



**UNAP**



**FACULTAD DE FARMACIA BIOQUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

**“IDENTIFICACIÓN DE LA CAFEÍNA AISLADA DE LAS HOJAS DE *Ilex  
inundata* POEPP. EX REISSEK POR SUS CARACTERÍSTICAS  
FISICOQUÍMICAS Y ESPECTROMETRÍA UV”**

**PRESENTADO POR:**

**PAULO SERGIO CÓRDOVA ALVIS**

**PATRICIA CÓRDOVA LÓPEZ**

**ASESOR:**

**Ing. CLETO JARA HERRERA, Mtro.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2022**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°070-PCGT-FFyB-UNAP-2022/CONSTANCIA N°800-INV-UNAP-2022

En el caserío de Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista, departamento de Loreto, a los 28 días del mes de octubre de 2022, a horas 11:00 se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "IDENTIFICACIÓN DE LA CAFEÍNA AISLADA DE LAS HOJAS DE *Ilex inundata* Poepp. Ex Reissek POR SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ESPECTROMETRÍA UV", aprobada con Resolución Decanal N°236-2022-FFyB-UNAP presentada por los bachilleres: Paulo Sergio Córdova Alvis y Patricia Córdova López, para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°195-2022-FFyB-UNAP, está integrada por:

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.      | Presidente |
| Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra. | Miembro    |
| Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUIZ, Mtra. | Miembro    |

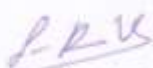
Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: Satisfactoriamente


El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública de la tesis ha sido Aprobada con la calificación Muy buena

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Siendo las 11:40 se dio por terminado el acto Académica

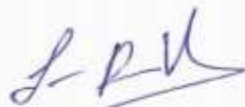
  
Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.  
Presidente

  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  
Miembro

  
Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUIZ, Mtra.  
Miembro

  
Ing. CLETO JARA HERRERA, Mtro.  
Asesor

## JURADOS Y ASESORES



---

Q.F. Lilia Ruiz Vásquez, Dra.  
Presidente de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 12491



---

Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay, Dra.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 3468



---

Q.F. Brenda Soraya Urday Ruiz, Mtro.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 09575



---

ING. CLETO JARA HERRERA Mtro.  
Asesor  
CIP:63042

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios, quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia, por moldearme en la integridad, y producto de ello soy noble y digna.

Para mi madre **María Socorro**, hermanos y tíos(as) por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos

***Patricia***

A Dios, por bendecirme y acompañarme en toda circunstancia de la vida. Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena mi vida y la de toda mi familia por estar siempre presentes.

A mi querida familia, mi padre **Ramón Ernesto**, mi madre **Rosa Grimaneza**, mis abuelos **Belmira** y **Néstor**, y mis hermanos **Ramón Franco** y **Camilo Sexto**, por ser los motores más preciados de mi vida, a ellos todo mi amor, cariño y respeto, por brindarme consejos de superación; sin dejar de lado el apoyo espiritual y económico para lograr concretar este objetivo y de paso por ser partícipes de como poco a poco fui logrando mis metas.

***Paulo Sergio***

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) por confiar en nuestra capacidad de trabajo y emprendimiento para la ejecución de la presente tesis.

A nuestro asesor por darnos a conocer los conocimientos y su guía necesaria para culminar con éxito el presente trabajo, así mismo al Ing. Julio Arce por ayudarnos cada vez que ha sido necesario en la elaboración, ejecución y redacción de la presente tesis.

A nuestras familias por estar presente apoyándonos en todo, a todos ellos muchas gracias de todo corazón.

A los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP por brindarnos los conocimientos básicos que como profesionales pondremos en práctica para el desarrollo de nuestra amazonia.

Nos faltan páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo; sin embargo, merecen un reconocimiento especial nuestros padres; quienes con su esfuerzo y dedicación nos ayudaron a culminar la carrera universitaria y nos dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| <b>PORTADA</b>  | i    |
| <b>ACTA DE SUSTENTACIÓN</b>                           | ii   |
| <b>JURADOS Y ASESORES</b>                             | iii  |
| <b>DEDICATORIA</b>                                    | iv   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>                                | v    |
| <b>ÍNDICE</b>   | vi   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>                               | viii |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>                              | ix   |
| <b>RESUMEN</b>  | x    |
| <b>ABSTRACT</b>                                       | xi   |
| <b>INTRODUCCION</b>                                   | 1    |
| <b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>                      | 3    |
| 1.1. Antecedentes                                     | 3    |
| 1.1. Bases teóricas                                   | 4    |
| 1.1.1. Especie vegetal de estudio                     | 4    |
| 1.1.2. Cafeína  | 6    |
| 1.1.3. Biogénesis de la cafeína                       | 6    |
| 1.1.4. Localización de la cafeína                     | 7    |
| 1.1.5. Propiedades de la cafeína                      | 7    |
| 1.1.6. Metabolismo de la cafeína                      | 8    |
| 1.1.7. Usos de la cafeína                             | 8    |
| 1.1.8. Métodos de aislamiento de la cafeína           | 9    |
| 1.1.9. Caracterización fisicoquímica                  | 11   |
| 1.1.10. Caracterización por espectrometría UV/visible | 14   |
| 1.2. Definición de términos básicos                   | 16   |
| <b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>             | 18   |
| 2.1. Formulación de la hipótesis.                     | 18   |
| 2.2. Variable de estudio y su operacionalización      | 18   |
| 2.2.1. Variable de estudio                            | 18   |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2. Operacionalización de variables                  | 19 |
| <b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>                        | 20 |
| 3.1. Diseño metodológico                                | 20 |
| 3.2. Diseño muestral                                    | 20 |
| 3.3. Procedimiento de recolección de datos              | 20 |
| 3.3.1. Aislamiento y purificación del alcaloide         | 22 |
| 3.3.2. Determinación de los parámetros fisicoquímicos   | 24 |
| 3.3.3. Análisis por espectrometría ultravioleta visible | 28 |
| 3.4. Procesamiento y análisis de datos                  | 28 |
| 3.5. Aspectos éticos                                    | 28 |
| <b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>                          | 29 |
| 4.1. Rendimiento de la cafeína                          | 29 |
| 4.2. Valores de los parámetros fisicoquímicos           | 29 |
| 4.3. Mediciones de longitud de onda                     | 29 |
| <b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b>                            | 30 |
| <b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.</b>                       | 34 |
| <b>CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES</b>                    | 35 |
| <b>CAPÍTULO VIII: REFERENCIA BIBLIOGRAFICA</b>          | 36 |
| <b>ANEXOS</b>   | 39 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Valores de absorbancia(Y) y de concentración de cafeína en ppm | 15 |
| <b>Tabla 2.</b> Valores de hRf con tres tipos de solventes de corrida          | 29 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Rutas metabólicas de biosíntesis de la cafeína (19).   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Diagrama de bloque para las etapas de obtención de cafeína a partir de las hojas de <i>I. inundata</i> | 21 |
| <b>Figura 3.</b> Formación del complejo murexida (26).  | 26 |

## RESUMEN

Los alcaloides han constituido motivo de estudio por sus grandes propiedades bioactivos en bien de la salud humana, dentro de este grupo de compuestos se encuentra la cafeína, un pseudoalcaloide derivado de bases purinicas, considerado como estimulante energético, analgésico, vasoconstrictor y que alivia el dolor de cabeza. El objetivo del estudio fue caracterizar el alcaloide aislado de la especie vegetal *Ilex inundata*, de la familia Aquifoliaceae. Las muestras fueron colectadas a orillas del Río Nanay, localizada en la ciudad universitaria de Zungarococha, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, región Loreto. Para extraer el alcaloide se usó etanol, óxido de magnesio como reactivo de inclusión, ácido sulfúrico al 10% para separar y cloroformo para purificar. El producto purificado se identificó y caracterizó mediante la determinación de sus parámetros fisicoquímicos y por espectrometría UV-visible. Los resultados fueron: rendimiento 1,431%, punto de fusión 238°C, punto de sublimación 178°C, valores de Rf corrido en solución de [cloroformo: etanol] fue de 57, en solución [acetona: cloroformo: n-butanol e hidróxido de amonio al 25%] fue 78 y en solución de acetato de etilo: metanol y ácido acético fue 41, el peso molecular fue 194,227 g/mol y la longitud de onda máxima en metanol dio 273 nm. Se concluye que las hojas de *Ilex inundata* contiene cafeína, y que la especie podría ser una fuente prometedora para obtener este alcaloide para uso en la industria farmacéutica.

**Palabras claves.** Caracterización fisicoquímica, espectrometría ultra violeta visible, *Ilex inundata*, cafeína, pseudoalcaloide

## ABSTRACT

Alkaloids have been the subject of study due to their great bioactive properties for the benefit of human health. Within this group of compounds is caffeine, a pseudoalkaloid derived from purine bases, considered an energy stimulant, analgesic, vasoconstrictor and pain reliever head. The objective of the study was to characterize the alkaloid isolated from the plant species *Ilex inundata*, of the Aquifoliaceae family. The samples were collected on the banks of the Nanay River, located in the university city of Zungarococha, San Juan Bautista district, Maynas province, Loreto region. Ethanol, magnesium oxide as inclusion reagent, 10% sulfuric acid to separate and chloroform to purify were used to extract the alkaloid. The purified product was identified and characterized by determining its physicochemical parameters and by UV-visible spectrometry. The results were: yield 1.431%, melting point 238°C, sublimation point 178°C, Rf values run in [chloroform: ethanol] solution was 57, in [acetone: chloroform: n-butanol and 25% ammonium hydroxide solution %] was 78 and in ethyl acetate: methanol and acetic acid solution it was 41, the molecular weight was 194.227 g/mol and the maximum wavelength in methanol was 273 nm. It is concluded that the leaves of *Ilex inundata* contain caffeine, and that the species could be a promising source to obtain this alkaloid for use in the pharmaceutical industry.

**Keywords.** Physicochemical characterization, visible ultraviolet spectrometry, *Ilex inundata*, caffeine, pseudoalkaloid.

## INTRODUCCION

Los alcaloides purínicos son obtenidos de *Coffea arábica* (café), *Camellia sinensis* (Té) y en *Theobroma cacao* (cacao) pertenecientes a las familias Rubiaceae, Theaceae y Malvaceae (1–6). Es también importante señalar que cafeína existe en especies de la familia Sapindaceae como *Paulina cupana* y *Paulina yocco*, siendo la primera de uso difundido a nivel mundial (7).

Las especies del género *Ilex* de la familia Aquifoliaceae son parafiléticos porque proceden de un antepasado común cuyo carácter es compartido por 2 taxones emparentados, ya que provienen de un antepasado común, que marcó sus historias biológicas (6), por lo que, están presentes en ellos alcaloides de naturaleza purínica, en mayor medida cafeína, caso de *Ilex paraguariensis* (mate), *Ilex vomitoria* (yampón), *Ilex guayusa* Loes (guayusa) (4,5,8).

De especies del género *Ilex*, tales como *Ilex paraguariensis* (mate de Paraguay), *Ilex vomitoria* (yampón) y *Ilex guayusa* Loes (guayusa) se ha aislado cafeína. Ayala en el 2003 dio a conocer una nueva especie de *Ilex* denominado *Ilex inundata* que crece a orillas del río Nanay de forma profusa, y que carece de estudios respecto al contenido de cafeína en sus hojas u otros órganos (9).

La cafeína, como alcaloide es de gran importancia por su amplio uso en la industria de los alimentos y en la industria farmacéutica por sus efectos psicoestimulantes al sistema nervioso central, efectos: analgésico, broncodilatador, hipertensivo, cronotrópico e inotrópico positivo, vasodilatador a nivel muscular y además posee acción diurética (2,8,10).

La especie *I. inundata* Poepp de la familia Aquifoliaceae pariente en género del mate de Paraguay y con la guayusa guarda un parentesco directo, estas especies biogenéticamente elaboran alcaloides de naturaleza purínica; por lo tanto *I. inundata* podría constituirse en una fuente complementaria de cafeína. Alcaloide que tiene el privilegio de que, la demanda es mayor que la oferta; como insumo para bebidas alimentarias, industria perfumista, cosmética y licorera.

La industria farmacéutica para cubrir su déficit de cafeína viene obteniendo por síntesis, utilizando ácido úrico como precursor molecular que por acción del pentacloruro de fósforo se convierte en 2,6,8 tricloropurina. Luego por reacción con el ácido yodhídrico y el ion Zn como catalizador se transforma en purina y de allí en cafeína. Una purina sustituida por 3 grupos metilos en posiciones 1,3 y 7, la formación de dos grupos ceto por oxigenación en posiciones 2 y 6. Se ha comprobado que el consumo de estos productos causa efectos secundarios por los reactivos fosfóricos razón por la que se requiere abandonar los productos de síntesis (11).

Por estos contaminantes indeseados en la cafeína de origen sintético, es importante buscar nuevos recursos vegetales que contengan cafeína para su utilización casi exclusiva en la industria farmacéutica, con este propósito el objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar el alcaloide aislado y purificado de *I. inundata* (guayusa del bajeal) por sus propiedades fisicoquímicas y espectrometrías UV-visible para comprobar si es cafeína. De esta especie que crece con profusión a orillas del río Nanay.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En el año 2020 se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos y acuosos de *I. guayusa* e *I. paraguariensis* frente a *Helicobacter pylori*. Las muestras fueron colectadas en la Finca San Pablo, en la Vereda Brasil (Viotá, Cundinamarca). Por cromatográfico en capa delgada determinó la presencia de cafeína, ácido cafeico y saponinas en ambas especies. La actividad antibacteriana de ambos extractos dio positivo contra *H. pylori*, pero el extracto hidroalcohólico tuvo mayor actividad antimicrobiana. El autor concluye que la especie *I. paraguariensis* contiene mayor abundancia de estos componentes (12).

En el año 2019, optimizaron un proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en *Ilex guayusa* Loes (guayusa) a los que se determinó la actividad antioxidante y contenido de cafeína. De las hojas extrajeron el contenido de fenoles totales usando el método de Folin Ciocalteu; asimismo, valoraron la actividad antioxidante usando dos métodos analíticos el ABTS y FRAP y por último midieron el contenido de cafeína por espectrofotometría a 275 nm. El contenido de fenoles totales fue de 3,46 gramos por 100 gramos de muestra, el extracto de las hojas de *I. guayusa* presentó una considerable capacidad antioxidante, finalmente, la cantidad de cafeína fue de 2,35 miligramos por gramo de muestra. Los autores concluyen que *I. guayusa* tiene un potencial como ingrediente funcional en la industria cosmética y de los alimentos que merece ser estudiada (5).

En el año 2017, en un estudio comparativo sobre los aspectos nutricionales y fisicoquímicos entre *Ilex laurina* Kunth (*Aquifoliaceae*) e *Ilex paraguariensis*. Las hojas de *I. laurina* Kunth fueron colectadas en el corregimiento de Santa Elena (Antioquia) Colombia e hicieron un extracto acuoso, que luego fue liofilizado y con ayuda de un cromatógrafo HPLC determinaron los componentes del extracto y para el análisis de minerales usaron un espectrofotómetro de absorción atómica. Los resultados cromatográficos muestran la presencia de cafeína, teobromina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico, también

encontraron azúcares tales como glucosa, fructosa y los análisis de absorción atómica permitieron identificar elementos metálicos como Mg, Mn, Fe, Cu y Zn. El autor concluyó que los resultados que se obtuvieron en *I. laurina* Kunth son mayores a las concentraciones de los componentes presentes en *I. paraguariensis* (13).

Ese mismo año (2017), determinaron la concentración de cafeína en hojas, frutos y tallos de *I. guayusa*, recolectada de tres zonas de la región Cajamarca, localidades de Nueva Esperanza, Marizagua y Chililique. La determinación de cafeína se hizo según el procedimiento descrito por Bailey y Andrews. Obtuvieron el mayor rendimiento de cafeína en las muestras de la zona de Marizagua: en hojas 2,834%, en frutos 0,327% y en tallos 0,462% y el rendimiento de cafeína de *I. guayusa* recolectada en las otras dos zonas fue menor tanto en hojas, frutos y tallos; sin embargo, las hojas contienen más abundancia de cafeína. El autor concluyó que el mejor aprovechamiento de cafeína se obtiene de las hojas y que el consumo es por poseer muchas propiedades beneficiosas para la salud (14).

En el año 2005, se publicó un artículo que señala el contenido de cafeína en frutos de *Paulinia cupana* (guaraná) que la semilla contiene elevadas concentraciones de cafeína entre 6 a 8%; además reportaron la presencia de taninos y en menores cantidades teofilina y teobromina. Concluyeron que los efectos afrodisíacos y estimulantes del sistema nervioso y cardiovascular pueden atribuirse a su contenido de cafeína, taninos y teofilina; tal vez después del café ésta es la planta más importante por su contenido de cafeína, teofilina y teobromina (15).

## **1.1. Bases teóricas**

### **1.1.1. Especie vegetal de estudio**

#### **A. Identificación taxonómica**

Según el esquema de clasificación de la División Magnoliophyta establecida por Arthur Cronquist en su libro “The evolution and classification of flowering plants”, esta planta responde a la clasificación siguiente: (16).

|               |                        |
|---------------|------------------------|
| Reino         | : Plantae              |
| Sub reino     | : Traqueophyta         |
| División      | : Magnoliophyta        |
| Clase         | : Magnoliopsida        |
| Orden         | : Aquifoliales         |
| Familia       | : Aquifoliaceae        |
| Género        | : <i>Ilex</i>          |
| Especie       | : <i>Ilex inundata</i> |
| Nombre vulgar | : Guayusa de bajaal.   |

### **A.1. Descripción botánica**

*I. inundata* es un árbol de 10 m de altura de corteza suave y lisa, hojas alternas y enteras muy frondoso, flor unisexual, 6 sépalos connatos, 6 estambres, granos de polen porate (con abertura redonda en forma de poro), estilo muy corto, óvulos usualmente uno en cada lóculo, frutos de color anaranjado-rojizo (9).

Tallo con cáscaras suberosas; ramos erectos, hojas de consistencia coreácea, laxas, con inflorescencias tipo racimosas. Flores con número de pétalos tetrámeras/pentámeras; frutos dehiscentes, número de semillas 4-5 (17).

### **A.2. Distribución y ecología**

Está distribuido en partes de América continental Brasil, Colombia, Ecuador y Perú de preferencia en suelos ácidos y muy cerca de los ríos y otras fuentes de agua.

### **A.3. Uso e información etnobotánica**

Es poco conocido, no hay referencia bibliográfica acerca de los usos de *I. inundata*.



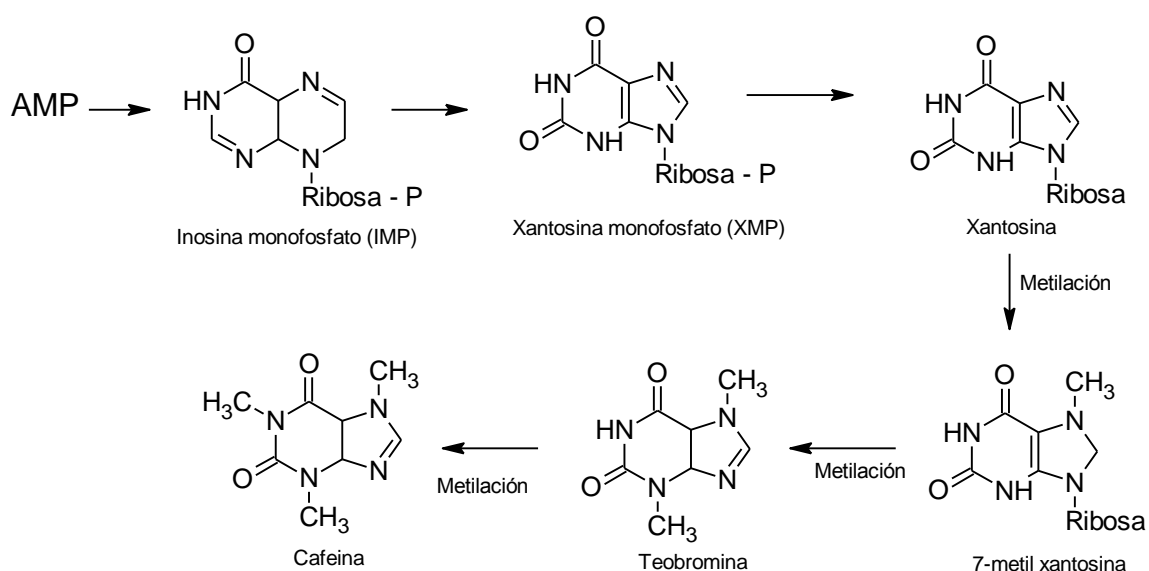
### 1.1.2. Cafeína

Según la clasificación química de los alcaloides establecido por Bruneton, la cafeína es un pseudo alcaloide del grupo de las xantinas, que por primera vez se halló en *Coffea arabica* (café) de la familia Rubiaceae, también está presente en *Camellia sinensis* (Té) de la familia Theaceae, *Paulina cupana* y *P. yocco* (Guaraná y yocco respectivamente) de la Familia Sapindaceae *Cola acuminata* familia Malvácea y especies de Ilex: *I. paraguayensis* (Mate de Paraguay) *I. guayusa*, *I. vomitoria*, *I. laurina* familia Aquifoliaceae, químicamente se le conoce como metilteobromina, 1,3,7 trimetilxantina (11,18).

Como compuesto purínico consiste en un sistema cíclico formado por 2 anillos, uno pirimidínico y el otro imidazólico condensados (10). La xantina se refiere a la 2,6(1,3)-purinadiona o 2,6 dioxopurina, se hace este señalamiento para significar que la xantina es un derivado purínico (18).

### 1.1.3. Biogénesis de la cafeína

La formación de la cafeína como metabolito secundario sigue la ruta expuesta por Misako Kato *et al.*, (19). Se da a partir de Adenosín monofosfato (AMP) que se transforma en inosina monofosfato (IMP) el esquema es el siguiente:



**Figura 1.** Rutas metabólicas de biosíntesis de la cafeína (19).

Se dan rutas secundarias en que la 7-metilxantina puede producir la paraxantina y a partir de está la cafeína o vía la teofilina pasar a cafeína. Esta ruta biosintética ha sido demostrada a partir de la purificación de la cafeína y el análisis de la enzima cafeína syntasa en las hojas de *Camellia sinensis* (Té).

#### 1.1.4. Localización de la cafeína

En *Coffea arabica* (cafeto), la cafeína se halla en las semillas en menor medida en las hojas, en las hojas de *Camellia sinensis* (Té), en la corteza de *Paullina cupana* (guaraná), en las hojas de *Ilex paraguarensis* y otras especies de *Ilex*. La cantidad de cafeína presente en el Té varía entre 2 y 5% y los granos de café pueden tener como máximo 5% de cafeína (19).

#### 1.1.5. Propiedades de la cafeína

##### A. Fisicoquímicas

La cafeína es un sólido blanco cristalino en forma de prismas hexagonales, sabor amargo. Punto de fusión 238°C, punto de sublimación 178°C, peso molecular 149.1gr/mol. La solubilidad en agua se incrementa cuando se halla en forma de benzoatos, cinamatos, citratos o salicilatos alcalinos, a temperatura ambiente la solubilidad es  $\frac{1 \text{ g cafeína}}{46 \text{ ml agua}}$  y la temperatura de 80°C es  $\frac{1 \text{ g cafeína}}{5,5 \text{ ml agua}}$ , un gramo se disuelve con 66 ml de alcohol, pero también tiene afinidad por el cloroformo, diclorometano de los que se les separa cuando se halla en medio ácido acuoso (18).

##### B. Propiedades fisiológicas

Las xantinas son estimulantes psicoactivas leves. La cafeína junto con la teofilina presente en el té tiene mayor efecto sobre el ritmo cardiaco, dilatación cardiaca, relajación del musculo liso fundamentalmente bronquial, incrementa la diuresis y la secreción gástrica y tiene efecto sobre el sistema nervioso central (20). Según estudios realizados por European Food Safety Authority (EFSA) la dosis máxima de consumo de cafeína es 200 mg que corresponda a un promedio de 3 mg por

kilo de masa corporal a esta dosis no presenta problemas de seguridad para la población adulta sana.

La LD<sub>50</sub> de la cafeína se estima que es de 10 gr, sin embargo, esta dosis letal varía mucho de un individuo a otro, en general se considera que ingerir 150 mg de cafeína por cada kilo de peso corporal puede ser mortal (11,25gr para un individuo de 75 kg de peso). Según la Asociación Nacional de Café de España, una taza de café express de 240 ml tiene entre 65 y 120 mg de cafeína, si una persona de 75 kg consumiera 173 tazas de café podría morir (20).

#### **1.1.6. Metabolismo de la cafeína**

El cuerpo humano absorbe la cafeína rápida y completamente a partir del tracto gastrointestinal aumentando su concentración en el plasma sanguíneo a un tiempo máximo de 30 a 40 minutos. Una vez llegado al torrente circulatorio, la cafeína se introduce en todos los tejidos corporales. Los efectos estimulantes comienzan a los 15 o 30 minutos después de la ingestión y duran unas horas.

En adultos la vida media de la cafeína, es decir el tiempo que el cuerpo tarda en eliminar el 50% de la cafeína varía consideradamente en función de factores como la edad, el peso corporal, el embarazo, la ingesta de medicamentos y el estado de salud del hígado, en adultos sanos la vida media es aproximadamente 4 horas, con una variación entre 2 a 8 horas (20).

#### **1.1.7. Usos de la cafeína**

La cafeína se usa en la elaboración de múltiples alimentos y bebidas añadiendo como ingrediente adecuadamente, su uso en medicina es importante como estimulante del sistema nervioso central, aumenta la actividad central, es estimulante cardiaco y respiratorio y para evitar el sueño en trabajos nocturnos, se agrega a los analgésicos para potenciar su efecto, en cefalea y migraña (18).

Sus acciones reforzadoras y psicoestimulantes al parecer se deben a la liberación central sobre todo a nivel del sistema límbico medio donde se hallan las catecolaminas, sustancia que actuando como neurohormona envía señal a otras células para responder al estrés (21), por eso es un ingrediente en especial farmacéuticas como: Actron compuesto, Analgiasa, Aspirina plus, Biodramina cafeína, Cafergor, Cafiaspirina, Cafeína benzoato sódico, cafeína citrato, cafeína nitrato, entre otras presentaciones para la migraña (22).

#### **1.1.8. Métodos de aislamiento de la cafeína**

Stahl Egon señala que se puede aislar cafeína y derivados de la xantina, Teobromina, Teofilina sobre capas de silica gel básico o silica gel neutra con solventes básicos, pero también sobre capas de silica gel neutra con solventes ácidos (23). Cafeína ha sido aislado usando como soporte capas de silica gel bufferado a pH 6,8 para lo cual se mezcla 25 gr de silica gel con 50 ml de cantidades iguales de fosfato de potasio primario 0,2 M y 0,2 M de solución de fosfato de potasio secundario corrido en mezcla de solventes cloroformo: etanol 96% (90/10).

Se puede utilizar el mismo spot separado en un primer caso con solventes como acetona: cloroformo: n-butanol: hidróxido de amonio al 25% (30+30+40+10). En el segundo caso se usa como solvente: acetato de etilo: metanol: ácido acético (80:10:10). Cada spot se separa y se extrae con etanol, se cristaliza hasta obtenerlo en estado de pureza (23).

Otro método utilizado por García *et al.*, es pesar la muestra reducido a polvo por ejemplo 300 mg y poner en ebullición en un sistema de reflujo con 200ml de agua durante 15 minutos. Filtrar en caliente y añadir 2 g de carbonato de sodio hasta la total dilución, luego se enfría y se trasfiere la solución a una pera de decantación y se agrega 15 ml de diclorometano agitar suavemente durante unos minutos. Esta operación se repite por 2 veces, hasta separación de las 2 fases. La fase de diclorometano, secada con sulfato de sodio anhidro (para quitar la humedad) es filtrada y evaporada a sequedad en un rotavapor. El extracto seco se coloca en un

balón libre de diclorometano con 50mL de agua destilada y se agita hasta disolución del residuo, posteriormente se filtra y se cristaliza (20).

Ordoñez extrajo la cafeína del grano de café verde usando como solvente acetato de etilo en un equipo de soxhlet, la extracción se realiza a 90°C puesto que el acetato de etilo tiene un punto de ebullición de 77,1°C, el solvente asciende al vaso extractor, cuando se llena extrae la cafeína y se descarga el solvente con el extracto de cafeína por sifoneo y la operación sigue. Esta extracción de cafeína se realizó operando el equipo 17 horas. Luego se quita el solvente que arrastró al analito (cafeína), se concentra y se obtiene cafeína libre (24).

El método de fluidos supercríticos utilizado por el mismo autor consistió en tomar como solvente CO<sub>2</sub> líquido que actúa por encima de sus valores críticos de temperatura, presión, condición bajo las cuales no se condensa el dióxido de carbono porque la temperatura disminuye isobáricamente (presiones iguales) o aumenta la presión isotérmicamente (temperaturas iguales), en tal sentido no se evapora al aumentar la temperatura isobáricamente o al disminuir la presión isotérmicamente (temperaturas iguales). las propiedades del fluido supercrítico son intermedios entre las del fluido en fase líquida y en fase gaseosa, combinando un elevado poder de solvatación con una elevada difusividad, tiene además la ventaja que el CO<sub>2</sub> no es una sustancia tóxica y es además recuperable. En la extracción con fluidos supercríticos se combinan las variables: presión, temperatura, tiempo de extracción. Usar fluidos supercríticos para separar la cafeína del café es propiamente un método de descafeinización. El procedimiento es de gaseoso a líquido, una vez cargado el recipiente extractor éste es saturado con CO<sub>2</sub> líquido, luego de ser llevado a la presión y temperatura de extracción variables que se mantienen durante el tiempo de extracción definido, luego se despresuriza el recipiente extractor permitiendo el flujo del extracto hacia el recipiente de separación (24).

El método aplicado por Harborne usado para la extracción de cafeína de hojas de té, resulta adecuado para la extracción de cafeína de hojas de cualquier otra especie vegetal y cuyos pasos pueden ser extrapolados en su aplicación a nivel industrial. Utilizando 100gr de hojas de té finamente pulverizada extrajo con 400

ml de etanol en Soxhlet por 3h. El extracto etanólico de cafeína se vertió sobre una suspensión de 50g de MgO con 300mL de agua; en este sistema la cafeína es entonces adsorbida por el óxido de magnesio, luego es acidificada con 50 ml de ácido sulfúrico al 10% para des adsorber la cafeína que es extraída con cloroformo.

La cafeína se obtiene como agujas blandas y sedosas cuyo punto de fusión es de 235°C y puede ser recristalizado en pequeños volúmenes de agua caliente. Cuando se midió en espectrómetro UV-Visible la longitud de onda máxima de la cafeína disuelta en agua fue de 278 nm (1).

### **1.1.9. Caracterización fisicoquímica**

#### **A. Punto de fusión.**

El punto de fusión es el intervalo de temperatura en el cual un compuesto sólido pasa a líquido, es una propiedad característica de toda sustancia orgánica. El método tradicional para probar la identidad de 2 sustancias sólidas es mediante el punto de fusión si las mezcláramos siendo una conocida y otra desconocida si se vuelven líquidas a la misma temperatura, es que ambas son idénticas, porque una mezcla de compuestos diferentes presenta una depresión del punto de fusión; por lo cual resulta importante determinarlo para identificar una sustancia.

El punto de fusión se determina con el clásico aparato de Thiele, pero también moderadamente se usa el aparato de Fisher-Johns, el aparato de Nalge-Axelrod y actualmente equipo FISATOM 431D, con determinación digital de la temperatura de fusión con un sistema óptico con aumento (4x) que facilita la lectura con intensa iluminación LED, calentamiento rápido de 20 a 200 °C en 6 minutos y de 20 a 300°C en 21 minutos, sistema de enfriamiento rápido que desactiva el calentador y activa la ventilación después de 30 minutos de iniciar el calentamiento, tubos capilares de 1.5 mm de diámetro y 75 mm de largo, Aparato con el cual se realiza la medición correspondiente del punto de fusión de la sustancia aislada, purificada y que para ser identificado como cafeína su valor debe ser de 238°C (25,26).

## **B. Solubilidad**

Se busca determinar la solubilidad de la cafeína si se corresponde con los valores señalados en el Handbook of Chemistry and Physics y en The Merck Index las que señalan que cafeína es soluble en Piridina, cloroformo, etanol, tetrahidrofurano (18,26).

## **C. Reacciones coloridas**

Los compuestos que tienen un núcleo purínico como ácido úrico, guanina, la xantina y sus derivados 1,3-sustituidos (teofilina) 3,7 substituidos (teobromina) y 1,3,7 substituidos (cafeína) dan la reacción de la murexida. Reacción inequívoca para la determinación cromogénica de alcaloides de naturaleza purinica. Se trata de una reacción de desproporción que viene a ser una oxidación-reducción donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido cuando la suma de los potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0.

El procedimiento es el siguiente: se coloca en una capsula de porcelana 200 mg de un alcaloide purinico (cafeína, teobromina, teofilina) y 2 gotas de ácido nítrico concentrado, se evapora a sequedad usando baño María, al residuo se le aplica 2 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , se forma un color rojo púrpura intenso que indica la formación de la murexida reacción que es específica para Pseudoalcaloides (1,26).

## **D. Determinación del peso molecular**

Se aplica el método de Rast cuando no se dispone de un aparato de espectrometría de masas que determina la relación masa-carga y el pico padre que es el peso molecular propiamente dicho. En este método se mide el punto de depresión del D-camphor, cuando a esta molécula se la mezcla con otra sustancia de la que se quiere determinar su peso molecular.

Se procede tomando un tubo de 8 por 50mm limpio y seco, en él se coloca 50 mg del compuesto aislado de *I. inundata* y se pesa en balanza analítica, luego se añade medio gramo de D-camphor y el tubo se pesa nuevamente. El contenido del tubo se lleva a fusión con una llama muy pequeña del mechero de Bunsen

hasta que se forma un líquido transparente. Cuando se enfrió el contenido del tubo se lleva a una luna de reloj limpio, esta mezcla se pulveriza y determina su punto de fusión por el método de Thiele esta medición resulta exacta si se determina en un equipo FISATOM 431D se toma el punto de fusión cuando esta mezcla queda transparente, libre de trazas sólidas, se determina el punto de fusión del D-camphor original. La diferencia entre el punto de fusión del D-camphor y de la mezcla de este con el compuesto del que se quiere determinar su peso molecular da la depresión que en el punto de fusión del D-camphor y se conoce como  $\Delta T$ . El peso molecular del compuesto desconocido se calcula con la fórmula siguiente (25).

$$M = \frac{k \cdot \omega \cdot 1000}{\Delta T \cdot W} \quad \rightarrow \quad M = \frac{39,7 \cdot \omega \cdot 1000}{\Delta T \cdot W}$$

Donde

K = constante molecular del descenso del punto de fusión del D-camphor =39,7

$\omega$  = peso del compuesto que se quiera determinar su peso molecular

W= peso del D-camphor

M= peso molecular del compuesto.

### E. Determinación de los valores hRf

Un método analítico de identificación de la cafeína es mediante la determinación de sus valores hRf en TCL, para preparar la cromatoplaqa se usa como soporte silicagel G-bufferado a pH 6,8 que se obtiene agregando a 25 gr de esta sustancia 25 ml de fosfato de potasio primario 0,2 M y 25 ml de fosfato de potasio secundario 0,2 M. Se puede utilizar como solvente de resolución para correr los spots, 3 solventes.

Solvente I: cloroformo: ETOH 96% (90+10), Solvente II: Acetona: cloroformo: n-butanol: NH<sub>4</sub>OH 25% (30+30+40+10) y solvente III: Acetato de etilo: MeOH: Ácido Acético (80+10+10) (23).

Cuando el frente del solvente está cercano al borde de la placa se quita de la cámara cromatográfica y se hace las mediciones del valor de corrida del soluto (muestra) en centímetros y del solvente (frente del solvente), también en centímetros, el valor de hRf se calcula con la relación siguiente:



$$hRf = \frac{\text{valor de corrida del soluto}}{\text{valor de corrida del solvente}} \times 100$$

Los valores de hRf de la cafeína reportados en la literatura según Stahl-Egon con los solventes señalados son: en Solvente de resolución I 57, en solvente II 78 y con solvente III 41. La cafeína se revela con solución de cloramina T que consiste en 10% de cloramina T acuosa, y ácido clorhídrico 1 normal (23).

## **F. Micro sublimación**

También la cafeína puede ser identificada por micro sublimación mejor aún si está asociado con otras purinas como teobromina y teofilina y puede realizarse en un Hot plate con control reostático. La sublimación se produce a una temperatura de 178°C, consiste en el paso directo de la cafeína de sólida a gas sin pasar por estado líquido (18,23).

### **1.1.10. Caracterización por espectrometría UV/visible**

Todas las purinas presentan una banda comprendida entre 250 y 290 nm. En disolución neutra la cafeína muestra una longitud de onda máxima ( $\lambda_{max}$ ) a 278 nm a un valor de  $\epsilon$  max de 9,100 (27).

El valor de la longitud de onda de la cafeína anhidra, si el solvente es MeOH tiene un valor  $\lambda_{max}$  de 273 nm, si se prepara soluciones de cafeína en partes por millón (ppm) se puede hacer un ajuste de valores mediante la absorbancia de cada concentración de la solución, si planteamos una gráfica de estos valores observados medidos en el equipo UV/visible a cada valor de concentración preparado, se puede aplicar la ecuación de la recta  $y = b + mx$ , mediante el cual podríamos obtener el valor de b= Intercepto, m=pendiente, Y= valor de absorbancia y X= valores de concentración.

Se realizó un experimento en el aparato UV/visible "UNICO" preparando soluciones de cafeína en 5,10,15,20,25 ppm y se obtuvo resultados de absorbancia de 0,290; 0,533; 0,763; 1,002; 1,252 respectivamente. Finalmente se determinó que a una concentración de 12,04 ppm la absorbancia fue de 0,622

cuando la longitud de onda era de 273 nm valor que se obtiene cuando se mide en metanol en las condiciones más adecuadas. Con estos valores donde “x” representa la concentración e “y” la absorbancia, se calculó el valor de intercepto es decir el menor valor de absorbancia que llega a cortar el eje de las ordenadas y el valor m que es la pendiente de la recta, se ordenó los datos que permitió aplicar la ecuación de la recta  $y = b + mx$  (28) cuyas variables se calculan luego de ordenar los valores obtenidos usando mínimos cuadrados en una correlación lineal (ver tabla 1), se calcula la suma de valores “x” y la suma de valores de “y”, usando el promedio de estos 2 valores.

**Tabla 1.** Valores de absorbancia(Y) y de concentración de cafeína en ppm

| X                   | Y               | XY                 | X <sup>2</sup>    |
|---------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| Concentración (ppm) | Absorbancia     | Abs. x Conc.       | Conc. cuadrática  |
| 5                   | 0,290           | 1,45               | 25                |
| 10                  | 0,533           | 5,33               | 100               |
| 15                  | 0,763           | 11,445             | 225               |
| 20                  | 1,002           | 25,04              | 400               |
| 25                  | 1,252           | 31,30              | 625               |
| $\Sigma X=75$       | $\Sigma Y=3,84$ | $\Sigma XY=69,565$ | $\Sigma X^2=1375$ |
| $\bar{x}=15$        | $\bar{y}=0,768$ |                    |                   |

Con los datos obtenidos se calcula “b” intercepto y “m” pendiente. Primero calculamos “b” aplicando la expresión siguiente:

$$b = \frac{(\Sigma y)(\Sigma x^2) - (\Sigma x)(\Sigma xy)}{N \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \rightarrow b = \frac{(3,84)(1,375) - (75)(69,565)}{5 \times 1,375 - (75)^2} \rightarrow b = 0,0501$$

$$m = \frac{(N \Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{N \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \rightarrow m = \frac{(5 \times 69,565) - (75)(3,84)}{5 \times 1,375 - (75)^2} \rightarrow m = \frac{59,825}{1,250} = 0,048$$

Tomando la expresión  $y = b + mx$ , ecuación de la recta de calibración sabiendo que  $b = 0,0501$ ,  $m = 0,048$ ,  $\bar{Y} = 0,768$ , calculemos X que es el valor de concentración

$$x = \frac{y - b}{m} \rightarrow x = \frac{0,768 - 0,0501}{0,048} = 14,956$$

Pero la correlación y función de los valores de absorbancia de 0,622 da un valor de longitud de onda de 273 nm permite expresar la ecuación del modo siguiente:

$$x = \frac{y - b}{m} \rightarrow x = \frac{0,622 - 0,038}{0,0485} = 12,04$$

Pero nuestro cálculo se hizo aplicando la ecuación de la recta con valores promedios en la ecuación  $\bar{y} = b + m\bar{x}$  donde  $\bar{y} = 0,768$ ,  $b = 0,0501$  y  $m = 0,048$ , entonces:

$$\bar{x} = \frac{\bar{y} - b}{m} \rightarrow \bar{x} = \frac{0,768 - 0,0501}{0,048} \rightarrow \bar{x} = \frac{0,7179}{0,048} = 14,9563$$

Para establecer una buena correlación determinamos el % de error usando cálculo numérico.

$$\%error = \left( \frac{\bar{x} - x}{\bar{x}} \right) 100 \rightarrow \%error = \frac{14,9563 - 12,04}{14,9563} \times 100 = 19,5$$

Hay un 19,5 % de error, este valor se multiplica por 14,9563

$14,9563 \times 0,195 = 2,916$ , luego para hallar la concentración se resta de 14,9563 el valor de 2,916 y se obtiene  $14,9563 - 2,916 = 12,04$

El valor de porcentaje de error nos permite estimar un valor exacto de concentración de cafeína a 273 nm de longitud de onda cuando la absorbancia es de 0,622 y la concentración de 12,04 ppm.

Este valor también sirve para estimar la cantidad de cafeína obtenida según el procedimiento experimental seguido y el rendimiento porcentual. Para medir la longitud de onda de la muestra se lo disolvió al 10% es decir 1gr de cafeína en 100 ml de metanol. Se tomó una porción de la solución (3ml) se llena la celda de cuarzo de  $1\text{cm}^2$  y se introduce en el área de muestra junto con la celda de referencia que se halla llena con MeOH. Se corre la muestra y el registrador debe dar un espectro con la absorbancia de 0,622 y una longitud de onda de 273nm.

## 1.2. Definición de términos básicos

**Alcaloide verdadero:** Es aquel que posee un nitrógeno formando parte de la estructura heterocíclica, se encuentra normalmente en estado de sales y biogenéticamente tiene como precursor un aminoácido, de esta estructura aromática tipo fenilalanina, tirosina (11).

**Protoalcaloides:** Son aminas sencillas, el nitrógeno en su estructura ocupa una posición extracíclica, es de naturaleza básica y es producto del metabolismo de los aminoácidos (11).

**Pseudoalcaloides:** Poseen todas las características de los alcaloides diferenciándose únicamente en que biogénicamente no proceden de aminoácidos, son derivados de bases purínicas y para ser identificado no debe usarse los reactivos generales de identificación de alcaloides. Si no la prueba de la Murexida (1,26), con el que se identifica la presencia de cafeína, teobromina y teofilina.

**Biosíntesis:** La biosíntesis es un proceso de múltiples pasos, catalizado por enzimas, en el que los sustratos se convierten en productos más complejos en los organismos vivos. Las plantas sintetizan miles de compuestos usando rutas metabólicas utilizando moléculas simples o átomos como el oxígeno, carbono y nitrógeno.

**Identificación y/o caracterización:** Es el conjunto de procedimientos fisicoquímicos e instrumentales cromatográficas y espectrométricos que se utilizan para determinar la estructura química de una sustancia desconocida, cuando no se dispone de las técnicas más sofisticados se recurre al análisis comparativo usando una sustancia patrón ya conocida por sus propiedades fisicoquímicos y espectrométricas.

**Extracción:** Son las técnicas que se usan para aislar y purificar un compuesto proveniente de una muestra vegetal, para lo cual se utiliza diversos métodos de acuerdo a la naturaleza del componente presente en la fuente natural.

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis.

**H<sub>1</sub>.** Las propiedades que caracterizan al alcaloide aislado de *I. inundata* permiten mediante pruebas fisicoquímicas y espectrometría UV-visible determinar que se trata de cafeína.

### 2.2. Variable de estudio y su operacionalización

#### 2.2.1. Variable de estudio

##### **Variable independiente**

**Cafeína**, Sustancia aislado y purificado de las hojas de *I. inundata*, producto del proceso de tratamiento de la muestra vegetal con solventes de diferente polaridad.

##### **Variable dependiente**

**Características fisicoquímicas** son las propiedades físicas que identifican al producto químico aislado luego del proceso de extracción

**Característica espectrométrica UV/visible**, determinada por la longitud de onda que corresponde al pico máximo de absorción del producto aislado luego del proceso de extracción.

## 2.2.2. Operacionalización de variables

| Variable independiente                                 | Definición operacional  | Tipo de Investigación por su naturaleza | Indicadores        | Escala de medición | Medios de verificación                  |
|--|---|---|--------------------|--------------------|---|
| Cafeína aislada de <i>I. inundata</i> Poepp Ex Reissek | Las hojas pulverizadas de <i>I. inundata</i> Poepp Ex Reissek se trataron con etanol, luego se añadió óxido de magnesio como sustancia de inclusión, que cumplió el papel de hospedero; produciéndose una asociación entre la cafeína y el óxido de magnesio. Luego se llevó a sequedad y se trató con ácido sulfúrico al 10%, con el que se rompió el estroma al formarse sulfato de magnesio que dejó en libertad a la cafeína en un medio acuoso. Posteriormente se extrajo con cloroformo, se destiló obteniéndose cristales de cafeína y se recristalizó con agua obteniendo cristales puros de cafeína. | Cuantitativa                            | Peso (rendimiento) | Valor porcentual % | Datos de laboratorio cristales aislados |

| Variable dependiente             | Definición operacional   | Tipo de Investigación por su naturaleza | Indicadores  | Escala de medición                           | Medios de verificación                    |
|----------------------------------|--|---|--|--|---|
| Características fisicoquímicas   | Permitieron identificar el alcaloide aislado y purificado, sobresaliendo el punto de fusión, valores Rf x 100 en TCL, pruebas coloridas y el peso molecular por el método de Rast. | Cuantitativa                            | Punto de Fusión: 215-216<br>Peso Molecular: 194,20<br>Valores de Rf: 5,7 (sílica gel: cloroformo-etanol 96% 90:10) | Grados (°C)<br>gr/mol<br>Número adimensional | Valores de las propiedades fisicoquímicas |
| Características espectrométricas | Se identificó por espectrometría ultravioleta visible, el valor de longitud de onda máxima.  | Cuantitativa                            | Longitud de onda máxima con disolvente neutro a 261 y en metanol a 273 nm.   | Nanómetro (nm)                               | Espectro UV-visible                       |

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Diseño metodológico

El estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo, de enfoque cuantitativo y de diseño experimental, que permitió identificar la presencia de cafeína en la especie en estudio.

### 3.2. Diseño muestral

**Población.** Fue el conjunto de árboles de *I. inundata* que crecen en la margen derecha del río Nanay en la localidad de Nina Rumi, del distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, región Loreto.

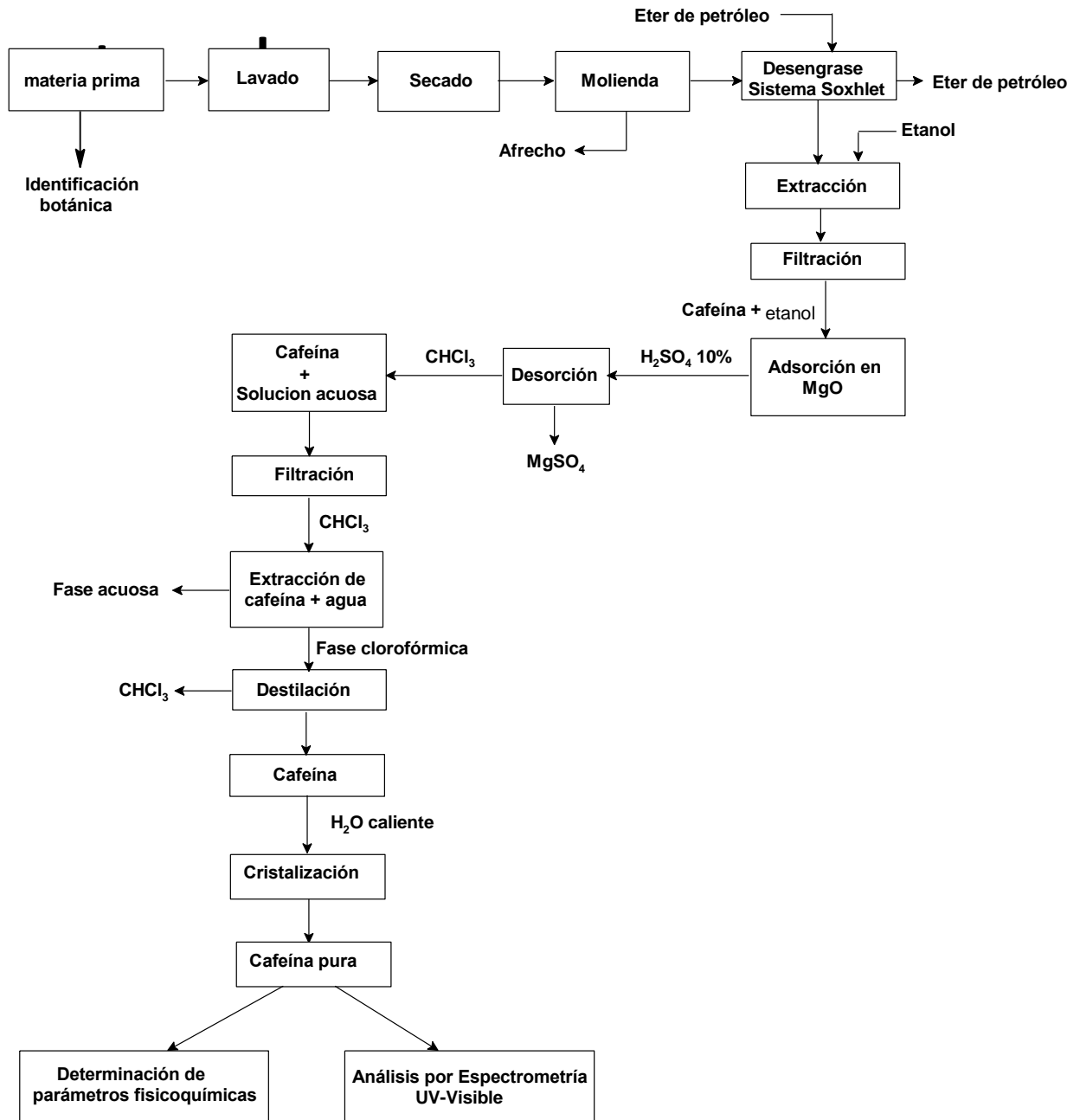
**Muestra de estudio.** Fue recolectada aproximadamente dos kilogramos de hojas de los árboles que forman la comunidad vegetal y que crecen en forma gregaria. Fueron seleccionadas hojas turgentes no deteriorados o atacados por los insectos.

Los sujetos de estudio (hojas) no se tomaron en forma aleatoria porque cada uno de ellos “*per se*” tiene los mismos componentes, aquí no se puede observar ninguna variación significativa del componente (cafeína) entre hoja a hoja (29). Debido a que el recojo de la materia prima no es aleatoria ni requiere grupos de control, ya que todas las hojas de *I. inundata* poseen el mismo principio activo (1,18,23).

### 3.3. Procedimiento de recolección de datos

El proceso que se siguió fue algorítmico, es decir un conjunto ordenado de pasos o etapas que condujeron a la elucidación del compuesto. Las etapas del proceso fueron las siguientes: Recolección e identificación de la muestra, lavado, secado sobre láminas de papel de filtro y aire acondicionando regulado a 17 °C, molienda, tamizado en malla 60 ASTM, se forman cartuchos de papel filtro y en él se colocaron 200g de muestra que se llevaron al vaso del equipo de soxhlet para la extracción con etanol, el etanol más cafeína se filtró y se vació sobre el óxido de

magnesio que lo adsorbió, para completar la adsorción se calienta hasta evaporar el alcohol luego se desabsorbió la cafeína haciendo reaccionar con ácido sulfúrico se formó sulfato de magnesio, se filtró para separar sulfato de magnesio dejando libre la cafeína que se aisló añadiendo cloroformo que se concentró en rotavapor y se cristalizó, la recrystalización se hizo con agua caliente obteniendo cristales monoclinicos blancos y sedosos (figura 3)



**Figura 2.** Diagrama de bloque para las etapas de obtención de cafeína a partir de las hojas de *I. inundata*



### 3.3.1. Aislamiento y purificación del alcaloide

**A. Recolección de la muestra vegetal:** La muestra vegetal de *I. inundata* se recolectó en el centro poblado de Nina Rumi distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas cuyos datos georreferenciales son las siguientes 3° 50' 37,7''S; 73° 23'13,8'' O; altitud 138 msnm.

Se tomaron fotografías de la planta para documentar el estudio, las hojas fueron recolectados y puestos en bolsas plásticas luego fueron trasladados al laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

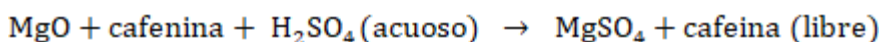
**B. Certificación de la especie:** Para la identificación de la planta se colectó una rama de la especie vegetal con hojas, flores y frutos en la localidad de Puerto Almendras Arboretum “El Huayo” de la Facultad de ciencias Forestales de la UNAP. La muestra fue llevada al Herbarium Amazonense CIRNA UNAP, donde el taxónomo certificó la muestra vegetal y entregó una constancia con su código de identificación permanente 023894 (ver anexo 1).

**C. Preparación y limpieza de la muestra:** Las hojas fueron lavadas con agua destilada para quitar areniscas y sustancias que se hallan impregnadas, luego se quitó el exceso de humedad acomodando sobre papel de Filtro y haciendo funcionar el aire acondicionado a 17°C, se llevaron las hojas a la estufa Memmert por 4 horas a una temperatura de 70°C. Cuando se quitó la muestra de la estufa después de enfriar se pesó obteniéndose 700 gr que se llevó a molienda fina en molino de disco, se tamizó en tamiz #60 (0,25 mm) y se obtuvo 300g de muestra pulverizada (ver anexo 7).

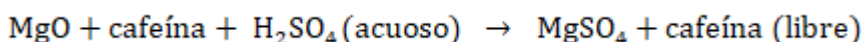
**D. Desengrase:** Se pesó 200g de muestra pulverizada en balanza analítica se dividió en 4 tandas 50g cada uno. El polvo se puso en cartuchos de papel de filtro, se llevó al compartimiento de extracción del equipo Soxhlet en el reservorio de disolvente se agregó éter de petróleo y se programó el calentador a 70°C. El

extracto se filtró para recuperar el éter de petróleo, el residuo se eliminó. Luego el extracto seco sirvió para la maceración (ver anexo 7).

**E. Maceración de la muestra:** El polvo desengrasado se introdujo en un balón de 2 litros de capacidad y se agregó 800 ml de etanol al 96°, se maceró por 24 horas con agitación intermitente para extracción máxima del alcaloide. Se filtró la solución alcohólica se vertió 100 g de Óxido de magnesio (MgO), luego se calentó para facilitar la adsorción de cafeína con el óxido de magnesio, método conocido como “inclusión molecular” donde el MgO cumple el papel de colador molecular o sustancia de inclusión, porque permite que la cafeína sea adsorbida por los retículos cristalinos de óxido de magnesio que cumple el papel de hospedero mientras la cafeína hace el papel de huésped, se calienta hasta sequedad luego sobre esta mezcla de óxido de magnesio y cafeína se vierte 200ml de solución de ácido sulfúrico al 10% para desadsorber la cafeína, se produce la reacción química siguiente (ver anexo 7):



**F. Extracción del alcaloide:** El macerado se filtró y a la solución filtrada se añadió 100 g de óxido de magnesio (MgO), luego se calentó para facilitar la adsorción de la cafeína por inclusión molecular, se calentó hasta sequedad hasta formar el estroma cristalino donde el óxido de magnesio adsorbió a la cafeína al interior de su retículo cristalino formando una interacción Vander Waals hospedero-huésped, después se añade 100ml de ácido sulfúrico al 10% para desadsorber la cafeína, donde el MgO formó sulfato de magnesio y dejó libre a la cafeína sobrenadante en medio acuoso, la reacción química es el siguiente (ver anexo 7):



Para separar el sulfato de magnesio se filtró, se pasó a una pera de decantación de 2 litros, se agregó cloroformo para separar la cafeína, se separa la fase clorofórmica y se añade sulfato de sodio anhidro, luego se filtra y se concentra en rotavapor se formaron unos cristales blancas y sedosas en forma de agujas. Se

formó el sulfato de magnesio rompiéndose la red estromática del óxido de magnesio para formarse sulfato de magnesio que dejó en libertad a la cafeína que se halla en el medio acuoso. Se llevó a filtración y el filtrado se pasó a una pera de decantación de 2 litros, se extrajo con 3 porciones de cloroformo (tandas) agitando vigorosamente para que la cafeína pase de la fase acuosa a la fase clorofórmica. La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtró para descartar el sulfato de sodio y el extracto clorofórmico se concentró en rotavapor a presión reducida a 45°C. En el balón del rotavapor se formaron unos cristales blancos y sedosos en forma de agujas. Estos cristales se recrystalizaron con agua caliente; se filtró la solución cafeína-agua se dejó en reposo y aparecen unos cristales blancos sedosos en forma de agujas, estos cristales se pesaron en balanza analítica y se obtuvo 2,8630g. Con el que se realizó la medición de los parámetros fisicoquímicos y la determinación de la longitud de onda en el aparato de espectrometría 2800 UV/visible (Spectrophotometer UNICO)

**A. Purificación:** Los cristales obtenidos se recrystalizaron con agua caliente; se filtró la solución cafeína-agua se dejó en reposo y aparecen unos cristales blancos sedosos en forma de agujas, estos cristales se pesaron en balanza analítica y se obtuvo 2,8630g. con el que se realizaron las mediciones de los parámetros correspondientes (ver anexo 7).

**H. Rendimiento de la cafeína:** El rendimiento se procesa en base a la relación entre el peso de la sustancia aislada sobre el peso de la muestra utilizada multiplicada por 100 (el cálculo se realiza en el anexo 4).

### **3.3.2. Determinación de los parámetros fisicoquímicos**

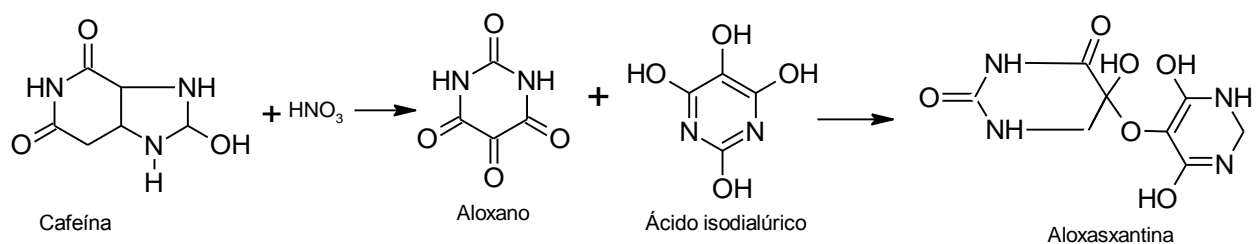
**A. Punto de fusión** se midió usando el equipo FISATOM 431D de USV 60 Hz rango 50 a 300°C. Para determinar el punto de fusión se mezcló el patrón de cafeína con la muestra aislada, se prepararon 3 muestras que se introdujeron en 3 tubos capilares, se llevó al equipo FISATOM 431D, el momento que se fundieron pasando completamente del estado sólido a estado líquido, se leyó la temperatura cuyo valor fue de 238°C.

**B. Punto de sublimación** se determinó usando una batería de calentamiento con arena y un termómetro con un rango de temperatura de 450°C. Consistió en medir la temperatura en la que la muestra pasó de la fase sólida directamente a la fase gaseosa, esta transición se denomina sublimación. Para medirlo se tomaron 2 vasos limpios una de 50 ml y otro de 250 ml, en el vaso de 250 ml se agregó arena blanca seca hasta que la arena cubra un valor de 150 ml, sobre esa arena se introdujo el vaso de 50 ml donde se depositó 0,5g de la muestra aislada, se tapó la boca con una luna de reloj y se introdujo un termómetro de 450°C hasta que la arena tapó el bulbo del termómetro, se puso el acoplado de vasos, luna de reloj y termómetro en un calentador de resistencias eléctricas selladas y con control reostático de temperatura.

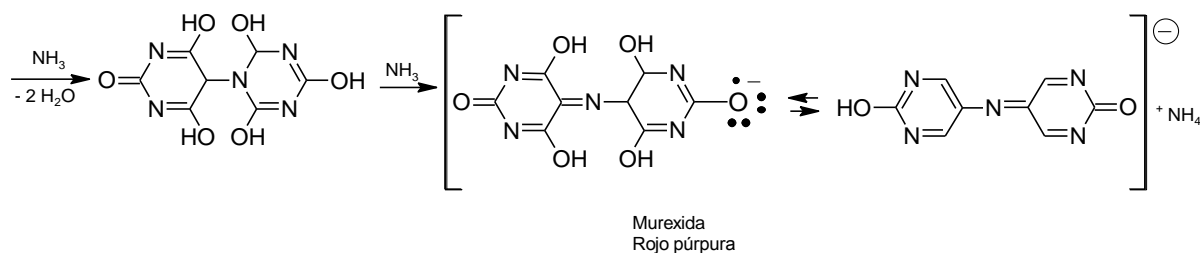
Se puso en funcionamiento el equipo, a partir de la temperatura de 100°C que marca el termómetro se va observando el ascenso de la columna de mercurio cuando la temperatura llegó a 178°C se observó nítidamente el ascenso de una columna de vapor que queda retenida en la parte convexa de la luna de reloj donde se solidificó.

**C. Reacción colorida.** se tomó 5mg de la sustancia pura aislada, se disolvió en 8 gotas de ácido nítrico concentrado y se llevó a sequedad, luego se añadió 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado en segundos se formó un color púrpura. Este cambio de color es conocido como la reacción de la Murexida, que se da en moléculas que tienen el núcleo purínico muy característico como las xantinas y sus derivados, 1,3 sustituidos (teofilina), 3,7-sustituidos(teobromina) y 1,3,7 sustituido(cafeína).

El proceso de reacción es como sigue, como el esqueleto precursor de una xantina es el ácido úrico, este al reaccionar con el ácido nítrico sufre una reacción de desproporción que da Aloxano y el ácido Isodialurico, luego Aloxano y ácido Isodialurico giran 90 grados en forma levógira, hacia a la izquierda, el carbonilo del Aloxano en posición 3 gana un hidrogeno y se hidroxila al reaccionar con el grupo OH en posición 6 del ácido Isodialurico forma un éter la Aloxantina (gibaja Oviedo).



La Aloxantina cuando reacciona con el aminoácido con sustracción de dos moléculas de agua forma el ácido purpúrico, al volver a reaccionar con el amoníaco forma el complejo murexida de color rojo-purpura.



**Figura 3.** Formación del complejo murexida (26).

**Valores  $R_f$**  se utilizó la técnica señalada por Stahl-Egon en su libro “Thin Layer Chromatography” (23) (Stahl E). Para determinar el valor  $R_f$  se utilizó placas de sílica gel G bufferadas a pH 6,8 a las cromatoplas preparadas se le agregó solución de fosfato de potasio primario 0,2 M, fosfato de potasio secundario 0,2 M (12 ml de cada compuesto).

Se cortaron 3 cromatoplas de sílica gel G de 20 x 4 cm donde se hizo el rociado con micropipeta de Pasteur la solución acuosa de cafeína usada como patrón y la solución de cafeína aislada de *Ilex inundata* ambas a 2 cm arriba del borde inferior de la placa (conocida como origen) el spot tenía un diámetro de 3 mm separados una mancha de la otra 2cm para que la distancia de separación hacia ambos bordes de la placa sea de 1 cm.

Se utilizaron tres tipos de solventes de corrida: Solvente I: Cloroformo: etanol 96% (90+10), Solvente II: Acetona: Cloroformo: n-butanol-NH<sub>4</sub>OH 25% (30+30+40+10), Solvente III: acetato de etilo: metanol: ácido acético [80:10:10].

El solvente I se depositó en la cámara cromatográfica donde saturó el ambiente de la cámara, luego se introdujo la placa cromatográfica y se corrió. Luego se quitó la cromatoplaque cuando el solvente ascendió 16cm hacia arriba antes de llegar al borde superior de la cromatoplaque que se conoce como frente del solvente. Se midió la distancia recorrida por el soluto. Se observó que tanto el patrón como la muestra corrieron la misma distancia 9,12cm. Se realizó el mismo procedimiento usando el solvente II, observando que el solvente ascendió 16cm y la muestra patrón y el soluto recorrieron 12,48cm y por último utilizando el solvente III, la distancia observada del ascenso del solvente fue 16cm y el recorrido de la muestra patrón y del soluto fueron de 6,56cm Seguidamente se calculó el valor de hRf con la fórmula siguiente (ver anexo 5).

$$hRf = \frac{\text{distancia de corrida del soluto}}{\text{distancia de corrida del solvente}} \times 100$$

**D. Peso molecular** se utilizó el método de Rast, técnica señalada por Shriner et al. en su libro Systematic identification of organic compounds (25) (shriner RL). Para determinar el peso molecular de una sustancia se siguió las indicaciones de Shriner R.L et al. se procede del modo siguiente: Se utilizó un tubo cilíndrico de 8x50 mm limpio y seco, se pesó, luego se colocó 50 mg del compuesto y se pesó nuevamente, después se añadió 0,5g de D-camphor y se volvió a pesar nuevamente el tubo, esta muestra se fundió con una llama baja del mechero de Bunsen hasta que apareció un líquido transparente.

Después que se enfrió el contenido se secó y se colocó sobre una luna de reloj limpia. Este material se pulverizó y se determinó su punto de fusión, por el método de THIELE, aunque resulto más rápido y sencillo realizarlo en el aparato de FISATOM 431 D. cuando se volvió completamente limpio, transparente esta mezcla, se tomó el valor del punto de fusión de la mezcla fue 157,56°C, luego se determinó el punto de fusión del D-camphor (178°C) la sustracción del punto de

fusión del D-camphor menos el punto de fusión de la mezcla D-camphor más la muestra de estudio da el punto de depresión  $\Delta T$  del camphor (25) (shriner RL). Con estos datos se determinó el peso molecular de cafeína que es igual a 194,227 g/mol (ver anexo 6).

### **3.3.3. Análisis por espectrometría ultravioleta visible**

Las mediciones de longitudes de ondas máximas de cafeína se realizaron en un equipo 2800 UV/visible spectrophotometer UNICO.

Se preparó una muestra de 10 mg, pesado con precisión luego se diluyó en 100 ml de metanol, se llevó a la celda de cuarzo de 1 cm<sup>2</sup>, 3 ml de la solución luego se introdujo en la cubeta de referencia en la cavidad denominada área de muestra donde los haces de radiación llegan al área del detector hacia unos tubos fotomultiplicadores separados que generan un voltaje proporcional a la energía incidente en los detectores. El balance de voltaje producido de la absorción de energía en el haz de la muestra, se balancea por medio de un voltaje equivalente que se deriva de una porción de alambre deslizante, en este momento la plumilla del registrador se desplaza y aparecen los valores de longitud de onda. En nuestro estudio programamos un barrido en rango de longitudes de onda entre 200 a 500 nm en medio metanólico y se pudo observar el pico siguiente:

$\lambda_{\max \text{ MeOH}}$  273 nm.

### **3.4. Procesamiento y análisis de datos**

Los datos fueron procesados en Excel y presentados según la estadística descriptiva en tablas.

### **3.5. Aspectos éticos**

Al aislar cafeína de las hojas de la especie de *I. inundata*, ésta no fue amenazada en su dinámica de crecimiento y propagación, porque la muestra se extrajo de las hojas del árbol órgano vegetal que se renueva permanentemente en su desarrollo normal, tampoco se realizó con la cafeína pruebas biológicas.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Rendimiento de la cafeína

El rendimiento de cafeína de *I. inundata* es la relación proporcional entre el peso del producto sobre el peso de la materia prima del cual se aisló expresado en valor porcentual, se trabajó con 200g de muestra del cual se obtuvo 2,8630g de cafeína, que corresponde a un rendimiento de 1,431% (ver anexo 4)

### 4.2. Valores de los parámetros fisicoquímicos

La medida del punto de fusión de los cristales de muestra fue de 238°C, el punto de sublimación fue de 178°C, la reacción colorida también denominada reacción de murexida dio positiva dando una coloración púrpura, el peso molecular determinada por el método de Rast dio 194,227g/mol. Los valores de hRf se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de hRf con tres tipos de solventes de corrida

| <b>Solvente de corrida</b> | <b>Mezcla</b>   | <b>Valor hRf</b> |
|----------------------------|---|------------------|
| Solvente I                 | Cloroformo: etanol 96% (90+10)                                      | 57               |
| Solvente II                | Acetona: Cloroformo:n-butanol: NH <sub>4</sub> OH 25% (30+30+40+10) | 78               |
| Solvente III               | acetato de etilo: metanol: ácido acético (80+10+10)                 | 41               |

### 4.3. Mediciones de longitud de onda

En el barrido de la muestra disuelta en metanol se observó que la longitud de onda máxima  $\lambda_{\text{max. MeOH}}$  :273 nm (ver anexo 2)



## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El método de aislamiento de cafeína propuesto por Harborne (1) en base a los experimentos realizados por Ikan Rafael (30), que se utilizó en el presente estudio, resultó ser el más adecuado y confiable para la obtención de cafeína pura y con alto rendimiento. El óxido de magnesio hace el papel de un compuesto de inclusión comportándose como hospedero, permite llevar al interior de sus retículos cristalinos (red estromática) a todas las moléculas de cafeína que se hallaban disueltas en etanol y que se constituyen en el huésped del óxido de magnesio. Se da entonces entre el óxido de magnesio y la cafeína una interacción de Van der Waals que hace que constituyan un solo sistema, cuya ruptura se produce cuando sobre este sistema termodinámico se vierte la solución de ácido sulfúrico al 10 %, entonces se produce una reacción que da lugar a la formación del sulfato de Magnesio dejando a la cafeína libre que queda en la solución acuosa del que se lo separa con cloroformo, en estas condiciones la cafeína y el cloroformo forman una sola fase de la que se separa el cloroformo por destilación dejando a la cafeína como residuo puro.

Este método de extracción de cafeína es útil porque puede ser extrapolable a nivel industrial para ser aplicado en la industria farmacéutica evitando el método de síntesis en el que se utiliza ácido úrico que al reaccionar con el pentacloruro de fósforo se convierte en 2,6,8 tricloropurina y luego por acción del ácido yodhídrico y del zinc se transforma en purina y de allí en cafeína, un método largo y en la que hay presencia de productos secundarios tóxicos (11).

Los resultados obtenidos nos muestran que la especie de *I. inundata* por pertenecer a una familia monofilética es decir que proviene de un mismo precursor evidencian que hay una clara existencia de un precursor de naturaleza xantina, que heredan estas especies y que se da en el género *Ilex*, donde muchos de ellos tienen contenido de cafeína. lo que abre la posibilidad de tener más fuentes alternativas de obtención de cafeína de otras nuevas especies de *Ilex*, probablemente no para su utilización en la industria de las bebidas y los alimentos, tampoco en la industria perfumista y cosmética, por no llevar asociados los componentes odoríferos que si posee el café (*Coffea arábica*) pero si puede

ser utilizado en la industria farmacéutica porque la cafeína de *Ilex* no goza del aroma, la atracción y seducción que produce el café de *Coffea arábica* que lleva consigo una serie de compuestos aromáticos volátiles (oxasol y pirazina).

De acuerdo con la literatura consultada existe evidencias de que cafeína está presente en varias especies de la familia Aquifoliaceae, tales como *Ilex Guayusa* Loes (5,14), *Ilex paraguariensis* St. Hill (mate) (11–13), *Ilex laurina* Kunth (13). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permite afirmar que *I. inundata* de la amazonia peruana contiene cafeína que quedó confirmada por la coincidencia de las propiedades fisicoquímicas y por espectrometría UV-visible.

Saavedra Rojas (14), aisló cafeína de las hojas, frutos y tallos de *I. guayusa*; en las hojas determinó un rendimiento de 2,834%, en frutos 0,327% y en tallos 0,462%, mientras que en el estudio que realizamos con *I. inundata* de la amazonia peruana se determinó un rendimiento de 1,431%, se puede observar que en el estudio de Saavedra Rojas el rendimiento de cafeína en hojas de *I. guayusa* es mayor con respecto a otros órganos de la planta, estos dos estudios demuestran que el género *Ilex* es una fuente importante de cafeína que debe ser aprovechado con fines farmacéuticos.

Chumbia y Kuamar (5) también trabajaron con *I. guayusa* en Ecuador, por espectrofotometría lograron determinar 2,35 miligramos de cafeína por gramo de muestra que representa 0,235% de rendimiento, mientras que, en *I. inundata* de la amazonia peruana se determinó un rendimiento de 1,431%, se puede observar que *I. guayusa* en el estudio de Chumbia y Kuamar tiene menor rendimiento con respecto a la misma especie que crece en otras regiones. Ambos estudios difieren en cuanto a los resultados obtenidos aun siendo de diferentes especies, en *I. guayusa* de Ecuador fue aislada por espectrofotometría, método apropiado solo para fines analíticos, mientras que en el estudio de *I. inundata* de la amazonia peruana la cafeína fue aislada usando otro método, que nos permitió obtener mayor rendimiento y puede ser utilizado para ser extrapolado para su producción a mayor escala.

Pérez *et al.* (13), usando análisis HPLC determinó la presencia de Cafeína, Teobromina y Ácido cafeico en *Ilex laurina* Kunth, mientras que en *I. inundata* de la Amazonía peruana se obtuvo cafeína con un rendimiento de 1,431%, si bien, ambos estudios son de naturaleza diferente; sin embargo, los dos estudios demuestran que ambas especies del género *Ilex* contienen cafeína. Esto prueba que las propiedades que caracterizan a este género de contener patrones moleculares comunes como cafeína se debe a que pertenecen a una familia monofiléctica, es decir comparten la condición de descender de un antepasado común.

El método de Ordoñez utilizando fluidos super críticos para el aislamiento de cafeína, y comparándolo con el método de aislamiento con acetato de etilo también usado por el mismo autor permite observar que el método de fluidos supercríticos que se usa cuando no se sincroniza adecuadamente las variables de presión, temperatura y tiempo no se obtiene la separación más adecuada (24), de otro lado resulta un método caro en países del tercer mundo a pesar de que no contamina el medio ambiente, porque para salir de la dependencia tecnológica se precisa utilizar métodos cuya operatividad sean más fáciles y baratos. Por otro lado, el método de aislamiento de cafeína propuesto por Stahl-Egon (23) usando TLC solo tiene propósitos analíticos mas no para ser extrapolado a nivel industrial. Mientras que en nuestro estudio para el aislamiento de cafeína se usó un método de inclusión teniendo el óxido de Magnesio como hospedero obteniendo un rendimiento de 1,431% de *I. inundata* que puede ser utilizada para ser extrapolado a nivel industrial.

En cuanto al valor de longitud de onda de absorción máxima de cafeína obtenido en solución de metanol fue de 273 nm, este valor es semejante al valor de 273 nm reportado para cafeína por Stahl\_Egon (23) y al valor reportado por García Martínez *et al.* en la cuantificación de cafeína mediante espectroscopia UV-visible en café, Té, cacao es de 273 nm (20), pero Harborne (31) reporta un valor de 278 nm en agua porque experimenta un pequeño efecto del solvente denominado efecto batocrómico que se debe al sustituyente, todos estos valores coincidentes nos permiten confirmar que el principio activo aislado de las hojas de *I. inundata* es cafeína con un rendimiento de 1,431%, valor nada desdeñable como para ser

incorporarlo al conjunto de especies vegetales aportantes de cafeína con propósitos medicinales y como suplemento alimenticio y como mate para combatir el resfriado y la gripe.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.

En las hojas de *I. inundata* de la amazonia peruana se encontró cafeína con un rendimiento de 1,431% lo que muestra que esta planta podría ser usado como fuente proveedora de cafeína para propósitos farmacológicos. Su punto de fusión fue de 238°C, punto de sublimación 178°C, la identificación por medio de la reacción colorida o prueba de murexida de cafeína y sus derivados purínicos teobromina y teofilina dio positiva. El peso molecular encontrado por método de Rast fue de 194,227 g/mol.

Los valores de hRf en TLC con solvente de corrida Cloroformo: etanol 96% fue de 57, con solvente de corrida Acetona: Cloroformo: n-butanol: NH<sub>4</sub>OH 25% fue de 78 y con solvente de corrida acetato de etilo: metanol: ácido acético fue de 41, estos valores son coincidentes indicados en la bibliografía para cafeína.

El valor de longitud de onda máxima de absorción de la cafeína en solución de metanol fue de 273 nm medido en el equipo 2800 UV/vis Spectrophotometer marca "UNICO", este valor es semejante al valor reportado en la literatura para cafeína.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Los resultados son alentadores, siendo muy prometedora la producción de cafeína a partir de la especie *I. inundata*; de manera que sería conveniente que en la facultad de Farmacia y Bioquímica se instale un prototipo de planta piloto para producir cafeína a partir de las hojas de *I. inundata* y así incorporarlo a las actividades productivas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana
- También, realizar un estudio de factibilidad para instalar un laboratorio, para producir productos derivados de la cafeína con propósitos medicinales y como suplemento alimenticio y como mate para combatir el resfriado y la gripe
- A la Facultad de Ing. Forestal realizar estudios de proyecto de reforestación de esta especie vegetal en el área del fundo de Zungarococha\_Puerto Almendra LLanchama de la UNAP.
- En el área del Jardín Botánica en la facultad de Farmacia y Bioquímica, es conveniente sembrar esta especie para que forme parte de las especies de interés farmacéutico.

## CAPÍTULO VIII: REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Harborne JB. Phytochemical methods. Chapman an. London; 1973.
2. Pardo Lozano R, Alvarez García Y, Barral Tafalla D, Farré Albaladejo M. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. Adicciones. 2007;19(3):225-38.
3. Arias R, Gualli A. Estudio comparativo del Té de la especie (*Ilex guayusa*) procedente dela región amazónica y el producto comercial de la empresa “aromas del tungurahua”. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2013.
4. Benítez-villalba JC, Grau-torales ML, Cristaldo-lópez OD, Bogado-fernández AI, Arrúa-martínez LA, Villalba-villalba NM. Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate ( *Ilex paraguariensis* St . Hil ) comercial , UV-visible y HPLC. reportes Cient la FACEN. 2021;12(1):48-58.
5. Chumbia Yankuam GA, Kuamar Sandu AC. Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en guayusa (*Ilex guayusa* Loes) y determinación de actividad antioxidante y contenido de cafeína (Tesis para optar el Título de Ingeniería Agroindustrial). Universidad Estatal Amazónica; 2019.
6. González-Alejo FA, Barajas-Fernández J, García-Alamilla P. Extracción de compuestos solubles de la cascarilla de cacao con CO2 supercrítico. Caso de metilxantinas y grasa. CienciaUAT. 2019;13(2):128-40.
7. Vegesna Renu SB. A biotchnological approach for decaffeination. University of Mysore, India; 2007.
8. Judd W s., Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach Hardcover. Segunda ed. USA: Sinauer Associates; 2002.
9. Ayala Flores F. Taxonomía vegetal de Angiospermas y Gimnospermas de la amazonia peruana. Primera Ed. Iquitos - Perú; 2003.

10. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Primera Ed. España: Editorial Acribia S.A; 1991.
11. Conant JB, Blatt AH. Química de los compuestos orgánicos. Primera Ed. España: Editorial Aguilar; 1963.
12. Portela Quintero LC. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* frente a *Helicobacter pylori*. Pontificia Universidad Javariana Bogotá; 2020.
13. Pérez JM, Cardona W, Urango L, Alzate F, Rojano B, Maldonado ME. Aspectos nutricionales y fisicoquímicos de *Ilex Laurina* Kunth (Aquifoliaceae): un estudio comparativo con *Ilex paraguariensis*. *Perspect en Nutr Humana*. 2017;19(1):41-54.
14. Saavedra Rojas GS. Determinación de la concentración de cafeína en guayusa (*Ilex guayusa* Loes), en San Ignacio- Cajamarca. Universidad Nacional deE Cajamarca; 2017.
15. Kuskoski EM, Fett R, García A. A, Troncoso G. AM. Chemical and pharmacological properties of the fruit guaraná (*Paullinia cupana*). *Vitae, Rev la Fac Química Farm*. 2005;12(2):45-52.
16. Cronquist AJ. The evolution of and classification of flowering plant. Garden TNYBU, editor. New York; 1988.
17. Reflora. *Ilex inundata* Poepp. ex Reissek [Internet]. Flora e funga do Brasil. Disponible en: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB21963>
18. Stecher PG. The Merck Index. Merck, editor. New York: Merck y CO, Inc, Rahway N.Y USA; 1968.
19. Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Iwama M, Irie M, Crozier A, et al. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol*. 1999;120(2):579-86.
20. García Martínez E, Fuentes López A, Fernández Segovia I. Extracción y cuantificación de cafeína mediante espectroscopía UV-Visible en café, té y



- cacao [Internet]. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València. Valencia; 2018. Disponible en: [https://riunet.upv.es:443/handle/10251/104055%0Ahttps://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/104055/García%3BFuentes%3BFernández - Extracción y cuantificación de cafeína mediante espectroscopía UV-Visi....pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es:443/handle/10251/104055%0Ahttps://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/104055/García%3BFuentes%3BFernández%20-%20Extracción%20y%20cuantificación%20de%20cafeína%20mediante%20espectroscopía%20UV-Visi....pdf?sequence=1)
21. Flores J, Antonio Armijo J, Mediovilla A. Farmacología Humana. España: Editorial Mason; 2000.
  22. VADEMECUM V. Medicamentos con cafeína. Vademecum [Internet]. VIDAL GROUP. Disponible en: [https://www.vademecum.es/medicamentos-principio-activo-cafeina\\_539\\_1](https://www.vademecum.es/medicamentos-principio-activo-cafeina_539_1)
  23. Stahl E. Thin layer chromatography spring verlag. Berlin: Heidelberg. N.Y; 1969.
  24. Ordóñez AF, Rojas NY, Parada F, Rodríguez I. Estudio comparativo de la extracción de cafeína con CO<sub>2</sub> supercrítico y acetato de etilo . Rev Ing. 2006;(24):34-42.
  25. Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY. Systematic identification of organic compounds. Quinta Edi. New York: Editorial Wiley N.Y; 1965.
  26. Gibaja Oviedo S. Guía para el análisis de los compuestos de carbono. Lima-Peru: Editorial UNMSM; 1977.
  27. RAO C. Espectroscopia ultravioleta visible. Primera Ed. Madrid, Barcelona, Buenos Aires, México: Editorial Alhambra S.A.; 1970.
  28. Murray S. Estadística. México: Editorial McGraw Hill; 1979.
  29. Carrasco Díaz S. Metodología de la investigación científica. Primera Ed. 2006;
  30. Ikan R. Natural Products. A Laboratory guide. Ilustrada. Press A, editor. 1991. 360 p.
  31. Harborne JB. Phytochemical methods. Editorial Chapman AH, editor. London; 1973.

## ANEXOS

### ANEXO Nº. 1. Identificación botánica de la planta



UNAP

Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense - AMAZ

INSTITUCION CIENTIFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CODIGO DE AUTORTIZACION AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por **CÓRDOVA ALVIS, PAULO SERGIO y CÓRDOVA LÓPEZ, PATRICIA**, Bachilleres de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, pertenece a la tesis titulado: **IDENTIFICACIÓN DE LA CAFEINA AISLADA DE LAS HOJAS DE *Ilex inundata* Poepp. ex Reissek, POR SUS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ESPECTROMETRÍA UV**; han sido **DETERMINADAS** en este Centro de Investigación y Enseñanza, Herbarium Amazonense-AMAZ, del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la UNAP-CIRNA-UNAP, como se indica a continuación:

| CÓDIGO AMAZ | FAMILIA       | NOMBRE CIENTÍFICO                      |
|-------------|---------------|--|
| 023894      | Aquifoliaceae | <i>Ilex inundata</i> Poepp. ex Reissek |

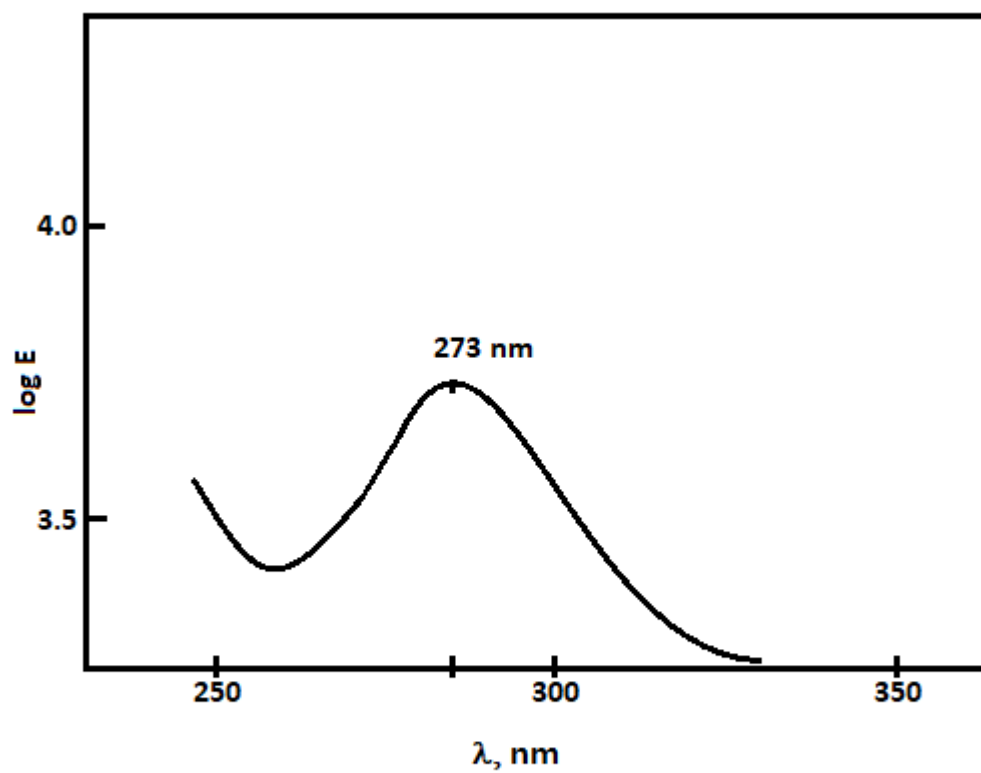
Se expide la presente constancia a los interesados, para los fines que estimen conveniente.

Atentamente,

Iquitos, 23 de febrero, 2022

  
  
Richard J. Huarcaya Acostupa  
Coordinador Herbarium Amazonense

## ANEXO Nº. 2. Espectro de la Cafeína



Espectro UV de la cafeína corrido en metanol

**ANEXO 3.** Fotografía de la planta



#### **Anexo 4.** Cálculo de rendimiento de cafeína

Se calcula estableciendo una relación entre el peso de cafeína obtenida sobre el peso de la materia prima utilizado en forma porcentual.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso de cafeína obtenida}}{\text{Peso de la materia prima}} \times 100$$

Materia prima utilizada 200 gramos de serrín, se obtuvo 2,863 gramos de cafeína, el cálculo es el siguiente:

$$\% \text{rendimiento} = \frac{2,863 \text{ g}}{200 \text{ g}} \cdot 100 = 1,431\%$$

% rendimiento = peso de cafeína obtenida

## Anexo 5. Determinación de los vales de Rf de cafeína

### A. Solvente de corrida I, mezcla cloroformo: etanol 96% (90+10)

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

Distancia de corrido del soluto 9,12 cm

Distancia de corrido del solvente 16,00 cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia de corrida del soluto}}{\text{Distancia de corrida del solvente}} \times 100$$

$$Rf = \frac{9,12}{16,00} \times 100 = 57$$

### B. Solvente de corrida II, mezcla Acetona: Cloroformo: n-butanol-NH<sub>4</sub>OH 25% (30+30+40+10)

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

Distancia de corrido del solido 12,47 cm

Distancia de corrido del solvente 16,00 cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia de corrida del soluto}}{\text{Distancia de corrida del solvente}} \times 100$$

$$Rf = \frac{12,47}{16,00} \times 100 = 78$$

### C. Solvente de corrida III, acetato de etilo: metanol: ácido acético (80+10+10).

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

Distancia de corrido del solido 6,56 cm

Distancia de corrido del solvente 16,00 cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia de corrida del soluto}}{\text{Distancia de corrida del solvente}} \times 100$$

$$Rf = \frac{6,56}{16,00} \times 100 = 41$$

## Anexo 6. Determinación del peso molecular de cafeína

Punto de fusión de la mezcla del componente y D-camphor: 157,56°C

Punto de fusión del D-camphor: 180°C

Se halla la diferencia del punto de fusión

$$\Delta T = 180 - 157,56 = 22,44$$

Aplicando la formula

$$M = \frac{k \cdot \omega \cdot 1000}{\Delta T \cdot W}$$

Sabiendo que

K= Depresión molar del D-camphor 39,7

w= peso de la muestra 50 mg= 0,05 g

W= peso del D-camphor 0,5 g

$$\Delta T = 22,44$$

$$M = \frac{39,7 \cdot 0,05 \cdot 1000}{22,44 \cdot 0,5} = \frac{1985}{6,983} = 194,227 \frac{g}{mol}$$

$$M = 194,227 \text{ g/mol}$$

Se determinaron el porcentaje de error la relación al peso molecular de cafeína 194,19 g/mol promedio del modo siguiente

$$\% \text{error} = \left( \frac{\text{Peso molecular experimental} - \text{Peso molecular real}}{\text{Peso molecular experimental}} \right) \cdot 100$$

$$\% \text{ error} = \frac{194,227 - 194,19}{194,227} \times 100 = \frac{0,037}{194,227} = 0.019$$

Encontramos que el margen de error es de  $\pm 0.019$  un valor relativamente bajo, que significa que la muestra analizada con el peso molecular de 194,19 es el que corresponde a cafeína.



## Anexo 7. Proceso obtención cafeína







Concentrado



Cloroformo para la separación



Separación y purificación



Filtración



Cristalización



Cristales de cafeína