centígrados
			Solubilidad	Agua, alcohol, cloroformo, piridina.	1gr/3mL
			R _f x 100 del TLC.	Valor igual a 57	Solventes CHCl ₃ :EtOH (96°) (90:10 v/v)
DETERMINACIÓN POR MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS.	Mediante métodos espectrométricos se determina por UV-Visible la longitud de onda de la cafeína. Su espectro de resonancia magnética nuclear que nos permite conocer el número de protones de la molécula y por C-13, determinar el número de átomos de carbono que posee la molécula, estos parámetros nos permite comprobar que la molécula que aislamos es cafeína.	La solución metanólica se pasa por un espectrómetro UV-Visible que debe tener una longitud de onda de 273 nm. Cuando se pasa por un aparato de RMNH ⁺ se determinará el número de átomos de hidrógeno presentes en la molécula, el aparato de espectrometría de C-13 nos señala el número de átomos de carbono presentes en la molécula.	Espectro de RMNH ⁺ .	Picos entre 0 – 10 ppm Constantes de Acoplamiento	Singletes, dobletes, tripletes y multipletes.
			Espectro de RMNC-13.	Picos entre 0 – 278 ppm	Número de Carbono = 8 Picos Equivalentes

2.3 HIPÓTESIS

Las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi) contienen Cafeína y se logró determinar su presencia mediante métodos Fisicoquímicos y Espectrométricos.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio fitoquímico consistió en indagar la presencia de cafeína en las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), especie vegetal de la familia Aquifoliaceae que biosintéticamente guarda parentesco con *Ilex paraguayensis* (mate). La literatura científica no reporta ninguna información al respecto tampoco NAPRALET ⁽¹⁾. Se trató de una investigación experimental donde se combina trabajo de campo para la recolección de la muestra, trabajo de gabinete para la identificación botánica para autenticar la especie vegetal, procedimientos químicos para el aislamiento del principio activo (Cafeína) y pruebas instrumentales de espectroscopia UV – Visible y de Resonancia Magnética Nuclear para su identificación (Elucidación de la estructura química).

Este estudio es una mezcla de investigación científica básica con la investigación científica tecnológica o aplicada en relación con el primer aspecto se trata de un aporte al conocimiento quimiotaxonómico de esta planta, si tiene ocurrencia de cafeína como lo posee la especie *Ilex paraguayensis*, pero es investigación tecnológica en cuanto a que si posee cafeína puede ser utilizada como nueva fuente alternativa por el consumo humano e industrial.

Es descriptivo porque partiendo del conocimiento de otras plantas como *Ilex paraguayensis* que contiene cafeína, pudimos establecer bajo criterios quimiotaxonómicos que *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), podría contener cafeína lo que se hizo evidente en nuestro estudio luego de su aislamiento, verificación por pruebas fisicoquímicas y espectrométricas y se dice que es longitudinal por que guarda una secuencia temporal (tiempo de desarrollo) de los aspectos que van del inicio hasta su concreción final que es la verificación de la cafeína en *Ilex nayana*.

3.1.1 Diseño de la Investigación

El estudio se realizó siguiendo un bosquejo de todas las transformaciones por la que tiene que pasar la muestra hasta aislar la cafeína, realizar el análisis fisicoquímico y los análisis espectrométricos hasta la elucidación de la estructura química.

3.1.2 Población y Muestra

3.1.2.1 Población:

- ✓ Constituida por árboles de la Especie de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi) del Arboretum de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, de los cuales se recolecto 2Kg de hoja.

3.1.2.2 Criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la selección de la muestra:

- ✓ Hojas enteras que no recibieron daño de depredadores (insectos).
- ✓ Se recogió la muestra 2 horas después de la salida del sol (8 a.m.).
- ✓ Se recogió ramas con inflorescencia y frutos para su identificación botánica.

3.1.2.3 Criterios de Exclusión:

- ✓ Se descartó hojas malogradas.
- ✓ No se recogió hojas del suelo.

3.1.3 Procedimiento Experimental

3.1.3.1 Etapas:

3.1.3.1.1 Recolección de la Muestra:

Se recolectó las hojas en el Arboretum de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, se eligió un árbol de abundante follaje. Se tomó 2 kg de hojas frescas para el trabajo experimental y se recogió una rama con hojas, flores y frutos para su identificación en el Herbarium Amazonense de la UNAP.

3.1.3.1.2 Identificación de la Muestra:

Se realizó en el Herbarium Amazonense de la UNAP.

3.1.3.1.3 Procesamiento de la Muestra

3.1.3.1.3.1 Secado:

2 kg de muestra se secó al aire libre en el laboratorio y se obtuvo 1.2 kg de muestra seca.

3.1.3.1.3.2 Molienda:

Las hojas molidas pasaron por tamiz 80 ASTM y se obtuvo 600 gramos, luego por tamiz 100 ASTM y se obtuvo 300 gr.

3.1.3.1.3.4 Desengrase:

1. Se trabajó con 300 gramos de polvo fino pasado por malla 100 ASTM.
2. Se elaboraron cartuchos de papel filtro y en cada cartucho se depositó 50 gramos de muestra (6 muestras). **Ver Foto N° 03**
3. Se acomodaron los cartuchos en el vaso de Soxhlet. **Ver Foto N° 04**
4. Se introdujo éter de petróleo en el balón reservorio de solvente de ½ litro. Se acopló el balón al vaso Soxhlet y al refrigerante de reflujo, se elevó la temperatura de la batería de calentamiento a 70 °C y se extrajo por 120 horas se desmontó el equipo soxhlet, se separó el polvo de las hojas desengrasadas. Se pesó y se obtuvo 280 gramos.

3.1.3.1.4 Extracción alcohólica del polvo de hojas desengrasadas:

Se reunió el polvo de hojas desengrasadas (6 cartuchos), se llevó a un balón de fondo plano de 1 litro y se maceró con 600 ml de alcohol etílico por 4 días con agitación a intervalos. **Ver Foto N° 06**

3.1.3.1.5 Filtración:

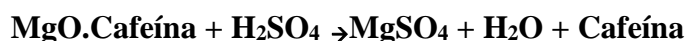
Se llevó la muestra a un embudo de Buchner acoplado a una bomba de vacío y se obtuvo 350 ml de extracto alcohólico.

3.1.3.1.6.- Proceso de Aislamiento de Cafeína:

1. Se pesó 60 gramos de óxido de magnesio (MgO), se introdujo en un vaso de precipitado de 1 litro, el filtrado que se obtuvo se vació sobre el óxido de magnesio y se agitó con una bagueta hasta que fue adsorbido completamente por el óxido de magnesio. **Ver Foto N° 08**
2. Se evaporo el exceso de alcohol llevando la masa húmeda a un secado lento en baño de arena 45 °C.

Esta etapa es importante porque aquí se cumple un proceso fisicoquímico de separación selectiva de la cafeína, el MgO hace el papel de una inclusión, adsorbiendo en su retículo cristalino a las moléculas de cafeína cumpliendo con el papel de hospedero, mientras la cafeína hace el papel de huésped.

3. Luego, la inclusión de MgO.Cafeína se pulveriza con mortero y se le agrega ácido sulfúrico(H₂SO₄) al 10% (**Ver Foto N° 10**), se produce la reacción siguiente:



4. Se filtra el producto de la reacción para separar el MgSO₄ (sólido) y la fase acuosa en la que está contenida la cafeína se extrae por 3 veces con cloroformo **Ver Foto N° 13**.
5. Se concentra en rotavapor el extracto de cloroformo y precipita la cafeína en forma de agujas sedosas⁽¹³⁾.

3.1.3.1.7.- Purificación de la Cafeína:

Los cristales de cafeína impura se diluyeron en agua destilada, se calentó en Hot Plate de temperatura regulable a 70 °C, se agregó carbón activado en pequeña cantidad, se filtró por 2 veces usando papel filtro y algodón como capa filtrante.

El filtrado se dejó en reposo y precipitó la cafeína como cristales blancos sedosos en forma de agujas. Se pesó en balanza analítica y arrojó 2.66 gramos. **Ver Foto N° 15**.

3.1.3.1.8.- Rendimiento:

Se determinó sobre la base de la materia prima desengrasada (280 gramos).

Se obtuvo 2.66 gramos de cafeína.

El cálculo se realizó aplicando la fórmula siguiente:

$$\% \text{Rendimiento Alcaloide} = \frac{\text{Peso (gr) de los Cristales Aislados}}{\text{Peso (gr) de la Muestra desengrasada}} \times 100$$

3.1.4 Elucidación de la Estructura Química

3.1.4.1 Pruebas Físico – Químicas

3.1.4.1.1 Punto de Fusión:

Se determinó en el Kisatom, un aparato modificado de Nalge, provisto de 3 canales donde se introduce el tubo capilar con una pequeñísima fracción de cristales de la muestra que se va a observar. **Ver Foto N° 16**

Los cristales se fundieron a temperatura era de 234.8 °C que se comparó con 235 °C que obra en la literatura ⁽⁸⁾. Se observó que estos valores solo tiene de diferencia 0.2 °C diferencia poco significativa que no deja dudas como para poder especular que se trata de otro compuesto.

3.1.4.1.2 Cromatografía de Capa Fina (TLC):

Esta técnica solo hemos utilizado para verificar si la sustancia que aislamos es cafeína, por eso hemos seguido el protocolo recomendado por Stahl–Egon ⁽²⁰⁾ que en su libro “Thin Layer Chromotography” señala:

1. Disolver 20 mg de cristales de la muestra en cloroformo, esta solución se aplica en raya sobre un cromatofolio de 2.5 x 20 centímetros de Sílicagel 60 F₂₅₄.
2. Se usa como solvente de resolución Acetato de etilo: Metanol: Ácido Acético (80:10:10 V/V).

- 3 En la cámara saturada con estos solventes se introdujo el cromatofolio, en 16 minutos de corrida se sacó la placa, se dejó secar y se roció el cromatofolio con I₂resublimado, se observó una banda que corrió a 7.38 cm y el frente del solvente llegó hasta 18 centímetros.
- 4 El cálculo para determinar R_Fx100 es:

$$R_f \times 100 = \frac{\text{Distancia del Solutorecorrido}}{\text{Frente del Solvente}} \times 100$$

$$R_f \times 100 = \frac{73.8}{18} \times 100$$

$$R_f \times 100 = 41$$

El valor de R_fx100 = 41 coincide con lo reportado por Stahl–Egon ⁽²⁰⁾.

3.1.4.1.3 Determinación del peso molecular: Método de Rast ⁽¹⁷⁾

- 1) Se usó este método cuando porque no disponemos de un espectrómetro de masas.
- 2) Se tomó 500 miligramos de D–Camfor natural y se mezcló con 50 miligramos de la muestra aislada.
- 3) Se determinó el valor de ΔT que es el valor de depresión en el punto de fusión del D–Camfor cuando está mezclado con la muestra (se mide este valor en el aparato Kisatom que es un Nalge modificado).

Punto de fusión del D–Camfor = 176 °C.

Punto de fusión del D–Camfor + muestra aislada = 155.43 °C.

$$\Delta T = 176 - 155.43$$

$$\Delta T = 20.57$$

Valor de la constante de depresión 39.7 (Tomado del libro Identificación de los Compuestos Orgánicos de Shriner).

Para el cálculo se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{Peso Molecular (M)} = \frac{39.7 \times W_1 \times 1,000}{\Delta T \times W_2}$$

W_1 = Peso del compuesto problema = 0.050 gr

W_2 = Peso del D-Camphor = 0.50

ΔT = Depresión en el punto de fusión = 20.57

K = Constante de depresión molar de D-Camphor = 39.7

$$\text{Peso Molecular (M)} = \frac{39.7 \times 0.05 \times 1,000}{20.57 \times 0.50}$$

$$\text{Peso Molecular (M)} = \frac{39.7 \times 0.05 \times 1,000}{20.57 \times 0.50}$$

$$\text{Peso Molecular (M)} = 192.99 \approx 193$$

3.1.4.1.4 Pruebas Espectrométricas para la Elucidación de la Estructura Química

3.1.4.1.4.1 Espectrometría UV-Visible:

Esta prueba se realiza en moléculas que tienen estructuras conjugadas. La molécula de cafeína tiene una conjugación del doble enlace carbono-carbono (C=C) en posición 4 – 5 con el grupo ceto (C=O) en posición 6.

Todas las purinas naturales presentan una banda de absorción intensa en la región comprendida entre 250–290 nm, en disoluciones neutras de cafeína muestra una banda a longitud de onda de 278 nm, disuelto en MeOH el λ_{max} de la cafeína es 273 nm. Cuando se disuelve en agua destilada el λ_{max} es de 278 nm⁽¹³⁾ (19). Ver figura del espectro UV-Visible de la muestra disuelta en MeOH y disuelto en agua fue determinada en un aparato SHIMADZU 120 A. **Ver Imagen N° 03 Espectro UV - Visible.**

3.1.4.1.4.2 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear:

3.1.4.1.4.2.1 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMNH⁺)

La muestra de estudio fue analizado en una Aparato Bruker de 300 MHZ de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Este equipo consta de un magneto superconductor ultrashield de 7.05 Teslas, una sonda dual de 5mm para núcleos de protones (H⁺) y de carbón 13 (¹³C) una unidad de temperatura variable (20 – 200 °C) y una consola AC 300, la consola permite programar diferentes tipos de experimentos mono y bidimensionales para que mediante un estudio detallado se puede elucidar la estructura química de moléculas simples y complejas.

La resonancia magnética nuclear de protones permite leer en el espectro tipo y número de protones por integración.

El rango de desplazamiento del equipo es de 0–10 ppm y las señales por lo general son finas. El cálculo de las constantes de desplazamiento (J) entre núcleos vecinos ayuda a identificar a los hidrógenos conectados a través del esqueleto molecular.

Para el espectro de protones se preparó una solución a base de 5 miligramos de la muestra se disolvió en 1 mililitro de agua deuterada (D₂O) y se realizó un total de 10 adquisiciones utilizando un tiempo de 2.70 microsegundos y un ancho espectral (SW = 6024.10 Hz) de 20.07 ppm. Ver figura. Anexo Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones.

3.1.4.1.4.2.2 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMNC-13)

La RMN de Carbono-13 es menos sensible que la de protones, pero tiene un rango de desplazamiento químico mucho más amplio (0–200 ppm), desacoplando el protón se pueden obtener espectros donde cada señal corresponde a un carbono si es que estos no son equivalentes.

Entonces el desacoplamiento de protones determina claramente el número de átomos de carbono de la molécula. Para el espectro de RMNC-13 se preparó una solución de 20 mg de la muestra en 1 mL de agua deuterada (D₂O).

Se realizaron un total de 20.600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y un ancho espectral de 245.38 ppm (SW=18518.52 HZ)

(Ver figura) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C-13, desacoplado los átomos de carbono aparecen como picos simples.

3.1.5 Materiales, Reactivos y Equipos utilizados

3.1.5.1 Materiales de vidrio

- ✓ Vaso de precipitado.
- ✓ Embudos.
- ✓ Pera de decantación.
- ✓ Probetas.
- ✓ Matraces.
- ✓ Luna de reloj.
- ✓ Placa de pruebas.
- ✓ Cámara cromatografía.
- ✓ Termómetro.
- ✓ Pipetas.

3.1.5.2 Materiales de Metal:

- ✓ Escofina.
- ✓ Aros.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Pinzas.
- ✓ Soporte universal.

3.1.5.3 Materiales de Filtración:

- ✓ Algodón y Papel filtro

3.1.5.4 Materiales de Bioseguridad:

- ✓ Máscaras, Guantes y Mandil.

3.1.5.5 Reactivos:

- ✓ Ácido acético.
- ✓ Ácido sulfúrico.
- ✓ Amoniaco.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Acetato de etilo.
- ✓ Ácido nítrico.
- ✓ Carbón activado.
- ✓ Cloroformo.
- ✓ Etanol.
- ✓ Éter de petróleo.
- ✓ Iodo Bisublinado.
- ✓ Metanol.
- ✓ Murexida.
- ✓ Oxido de magnesio.

3.1.5.6 Equipos:

- ✓ Espectrofotómetro UV Perkin Elmer 3920 PUCP.
- ✓ Espectrofotómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker AC 300.13 (400 MHz) para el núcleo de protones y de 75.47 MHz para el núcleo de C – 13 de la PUCP – Lima.
- ✓ Aparato Fisher John's para Punto de Fusión.
- ✓ Revelador UV – 254 – 366 nm.
- ✓ RotavaporBuchi – R – 3000.
- ✓ Batería Soxhlet.
- ✓ Hot – Plate.
- ✓ Estufa Memmert.
- ✓ Baño María.
- ✓ Molino de discos.
- ✓ Balanza analítica.

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1 Rendimiento Porcentual del Alcaloide de Cafeína de las hojas de

Ilex nayana (Guayusa Caspi)

Se obtuvo **0.95%** de rendimiento teniendo en consideración lo siguiente:

$$\% \text{Rendimiento Alcaloide} = \frac{\text{Peso (gr) de los Cristales Aislados}}{\text{Peso (gr) de la Muestra desengrasada}} \times 100$$

$$\% \text{Rendimiento Alcaloide} = \frac{2.66 \text{ gr}}{280 \text{ gr}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento } \% \text{Alcaloide} = 0.95\%$$

4.1.2 Resultados de las Pruebas Fisicoquímicas para la Identificación de Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)

<i>TABLA N° 05. RESULTADOS DE PRUEBAS FISICOQUÍMICAS</i>		
<i>Punto de Fusión</i>	<i>Literatura</i> ⁽⁸⁾	<i>235 °C</i>
	<i>Experimental</i>	<i>234.8 °C</i>
<i>Peso Molecular</i>	<i>Literatura</i> ⁽¹³⁾	<i>194.19</i>
	<i>Experimental</i>	<i>193</i>
<i>Color del Cristal</i>	<i>Literatura</i> ⁽¹⁹⁾	<i>Blanco</i>
	<i>Experimental</i>	<i>Blanco</i>
<i>Forma del Cristal</i>	<i>Literatura</i> ⁽¹⁹⁾	<i>Monoclínico</i>
	<i>Experimental</i>	<i>Monoclínico</i>
<i>TLC</i>	<i>Literatura</i> ⁽²⁰⁾	<i>Acetato de Etilo: Metanol: Ácido Acético (80:10:10) en Sílicagel: 41</i>
	<i>Experimental</i>	<i>Acetato de Etilo: Metanol: Ácido Acético (80:10:10) en Sílicagel:41</i>

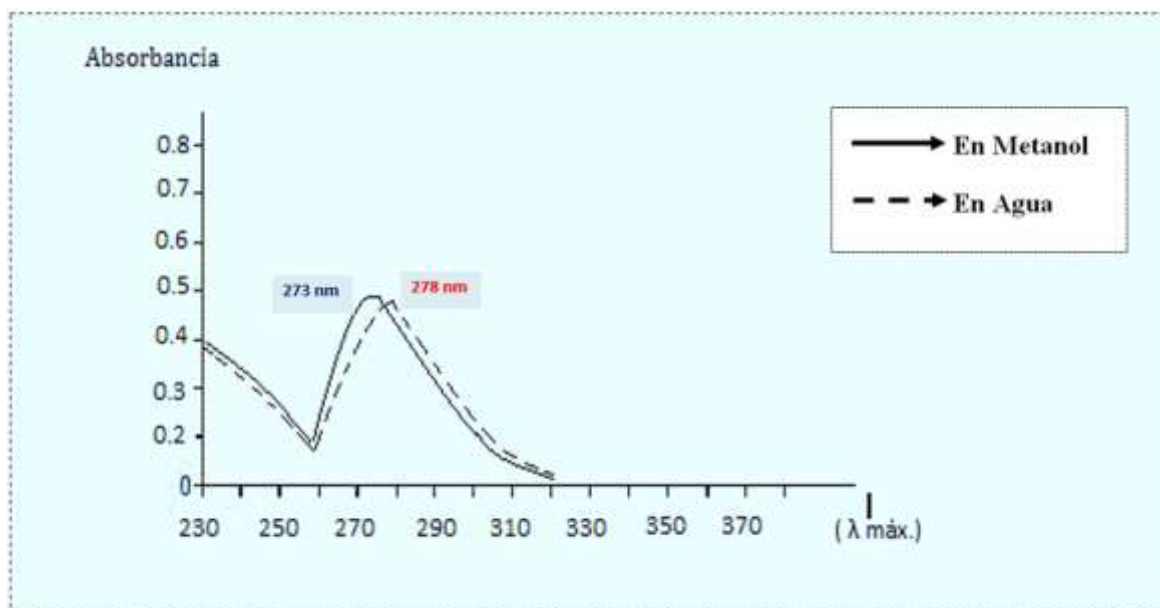
4.1.3. Resultados de las Pruebas Espectrométricas para la Identificación de Cafeína de las hojas de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)

4.1.3.1. Espectroscopia UV-Visible

TABLA N° 06. RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

λ_{max} EN AGUA	Literatura ⁽¹⁴⁾	278 nm
	Experimental	278 nm
λ_{max} EN METANOL	Literatura ⁽¹⁴⁾	273 nm
	Experimental	273 nm

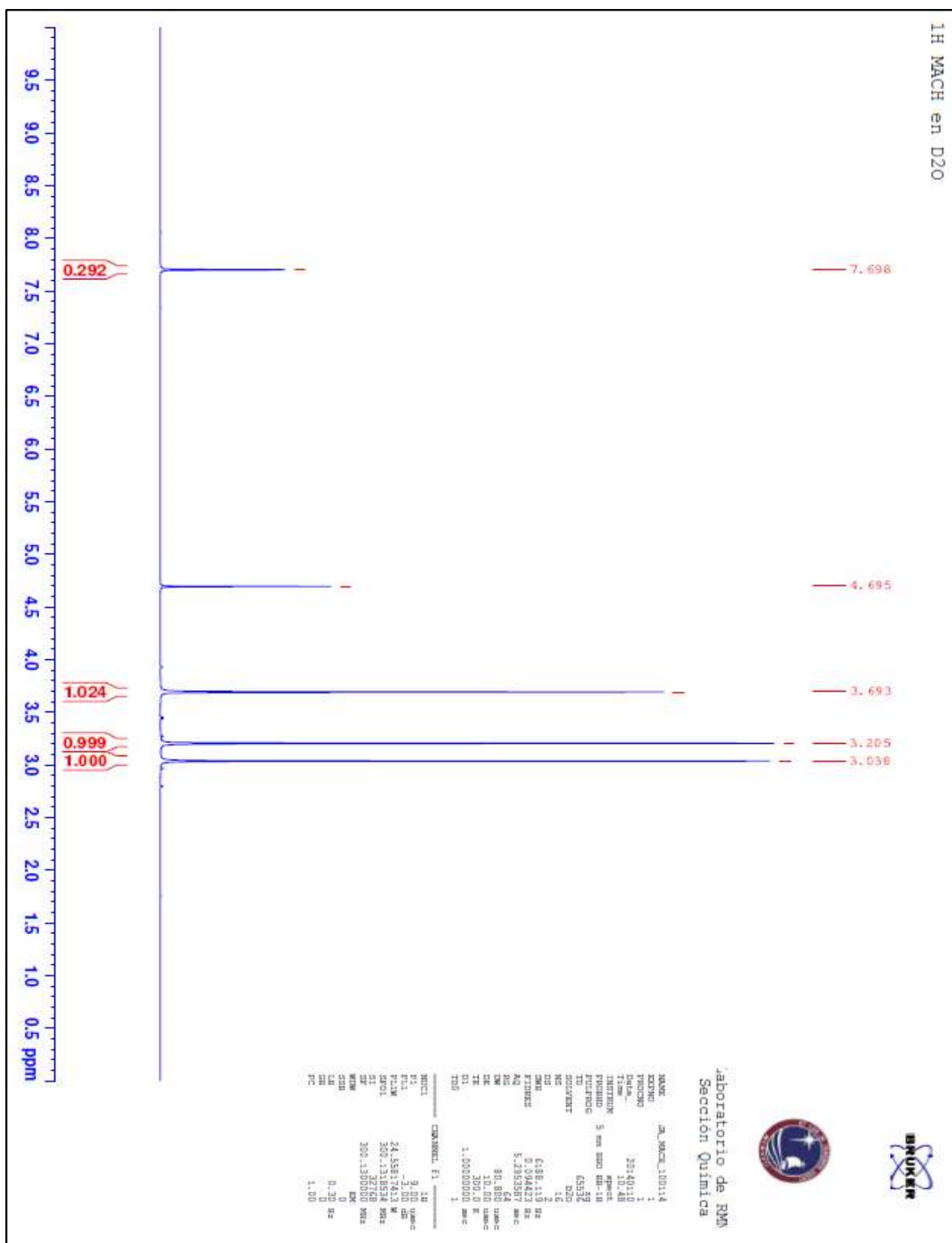
IMAGEN N° 03: Espectro UV - Visible en Metanol y en Agua



4.1.3.2. En Resonancia Magnética Nuclear de Protones H⁺

1. A δ 3.0 ppm se ubica un protón solitario del imidazol en posición 8.
2. A δ 3.313 se observa un singlete que representa 3 protones equivalentes del grupo metilo sustituyente en posición 3 en el heterociclo pirimidina.
3. A δ 3.234 se observa un singlete que representa 3 protones equivalentes del grupo metilo sustituyente en posición 1 en el heterociclo pirimidina cuya resonancia es a campo más bajo respecto al singlete en δ 3.313 debido a las influencias de los oxígenos de los grupos C=O (ceto) en posición 2 y 6 en el heterociclo de pirimidina por la electronegatividad de 3.5 que posee el oxígeno.
4. A δ 3.276 se observa una señal singlete dada por 3 protones equivalentes del grupo metilo en posición 7 sustituyente en el heterociclo imidazol.
5. A δ 7.559 ppm campo bajo se observa un singlete dado por sustituyentes metílicos en el heterociclo pirimidina en posición 1 (**Ver Imagen N° 01**).

IMAGEN N° 01: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones

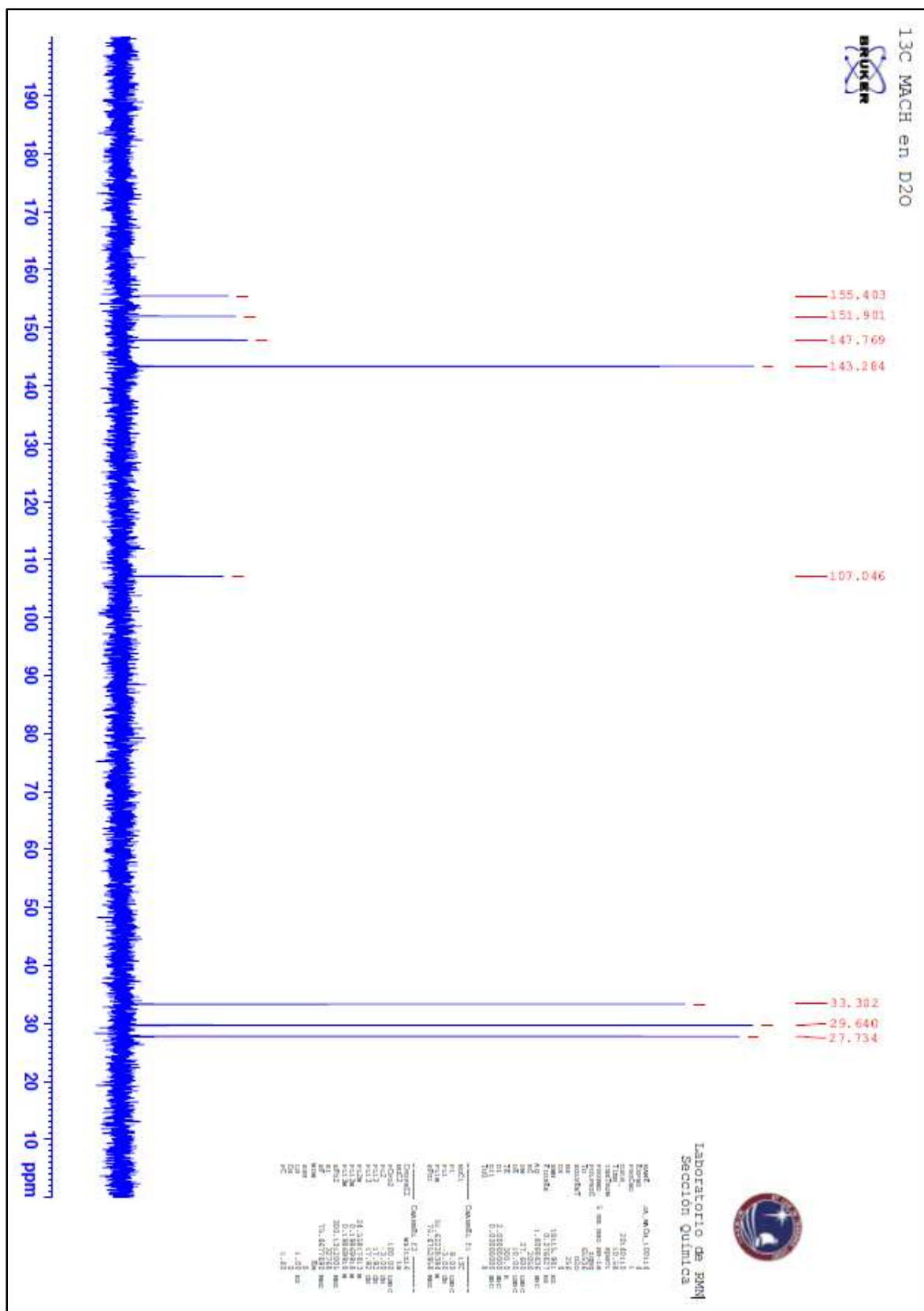


4.1.3.3. En Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13

- 1) A δ 27.930 ppm se halla el carbono del grupo metilo sustituyente en posición 7.
- 2) A δ 29.824 ppm se halla el carbono del grupo metilo sustituyente en posición 3.
- 3) A δ 33.645 ppm se halla el carbono del grupo metilo sustituyente en posición 1.
- 4) A δ 107.564 ppm se halla el carbono sp^2 desacoplado en posición 5.
- 5) A δ 141.263 ppm se halla el carbono sp^2 desacoplado en posición 4.
- 6) A δ 148.461 ppm se halla el carbono sp^2 desacoplado en posición 8.
- 7) A δ 151.658 ppm se halla el carbono sp^2 del grupo carbonilo en posición 6.
- 8) A δ 155.363 ppm se halla el carbono sp^2 del grupo carbonilo en posición 2.

En el Espectro observamos 8 señales de carbono no equivalentes como las que posee la molécula de cafeína (**Ver Imagen N° 02**).

IMAGEN N° 02: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13



4.1.4. Resultado de la Prueba Organoléptica

Unos granitos de cristales de la muestra aislada puesto en la boca produce en el paladar un sabor amargo no tan persistente como la quinina y otros principios amargos que se hallan en las plantas.

DISCUSION

- ✚ El punto de fusión de 234.8 °C medido en el aparato de Kisatom (Nalge modificado), es semejante al punto de fusión de la cafeína que reporta la literatura igual 235 °C.
- ✚ La prueba cromatográfica realizada con la muestra siguiendo el Protocolo de Stahl Egon al correr la muestra con la mezcla Acetato de Etilo: MeOH: Ácido Acético: (80:10:10 v/v) sobre placa cromatográficas de Sílicagel 60 F₂₅₄ dan un valor de $R_f \times 100 = 41$ semejante al que reporta la literatura⁽²⁰⁾
- ✚ La prueba de Peso Molecular por el Método de Restdió valor de 193 semejante al que reporta la literatura 194.8 para cafeína, con un error leve de 0.92%. La molécula es un heterociclo formado por átomos de Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno.
- ✚ La prueba de Espectroscopia UV-Visible se realizó con MeOH y con agua. El λ_{\max} cuando se usa como solvente metanol fue de 273 nm idéntico al valor que la literatura reporta para cafeína ⁽¹⁴⁾. El λ_{\max} cuando se usa agua como solvente fue de 278 nm también igual al que reporta la literatura para cafeína ⁽¹⁴⁾.
- ✚ La lectura del espectro de RMNH⁺ se realizó comparando los valores de desplazamiento en ppm que registra la “Tabla para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectrométricos” de Pretseh, Clere T, Seibl J and Simon y muestra que hay presencia de 10 protones en la molécula de cafeína.
- ✚ Para la lectura del Espectro de RMN de Carbono – 13, se utilizó la misma tabla para interpretar los desplazamientos de los átomos de Carbono no equivalentes desacoplados.
- ✚ La aplicación del método específico de una Inclusión para el aislamiento de cafeína propuesto por Ikan Rafael y el Clásico de Lieb Hans y Wolfgang resultó ser el más adecuado para este propósito.

CONCLUSIONES

- ✚ La hoja de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), contiene cafeína en un 0.95% y su presencia nos permite establecer una relación quimiotaxonómica cercana entre *Ilex nayana* e *Ilex paraguaiensis*.
- ✚ La hoja de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), puede ser usada por su presencia de cafeína como sustituto del Té y del café.
- ✚ *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), se convierte en adelante en una fuente alternativa nueva de cafeína.
- ✚ *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), puede constituirse también en un nuevo recurso agroforestal no depredativo y en una fuente de ingresos permanentes para poblaciones que viven en el bosque dedicados al sembrío, cosecha y procesamiento de las hojas de esta planta.

RECOMENDACIONES

- ✚ Se debe promover el cultivo de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi), como fuente de cafeína.
- ✚ Se debe mejorar el rendimiento de cafeína por métodos de cruzamiento genético.
- ✚ Se debe realizar otras investigaciones para identificar nuevos metabolitos secundarios que pueden ser usados en la farmacopea amazónica.

BIBLIOGRAFIA

(Hecho en función a normas de Vancouver)

1. Napralert. Base de Datos de Plantas del Mundo. 2013. Chicago - USA.
2. Trease–Evans. Farmacognosia. Décima tercera Edición. Mexico D.F. Ed. Interamericana Mc. Graw. Hill. 1991. Pag. 125, 592, 593, 681, 684.
3. Alikaridis, F. Natural constituents of Ilex species. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 20. 1987. Pag. 121,144.
4. Judd, Campbell. Kellogg, Stevens. Donoghue, A. Plant Systematics. Second Edition. Massachusetts. Ed. Sinauer S.A. 2002. 468-470.
5. Comunicación Personal del Sr. Jorge Dóñez Pezo, poblador del Caserío Nina Rumi.
6. Flores, J. Antonio J. Mediavilla, A. Farmacología Humana. Tercera Edición. Barcelona – España. Editorial. Masson S. A. 2000. Pag. 586.
7. Witters, W. Venturelli, P. Drugs and Society. Second Edition. New York – USA. Editorial Jones and Bartlett Publishers. 1987. Pag. 131-133.
8. Aldrich Catalog. Fine Chemical 2001. Wisconsin - USA.
9. PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ed. 16. Perú. 2004. Pag. 236-347-586-610.
10. Jenkins, J.L. Hartung, W. Química Medica Farmacéutica. Tercera Edición. Barcelona – España. Editorial. Manuel Marín. 1950. Pag. 537.
11. Kato, Koinichi. Nizuno, Tatsnhito, Fujimori, Masnor. Iwana, Ashihara. American Chemical Society of Plant Physiologists. Vol. 114. Rockville - USA. 1999. Pag 463.

12. Society for Science and Nature. International Journal of Science of Nature. India. 2010. Vol I. Pag 47–52.
13. Jiménez, A. Química de los Productos Naturales. Primera Edición. Madrid - España. Editorial Síntesis. 2006. Pag. 237-239
14. Harborne, J.B. Phytochemical Methods. First Edition. London – UK. Editorial Chapman Hall. 1973. Pag. 202-204.
15. Goodwin, J and Mercer, H. Introduction to Plant Biochemistry. Second Edition. New York – USA. Editorial Pergamon Press. 2006. Pag. 363.
16. Misako, KatoKoimichi, Mizuno, Tatushito. Fujimori, Masnorí. Iwana, MasachikaIria. Crozier, Alan and Hiroshi Ashihara. Plant Physiology. American Chemical Society of Plant Physiologist. Vol. 120, Pag. 579-586. 2002. Rockville - USA.
17. Shriner, J. Fusson, C. Curtin, K. Identificación Sistemática de los Compuestos Orgánicos. Primera Edición. New York – USA. Editorial John Willey. 1965. Pag. 234-347
18. Conant J.B. y Blatt A.H. Química de los Compuestos Orgánicos. Quinta Edición. Madrid - España. Editorial Aguilar S.A. 1963. Pag. 592
19. Handbook of Chemistry and Physics. Editorial CRC – PRESS. Wisconsin - USA. Pag. 36.
20. Stahl Egon. Thin Layer Chromatography. Second Edition. Berlin - Germany. Ed Heidelberg. 1998. Pag. 81, 82, 151, 547, 548, 550.
21. Rao, N. Espectroscopia UV-Visible. Primera Edición. Madrid – España. Ed. Alhambra. 1988. Pag. 120-121.

ANEXOS

FOTO N° 01. *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 02. Muestra fresca de *Ilexnayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 03. Cartuchos con Polvo de las hojas secas de *Ilexnayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 04. Sistema Soxhlet. Desengrasado de la muestra de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 05. Muestra desengrasada de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 06. Extracción Alcohólica del Desengrasado



FOTO N° 07. Evaporación de la muestra



FOTO N° 08. Muestra desengrasada con Oxido de Magnesio



FOTO N° 09. Muestra seca con Oxido de Magnesio (Método de Inclusión)



FOTO N° 10. Reacción Exotérmica con Ácido Sulfúrico (Liberación de la Cafeína)



FOTO N° 11. Separación del Precipitado (Cafeína Libre + Sulfato de magnesio)



FOTO N° 12. Cafeína Libre + Sulfato de Magnesio



FOTO N° 13. Filtración quedando Cafeína Libre ($MgSO_4$ en el papel filtro)



FOTO N° 14. Evaporación a Temperatura Ambiente



FOTO N° 15. Cafeína Pura de hoja de *Ilex nayana* (Guayusa Caspi)



FOTO N° 16. Aparato Nalge Axelrod modificado (Derecha). Observación para análisis de Punto de Fusión (Izquierda).



FOTO N° 17. Muestra de Cafeína y Capilar para la Prueba de Punto de Fusión



FOTO N° 18. Tres Canales dentro el Aparato de Axelrod modificado para colocar el capilar más la muestra a analizar.



IMAGEN N° 01: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones

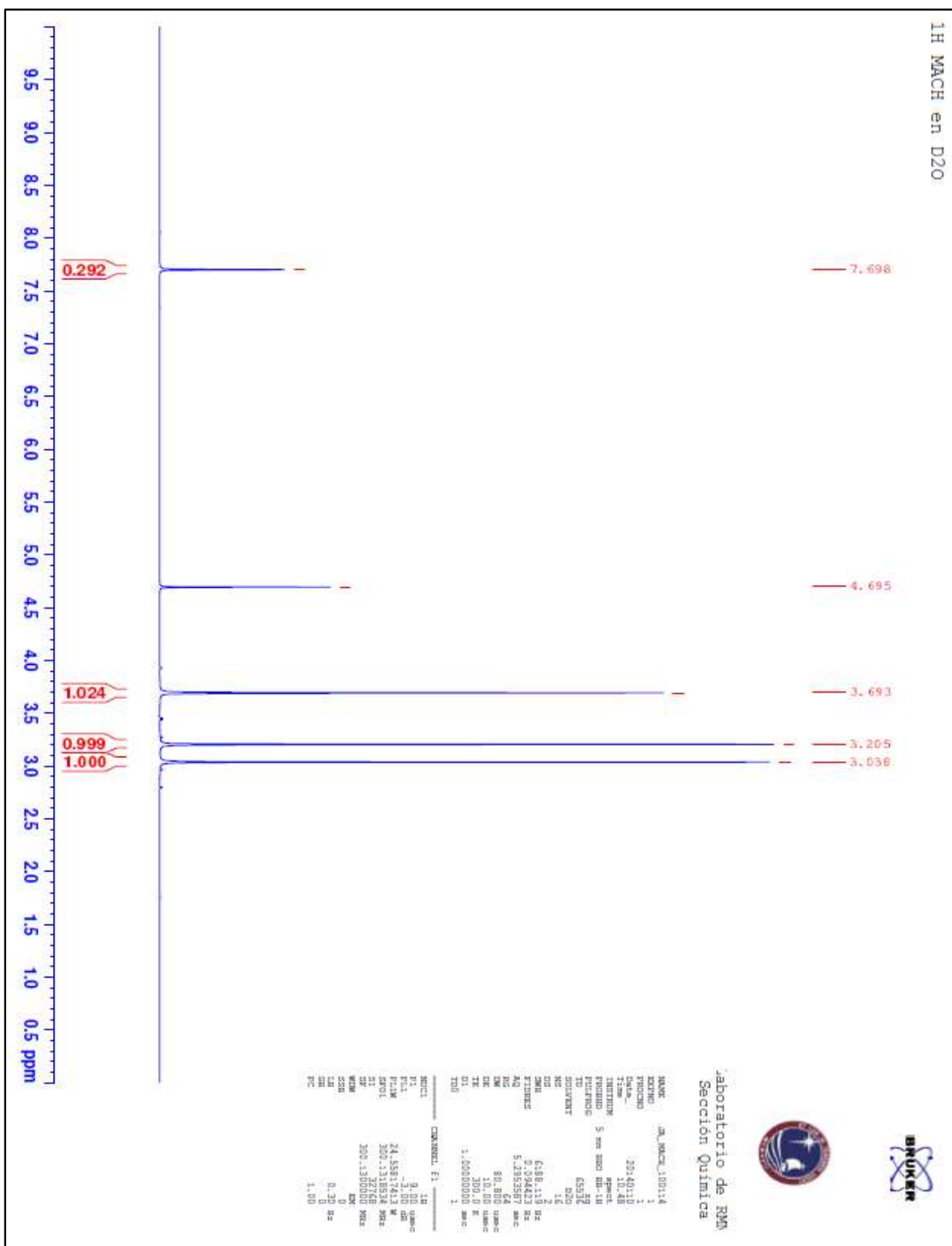


IMAGEN N° 02: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13

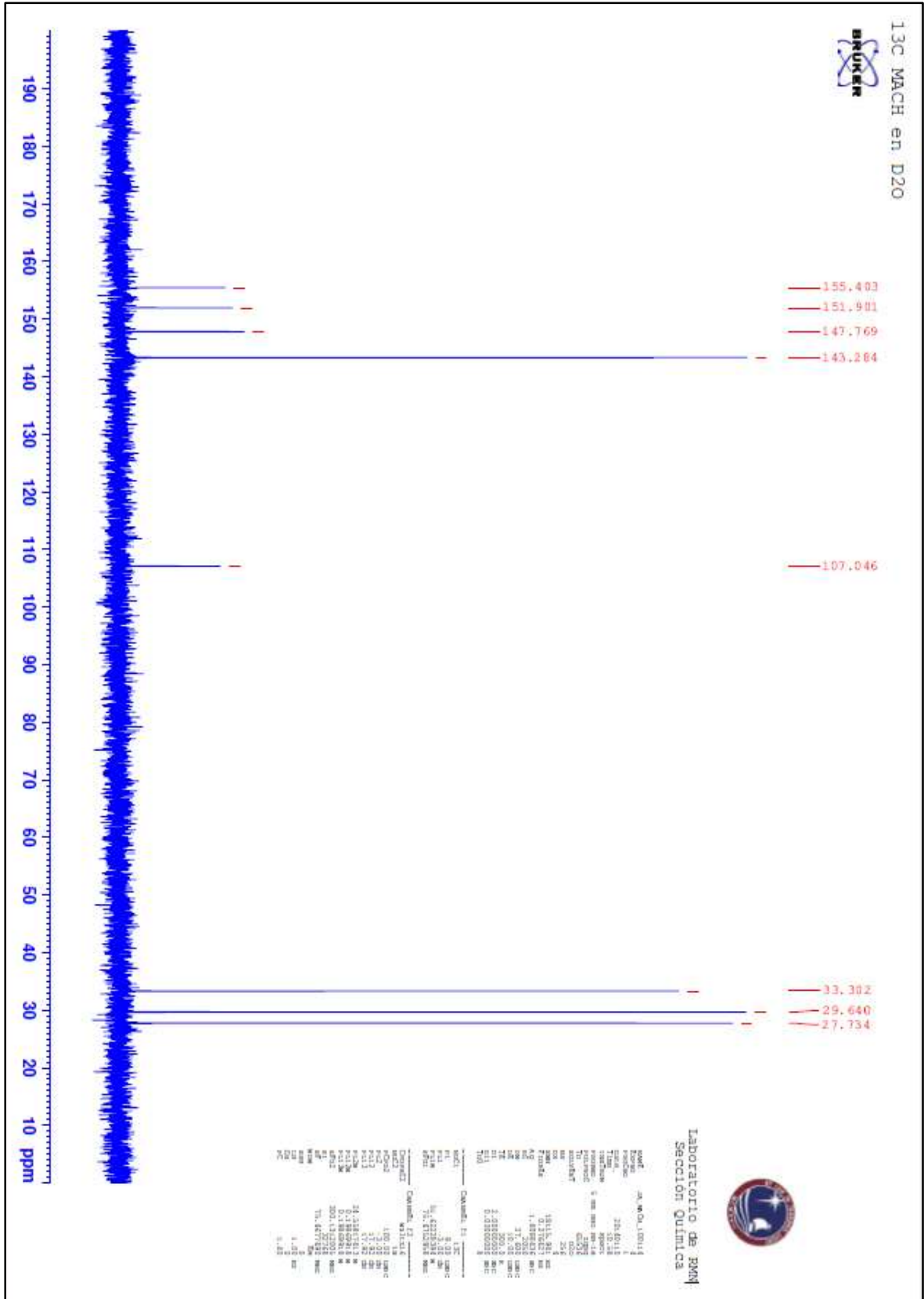


IMAGEN N° 03: Espectro UV - Visible en Metanol y en Agua

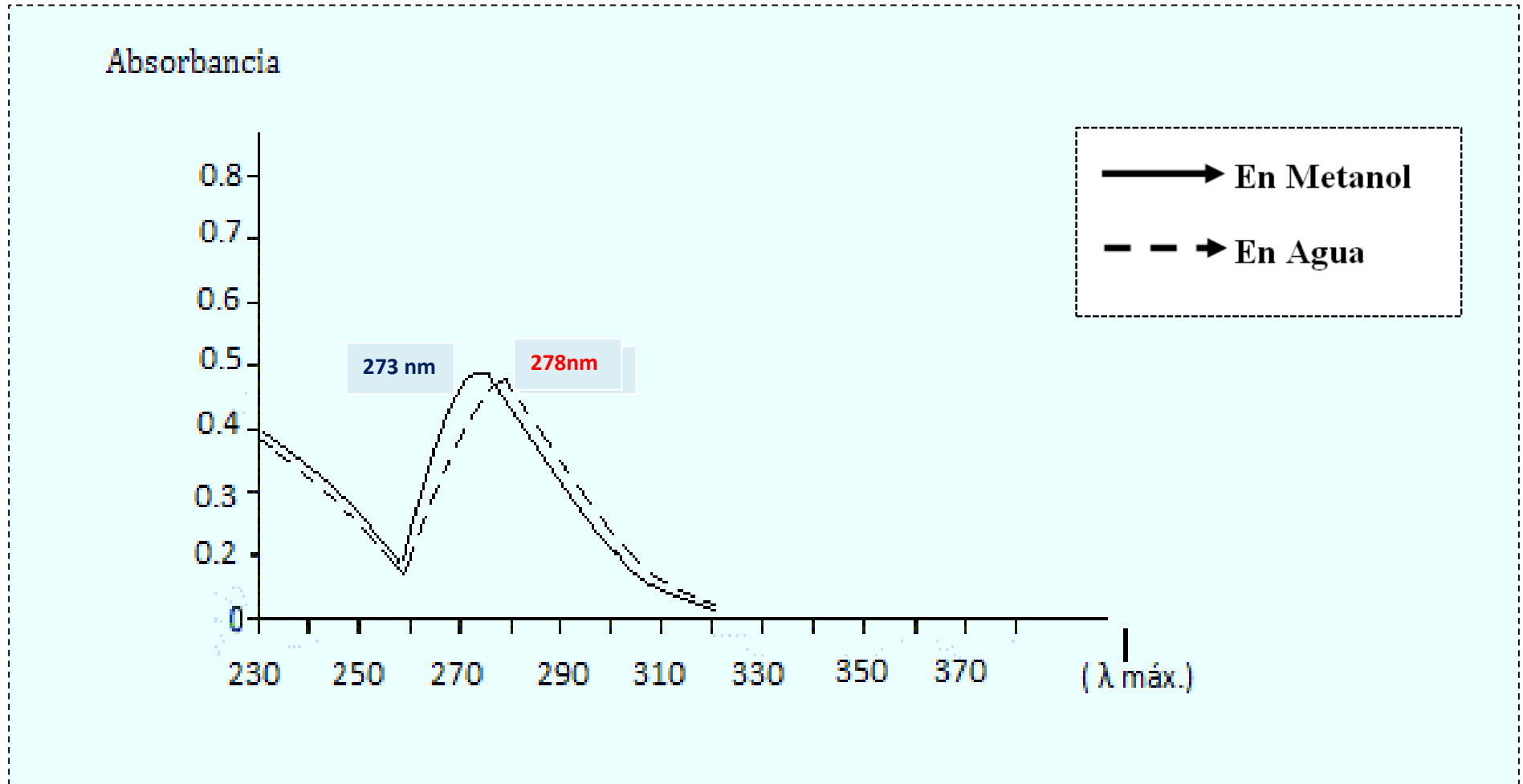


IMAGEN N° 04: Constancia de Muestra Botánica



Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 22

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACER CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por los Bachilleres; **ALAIN DA SILVA RODRÍGUEZ** y **CHRISTIAN PANDURO SÁNCHEZ**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, son parte del Proyecto de Tesis Titulado: "AISLAMIENTO DE CAFEÍNA DE LAS HOJAS DE *Ilex nayana* (Guayusa caspi). DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS Y ESPECTROMÉTRICOS", La cual fue verificada e identificada en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

Familia	Nombre científico	Nombre vulgar
AQUIFOLIACEAE	<i>Ilex nayana</i> Cuatrec.	"guayusa caspi"

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 30 de Abril del 2014

Atentamente,

Bigo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTUMBA
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



ESQUEMA N°01. Diagrama de Bloque del Proceso Experimental

