

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA EN CÁPSULAS
PREPARADAS A PARTIR DE EXTRACTO FLUIDO DE *Ilex guayusa* MEDIANTE
ESPECTROFOTOMETRÍA UV.

AUTOR:

CHRISTOPHER RICARDO BASANTES CARRILLO

TUTORA:

MARIA ELENA MALDONADO RODRIGUEZ

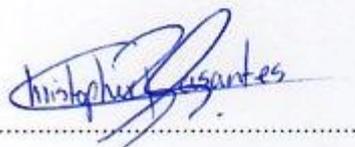
Quito, octubre del 2020

Cesión de derechos de autor

Yo Christopher Ricardo Basantes Carrillo, con documento de identificación N° 1723855605, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la concentración de cafeína en cápsulas preparadas a partir de extracto fluido de *Ilex guayusa* mediante Espectrofotometría UV”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los RRNN, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, octubre del 2020



.....

Christopher Ricardo Basantes Carrillo

C.I 1723855605

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación (EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA EN CÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE EXTRACTO FLUIDO DE Ilex guayusa MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV, realizado por CHRISTOPHER RICARDO BASANTES CARRILLO, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 4 septiembre 2020



María Elena Maldonado Rodríguez

CI: 1707743157

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a Dios en primera instancia y a mi madre quien desde muy pequeño lucho por mí y me sacó adelante siendo una madre soltera no permitió que nunca me falte nada, de igual manera siempre estuvo presente durante mi carrera universitaria cuando más lo necesitaba con una palabra de apoyo, consejo y enseñanza, hoy soy lo que soy gracias a ella.

De igual manera para mi abuela y mi tía quienes siempre me apoyaron a lo largo de mi vida y a toda mi familia por todo su amor, confianza y por creer en mí y nunca dudar de mis capacidades.

Agradecimientos

Primeramente, a la Universidad Politécnica Salesiana en particular a los profesores de la Carrera de Biotecnología de los RRNN por compartir conmigo sus conocimientos y haber puesto su granito de arena para mi formación profesional.

A mi tutora María Elena Maldonado, Ph.D. por haber confiado y creído en mí cuando nadie más lo hizo y haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, de igual manera agradecerle por su apoyo y dedicación para conmigo en el camino del desarrollo de este trabajo.

A los profesores Paco Noriega y Daniel Acurio quienes gracias a sus conocimientos colaboraron en el desarrollo e interpretación de los resultados obtenidos en la investigación.

Y por último a mi familia por su apoyo incondicional y a mis compañeros y amigos que me regaló la universidad Juan, Connie y en especial a Sebastián y Nicolás quienes fueron un apoyo fundamental a lo largo de la carrera y en especial en el desarrollo de este trabajo.

Índice de contenido

Introducción	1
Capítulo I.....	4
1. Marco conceptual	4
1.1 Guayusa	4
1.1.1 Taxonomía y morfología.....	4
1.1.2 Principales componentes de la guayusa	5
1.1.3 Uso de la guayusa	6
1.2 Cafeína.....	6
1.2.1 Características fisicoquímicas de la cafeína.....	6
1.2.2 Principales fuentes de cafeína	7
1.2.3 Usos medicinales de la cafeína	7
1.2.4 Concentración de cafeína en guayusa	8
1.2.5 Ingesta diaria de cafeína.....	9
1.3 Extractos vegetales	9
1.3.1 Técnicas de extracción	10
1.4 Granulación	10
1.4.1 Granulación húmeda	10
1.5 Cápsulas.....	11
1.5.1 Control de calidad en cápsulas.....	12
1.5.2 Control microbiológico	12
1.6 Método de cuantificación	13

1.6.1 Espectrofotometría UV	13
Capítulo II	15
2. Marco metodológico	15
2.1 Localización.....	15
2.2 Diseño experimental	15
2.3. Selección del material vegetal	16
2.4 Secado de las hojas	16
2.5 Elaboración del extracto fluido.....	17
2.5.1 Parámetros de calidad del extracto.....	18
2.6 Formulación de las cápsulas	19
2.6.1 Granulado.....	19
2.6.2 Proceso de encapsulamiento	21
2.6.3 Control de calidad de las cápsulas	22
2.7 Cuantificación de la cafeína.....	25
2.7.1 Curva de calibración	25
2.7.2 Cuantificación de cafeína en el extracto y cápsulas.....	25
Capítulo III	27
3. Resultados y Discusión	27
3.1 Extracto de <i>Ilex guayusa</i>	27
3.2 Granulado	28
3.3 Cápsulas.....	29
3.4 Cuantificación de cafeína por medio de Espectrofotometría UV	33

3.4.1 Curva de calibración	33
3.4.2 Datos de cafeína obtenidos a partir de espectrofotometría.	34
Referencias	41

Índice de tablas

Tabla 1 Taxonomía de <i>Ilex guayusa</i>	4
Tabla 2 Contenido de cafeína en <i>Ilex guayusa</i>	8
Tabla 3 Ingesta diaria de cafeína de acuerdo con rangos de edad	9
Tabla 4 Tamaños de cápsula y su capacidad	12
Tabla 5 Colores específicos para microorganismos en MC-Media Pad.....	13
Tabla 6 Cuadro de diseño experimental	15
Tabla 7 Cantidades para la formulación	20
Tabla 8 Control de calidad extracto fluido de <i>Ilex guayusa</i>	27
Tabla 9 Sólidos totales	28
Tabla 10 Porcentaje de humedad del granulado.....	28
Tabla 11 Fórmula farmacéutica de las cápsulas de extracto fluido de <i>Ilex guayusa</i>	29
Tabla 12 Longitud promedio de las cápsulas	30
Tabla 13 Peso promedio de las cápsulas	31
Tabla 14 Control microbiológico de las cápsulas	32
Tabla 15 Datos de absorbancia para la curva de calibración.....	33
Tabla 16 Cafeína presente en el extracto fluido de <i>Ilex guayusa</i>	35
Tabla 17 Cafeína presente en el granulado de las cápsulas de <i>Ilex guayusa</i>	35
Tabla 18 Análisis estadístico de los datos	37

Índice de figuras

Figura 1. Hojas de guayusa, parte utilizada de la planta	4
Figura 2. Estructura molecular	6
Figura 3. Diagrama del proceso de elaboración del extracto	17
Figura 4. Diagrama de elaboración del granulado	21
Figura 5. Diagrama de elaboración de las cápsulas	22
Figura 6. Disolución de cápsulas	23
Figura 7. Control microbiológico.....	25
Figura 8. Obtención de cafeína a través del extracto y cápsulas.....	26
Figura 9. MC- MediaPad.....	33
Figura 10. Curva de calibración de cafeína.....	34

Resumen

La planta *Ilex guayusa* crece en la Amazonía y es utilizada por los nativos a la cual se le atribuye varios beneficios, uno de los principales es su propiedad estimulante y energética, esto se debe a que uno de los principales componentes de la guayusa es un alcaloide de nombre cafeína, que es parte de las metilxantinas a la cual se le atribuye una capacidad estimulante, debido a este beneficio se realizó la formulación de cápsulas de gelatina dura a partir de un granulado de 250 mg de extracto de *Ilex guayusa* para posteriormente cuantificar la cafeína mediante Espectrofotometría UV; la cuantificación se realizó tanto en el extracto como el granulado obteniendo un promedio de 0,12 mg/mL en el extracto y 0,04 mg/mL en el granulado con una concentración de cafeína en cada cápsula de 0,01 mg que tendrá un efecto farmacológico en el organismo.

Palabras clave: guayusa, extracto, granulado, cafeína, Espectrofotometría UV

Abstract

Guayusa is a plant native of the Amazon used by the natives to which several benefits are attributed, one of the main ones is its stimulating and energetic property, this is because one of the main components of guayusa is an alkaloid named caffeine which is part of the methylxanthines, this alkaloid have a stimulating capacity, due to this benefit, the formulation of hard gelatin capsules was made from a 250 mg granulate based on guayusa extract for the subsequent quantification of caffeine by UV spectrophotometry; caffeine was quantificated in the extract and the granules, obtaining an average of 0,12 mg/mL in the extract and 0,04 mg/mL in the granules with a caffeine concentration of 0,01 mg in each capsule that will have pharmacologic effect in the organism.

Keywords: guayusa, extract, granulated, caffeine, UV spectrophotometry

Introducción

La utilización de plantas medicinales viene desde tiempos inmemorables, shamanes desde el principio de los asentamientos en la Amazonía utilizaban gran variedad de plantas para los rituales tanto religiosos como curativos (Gupta, 1995).

Las plantas medicinales fueron el único tratamiento para enfermedades, entre las cuales están la diabetes y afecciones respiratorias como catarro y gripes (Gupta, 1995), también eran utilizadas por las capacidades antiinflamatorias (Pardau, Pereira, Apostolides, Serem, & Bester, 2017), antioxidantes (Wise & Negrin, 2019) y antibacterianas (Gamboa et al., 2018), por lo cual se profundizó en el estudio de las plantas y los productos de interés que se obtienen de estas (Dayami *et al.*, 2016).

Entre los principales productos que se extraen de las plantas se encuentran los principios activos los cuales son el fundamento de los fármacos de origen vegetal y quienes les dan su actividad terapéutica, para la obtención de los mismos uno de los principales procesos es la elaboración de extracto fluido, el cual consiste en la utilización de un disolvente que puede ser el etanol para la extracción de los componentes de interés de la planta, esta es la forma más utilizada dentro de las formulaciones farmacéuticas que se basan en la utilización de plantas como materia prima, según la OMS el 25 % de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal (Pardo, 2002).

Según Bagde, Sawant, Sawai, Muley, & Dhindhime (2018), Bhattacharya, Parmar, Itankar, & Prasad (2017) y Ekor (2014), plantean que ha habido un aumento en la demanda global de plantas medicinales en las últimas dos décadas, por lo que la eficacia de las especies vegetales medicinales se ha convertido en una preocupación en el sector de la salud y en la farmacéutica ya que la calidad del medicamento en su materia prima ya sea hojas, tallo, raíces, etc, depende de factores importantes como hábitat, tiempo, y área de cultivo.

Según Carrión & Garca (2010), los principios activos se ven alterados por:

- La edad de la planta que afecta la cantidad de componentes activos
- El clima y estación del año que provocan una variación en los metabolitos secundarios de las especies vegetales.

Las etapas fenológicas también tienen un gran impacto en el aspecto cuantitativo y cualitativo del principio activo en las plantas. Un punto básico que se considera como el momento adecuado de recolección de la planta y el conocimiento de las técnicas de almacenamiento de la materia prima juegan un papel primordial en la calidad y seguridad del producto medicinal de origen vegetal (Hernando, 2007).

Existen varios estudios que fundamentan lo antes mencionado como por ejemplo Bhattacharya *et al.* (2017) evaluaron características químicas y farmacológicas de *Centella asiatica* que fueron recolectadas en diferentes intervalos de tiempo, donde los resultados que se obtuvieron en cuanto al contenido fenólico, carbohidratos, taninos, flavonoides y flavonas difirieron de acuerdo a los tiempos de recolección de las plantas por lo cual las plantas de una misma especie no producen igual concentración componentes activos (B. Arias, 2009; Hernández *et al.*, 2017; Schuster & Mitchell, 2019).

El estadio de la planta difiere en cuanto a los componentes activos, en estado juvenil su concentración es baja, en la madurez aumenta y en la vejez disminuye volviéndose inservibles para aplicaciones medicinales. La recolección difiere entre especies, en plantas anuales se recomienda cuando se origina la primera flor y para las perennes lo óptimo es cuando está madura (Saz, 2018). Debido a esto la utilización de cualquier parte de una planta, en forma de materia prima, que tenga alguna actividad en el organismo debe ir acompañado de un control de calidad en cuanto al principio activo para que logre un efecto farmacológico ya que existen muchos factores que influyen en la presencia o no y abundancia o escasez de este en la planta (García *et al.*, 2016).

Debido a lo mencionado anteriormente en cuanto al uso de especies vegetales para obtener componentes activos con fines farmacológicos y la presencia de estos en mayor o menor cantidad de acuerdo al estadio de la planta, el control de calidad mediante la cuantificación del principio activo presente en fármacos de origen vegetal es fundamental para garantizar que se llegue a la actividad terapéutica en el organismo, por lo cual la presente investigación se basa en la utilización de *Ilex guayusa*, una planta presente en la Amazonía ecuatoriana y utilizada por los indígenas por sus propiedades estimulantes atribuida a su contenido cafeína, para la elaboración de cápsulas a base de extracto fluido de esta planta con el fin de cuantificar la concentración de cafeína utilizando la técnica de Espectrofotometría UV. A partir de lo cual surge la pregunta de investigación: Existe la presencia de cafeína en las cápsulas elaboradas para llegar a un efecto farmacológico en el organismo y si esta concentración de cafeína en el extracto se mantiene o desciende frente a las cápsulas.

Es importante saber qué cantidad de cafeína se encuentra en la planta para poder realizar un producto procesado a partir de la misma, ya que así como la guayusa tiene propiedades benéficas para el ser humano por su contenido de cafeína, la concentración de esta en las personas no puede rebasar el 1 g ya que podría generar reacciones tóxicas y efectos no deseados como alucinaciones, somnolencia, entre otras (Kapp, Mendes, Roy, McQuate, & Kraska, 2016; Pardau et al., 2017; Schuster & Mitchell, 2019)

En la investigación se plantea como objetivo principal evaluar la concentración de cafeína en cápsulas preparadas a partir de extracto fluido de *Ilex guayusa* por medio de espectrofotometría UV y para que este se cumpla se realizó el extracto fluido de guayusa, se formuló cápsulas duras a partir de extracto fluido, se elaboró las cápsulas a partir de extracto fluido y por último se evaluó la concentración de cafeína de las cápsulas mediante espectrofotometría UV.

La hipótesis de este trabajo experimental se enmarcó en la pregunta si la concentración de cafeína se mantiene tanto en el extracto como en las cápsulas ya elaboradas.

Capítulo I

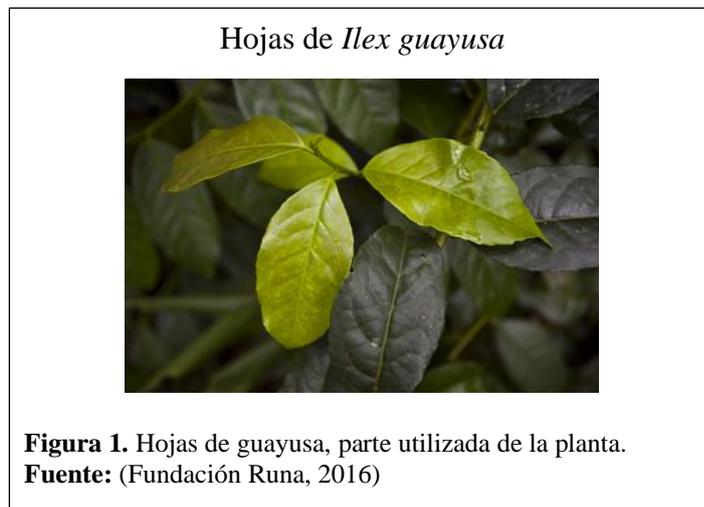
1. Marco conceptual

1.1 Guayusa

La Guayusa cuyo nombre científico es *Ilex guayusa*, es una planta de origen amazónico relacionada con la yerba mate ya que las dos tienen un gran contenido de cafeína en sus hojas (Radice & Vidari, 2005).

Según el Herbario de Loja, ubicado en la provincia del mismo nombre, la guayusa tiene presencia en toda la región Oriental, y en zonas bajas de la región Interandina, se ubica a no más de 1.500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Radice & Vidari, 2005).

A continuación, en la figura 1 se puede observar la morfología de las hojas de *Ilex guayusa*



1.1.1 Taxonomía y morfología

La distribución taxonómica de *Ilex guayusa* se encuentra en la tabla 1

Tabla 1

Distribución taxonómica de *Ilex guayusa*.

Nombre científico	<i>Ilex guayusa</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoleophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Celastrales</i>
Familia	<i>Aquifolaceae</i>
Genero	<i>Ilex</i>
Especie	guayusa

Fuente: (Tamayo, 2017; Yacelga, 2017)

Los especímenes tienen una altura hasta los 10 metros, con 40 a 80 centímetros de diámetro de arbusto, el tronco posee ramas flexibles, las hojas presentan una coloración verde, enteras, oblongas, alternas simples, la hojas jóvenes tienen un tamaño de 15 cm y las maduras llegando a 21 centímetros de largo, el fruto es una baya, la flor es hermafrodita y presenta un color blanco verdoso (Coronel, 2017; Melo, 2014; Tamayo, 2017; Yacelga, 2017).

1.1.2 Principales componentes de la guayusa

Entre los componentes principales de la guayusa se encuentra la cafeína en grandes cantidades, teofilina, teobromina, terpenoides, esteroides y en cantidades mínimas taninos, saponinas, triterpenos, quinonas, aceites esenciales y flavonoides (Carpintero & Salazar, 2014).

Mediante estudios fisicoquímicos realizados se demuestra que aparte de los mencionados anteriormente la guayusa contiene azúcares reductores, fenoles y grasas, en cuanto a los estudios bromatológicos se dieron resultados de contenido de proteína de 0,6 al 1,3 %, contenido en cenizas entre 5,5 al 6,9 %, contenido de grasas entre 1,6 al 4 %, hidratos de carbono que va desde los 78,4 al 83,6 % (Arias & Gualli, 2013).

1.1.3 Uso de la guayusa

La guayusa posee usos ancestrales ya que es utilizada en los rituales como alucinógeno, además de ser consumida en las comunidades indígenas como infusión de hojas debido a las características estimulantes y energizantes que presenta (Carpintero & Salazar, 2014).

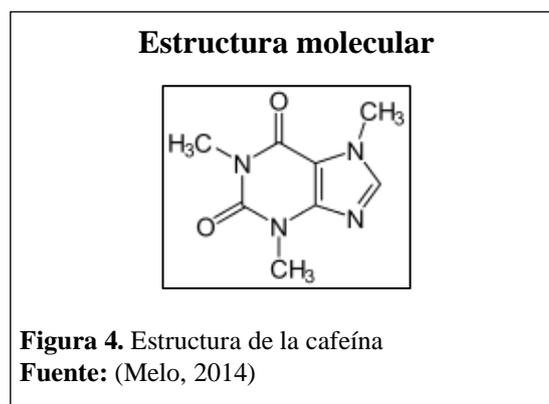
En el campo medicinal se emplea debido al efecto digestivo que presenta, además de su propiedad hipoglucemiante las cuales están siendo estudiadas, como por ejemplo un ensayo de diabetes inducida en ratas, se pudo observar que la utilización de extractos de guayusa retrasa la hiperglucemia, minimizando los síntomas que esta produce; esta planta a su vez también presenta actividad antibacterial y antioxidante (Rocha & García, 2018).

1.2 Cafeína

1.2.1 Características fisicoquímicas de la cafeína

Alcaloide metilxantínico, cuya fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, de nombre científico 1,3,7-trimetilxantina, es soluble en agua aunque también en disolventes orgánicos como el diclorometano y cloroformo (Melo, 2014).

La figura 2 presenta la estructura molecular de este alcaloide.



1.2.2 Principales fuentes de cafeína

Entre las plantas más representativas que contienen cafeína están *Coffea arabica* (café), *Camelia sinensis* (Té) y *Theobroma cacao* (cacao), en menor uso se encuentra la yerba mate y guaraná, y por último tenemos a la guayusa que es una planta no tan estudiada pero que los datos muestran que su contenido de cafeína es comparado con la yerba mate (Carpintero & Salazar, 2014).

Por lo general la planta que contiene cafeína también posee concentraciones de teobromina y teofilina que son alcaloides del mismo origen (Carpintero & Salazar, 2014).

1.2.3 Usos medicinales de la cafeína

Según varios estudios se ha encontrado que la cafeína presenta diferentes usos medicinales, tales como:

Sistema nervioso central

Genera un aumento en la expulsión de noradrenalina lo cual elimina el cansancio lo que provoca que la persona incremente su rendimiento e intelecto y también produce la pérdida de sueño. De igual manera inhibe los receptores A2, con lo cual tiene efecto en el circuito cerebral de recompensa incrementando los niveles de dopamina en el cuerpo (Lozano, Alvarez, Tafalla, & Farré, 2007).

Respiratorios

Mejora la función respiratoria estimulando la misma trabajando como broncodilatador y haciendo que el diafragma incremente su constricción (Lozano et al., 2007).

Cardiovasculares

Provoca aumento en la presión arterial y la frecuencia cardíaca, esto no afecta siempre y cuando las dosis no sean elevadas (Lozano et al., 2007).

Musculoesqueléticos

Mejora el rendimiento físico produciendo vasodilatación en los músculos, mejora la contracción muscular y reduce el agotamiento (Lozano et al., 2007).

Entre otros usos medicinales están la estimulación de las contracciones vesiculares, reduce el colesterol y ayuda en la digestión, de igual manera tiene un efecto diurético (Lozano et al., 2007; Sanchez, 2015; Tavares & Kimiko, 2012).

1.2.4 Concentración de cafeína en guayusa

En la Tabla 2, se muestran concentraciones tanto en peso seco, porcentaje y concentraciones en extractos de guayusa de diferentes autores.

Tabla 2

Concentración de cafeína en *Ilex guayusa*

Concentración de cafeína	Autor
2,8 mg/100 mg en peso seco	(Crespo, 2018)
16,64 mg/g en peso seco	(Melo, 2014)
2,57 % en peso seco	(Tamayo, 2017)
16,95 a 17,01 mg/g en peso seco	(Coronel, 2017)
0,3485 mg/mL de extracto	(Yacelga, 2017)
2,90 a 3,28 % en peso seco	(Cobo, 2016)
8,13 mg/mL de extracto	(Radice & Vidari, 2005)
2,3 % en peso seco	(Tuquina, 2013)

Elaborado por: El Autor, 2020.

1.2.5 Ingesta diaria de cafeína

La cafeína es tóxica cuando se sobrepasa los límites de las dosis, según estudios por encima de 1 gramo puede afectar el sistema nervioso y cardíaco, y con una dosis mayor a 10 g puede generar una falla en el sistema circulatorio y posteriormente la muerte. (Radice & Vidari, 2005).

La ingesta diaria de cafeína de acuerdo con rangos de edad se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3

Ingesta diaria de cafeína de acuerdo con rangos de edad

Población	Ingesta diaria
A partir de los 75 años	22 a 417 mg
65-75 años	23-362 mg
18-65 años	37-319 mg
10-18 años	0,4 a 1,4 mg/kg
3-10 años	0,2 a 2 mg/kg
12-36 meses	0 a 2,1 mg/kg

Nota: Ingesta diaria de cafeína

Fuente: (EFSA, 2014)

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) con sede en los Estados Unidos prohibió el uso de este alcaloide en bebidas en valores superiores a 0,2 mg/mL, ya que es considerada una sustancia con potenciales adictivos (Lozano et al., 2007).

1.3 Extractos vegetales

Los extractos principalmente son preparaciones utilizadas en la industria farmacéutica en las que se utiliza el alcohol como disolvente, y sirve para obtener metabolitos secundarios o principios activos del material vegetal (Amaguaña & Churuchumbi, 2018; Varela & Musuña, 2020).

1.3.1 Técnicas de extracción

Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

- **Percolación:** Es uno de los métodos más utilizados que consiste en el paso del disolvente por el material vegetal en un percolador, de ahí el nombre de la técnica (Varela & Musuña, 2020).
- **Maceración:** Consiste en colocar el material vegetal junto con el solvente a una temperatura y tiempo determinado y si es necesaria la agitación de este (Guerra, 2005).
- **Infusión:** Se basa principalmente en la utilización de agua hirviendo la cual se le coloca en el material vegetal dejando en reposo entre 5 y 10 minutos y luego se realiza la extracción completa (Varela & Musuña, 2020).
- **Soxhlet:** Consiste en un sistema de extracción semicontinua donde el material vegetal se introduce al inicio solamente y el solvente se va introduciendo mientras se va extrayendo el mismo, es decir tiene una renovación continua (Guerra, 2005).

1.4 Granulación

1.4.1 Granulación húmeda

Se fundamenta en añadir un aglutinante disperso en un líquido para formar una suspensión, por lo general se emplea agua o algún disolvente orgánico (Abraham & Casillas, 2014).

Para la granulación húmeda se sigue el siguiente proceso:

- a) **Mezclado o granulado:** El fármaco se debe mezclar con las sustancias en los cuales debe encontrarse un aglutinante, para ello se puede utilizar un mezclador orbital o de cuerpo móvil (Abraham & Casillas, 2014).

- b) Deseccación: Este proceso tiene como objetivo la eliminación o evaporización del solvente que hayamos utilizado para el proceso de granulación, los granulados deben tener una humedad entre 2 y 3 % (Abraham & Casillas, 2014).
- c) Granulación final o tamización: el granulado una vez que se haya secado debe tamizarse para tener una uniformidad de partícula, esto se logra pasando la muestra por tamices (Abraham & Casillas, 2014)

1.5 Cápsulas

Las cápsulas son preparaciones sólidas que constan de dos piezas duras o suaves de gelatina, están diseñadas principalmente para su ingesta oral, estas cápsulas pueden estar rellenas de polvos, esferas, geles o líquidos (ANMAT, 2013).

La capacidad y tamaños de cápsula que son utilizados dentro de la industria farmacéutica, se colocan en la tabla 4.

Tabla 4

Tamaños de cápsula y su capacidad

Número de Cápsula	Capacidad promedio en mg	Capacidad en mL
000	1096	1,37
00	760	0,95
0	544	0,68
1	400	0,50
2	296	0,37
3	240	0,30
4	168	0,21
5	104	0,10

Fuente: (Varela & Musuña, 2020)

1.5.1 Control de calidad en cápsulas

Se lo efectúa en la materia prima, durante el proceso y al final en el producto terminado, en todos estos procesos se realizan pruebas organolépticas: olor, color, fisicoquímicas: densidad, sólidos totales y principalmente análisis microbiológicos como normas generales (Varela & Musuña, 2020).

1.5.2 Control microbiológico

El control microbiológico es uno de los principales análisis en cuanto a sustancias que van a ser ingeridas por el ser humano o cualquier tipo de ser vivo, las cápsulas son una de ellas ya que durante el proceso o ya en el producto terminado, microorganismos como bacterias, hongos o levaduras se adhieren a los mismos, lo que haría que estos productos pierdan calidad y en más importancia que puedan llegar a ser dañinos para el ser humano. Para el control de calidad en

formas farmacéuticas se han utilizado pruebas como son las MC-Media Pad y las placas Petrifilm, las cuales se utilizan para la cuantificación de hongos, levaduras, bacterias, coliformes y aerobios totales, estas pruebas son muy eficientes y rápidas, basan su funcionamiento en el color emitido por el crecimiento de las bacterias u hongos que se reflejan en las almohadillas (Cerra et al., 2013).

En la tabla 5 se muestran los colores específicos de acuerdo con la presencia de un microorganismo.

Tabla 5

Colores específicos para microorganismos en MC-Media Pad

Color	Microorganismo
Rojo	Aerobios totales
Azul-azul verdoso	Coliformes y <i>Escherichia coli</i>
Rojo	Levaduras y mohos
Azul-azul claro	<i>Staphylococcus aureus</i>

Nota: Tomado de Amaguaña & Churuchumbi (2018)

Elaborador por: El autor, 2020

1.6 Método de cuantificación

1.6.1 Espectrofotometría UV

Esta técnica se fundamenta principalmente en que las moléculas tienen una gran capacidad de absorber radiaciones, como las del espectro UV visible, por lo que es una de las que se utilizan con frecuencia para la determinación de biomoléculas (Sosa & López, 2004).

Esta técnica está basada en la ley de Lambert-Beer, que señala la relación que existe entre la captación de la luz y la concentración del cromóforo, esta expresa que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, la cual nos dice que cuando más cantidad de

moléculas haya estas van a tener más interacción con la luz (M. García, 2016; Sosa & López, 2004).

La absorbancia de la luz es captada en la región UV que comprende longitudes de onda que van desde los 195 a 400 nm, los compuestos que están comprendidos por enlaces triples, sistemas aromáticos y grupos carbonilos, tienen su máxima absorción dentro de este espectro de luz (Sosa & López, 2004).

Capítulo II

2. Marco metodológico

2.1 Localización

El estudio se realizó en los Laboratorios de Ciencia de la Vida ubicados en la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Girón, específicamente en los laboratorios de Química Instrumental.

2.2 Diseño experimental

Para los resultados de cafeína que se obtuvo tanto el extracto como en el granulado, se realizó una prueba T en la cual nos permitió comparar las dos medias obtenidas de los tratamientos.

Donde las variables independientes son las cápsulas y el extracto de *Ilex guayusa* y la variable dependiente el contenido de cafeína, para cada uno de estos se realizó una extracción por triplicado y que a su vez se midieron 3 veces, teniendo para el análisis 18 unidades experimentales 9 para el extracto y 9 para las cápsulas.

A continuación, en la tabla 6 se muestra el diseño experimental del trabajo.

Tabla 6

Cuadro de diseño experimental

Conc/Muestra	Extracto			Cápsulas		
Concentración	CEG11	CEG21	CEG31	CGC11	CGC21	CGC31
	CEG12	CEG22	CEG32	CGC12	CGC22	CGC32
	CEG13	CEG23	CEG33	CGC13	CGC23	CGC33

Nota: Conc= concentración

Elaborado por: El Autor, 2020.

2.3. Selección del material vegetal

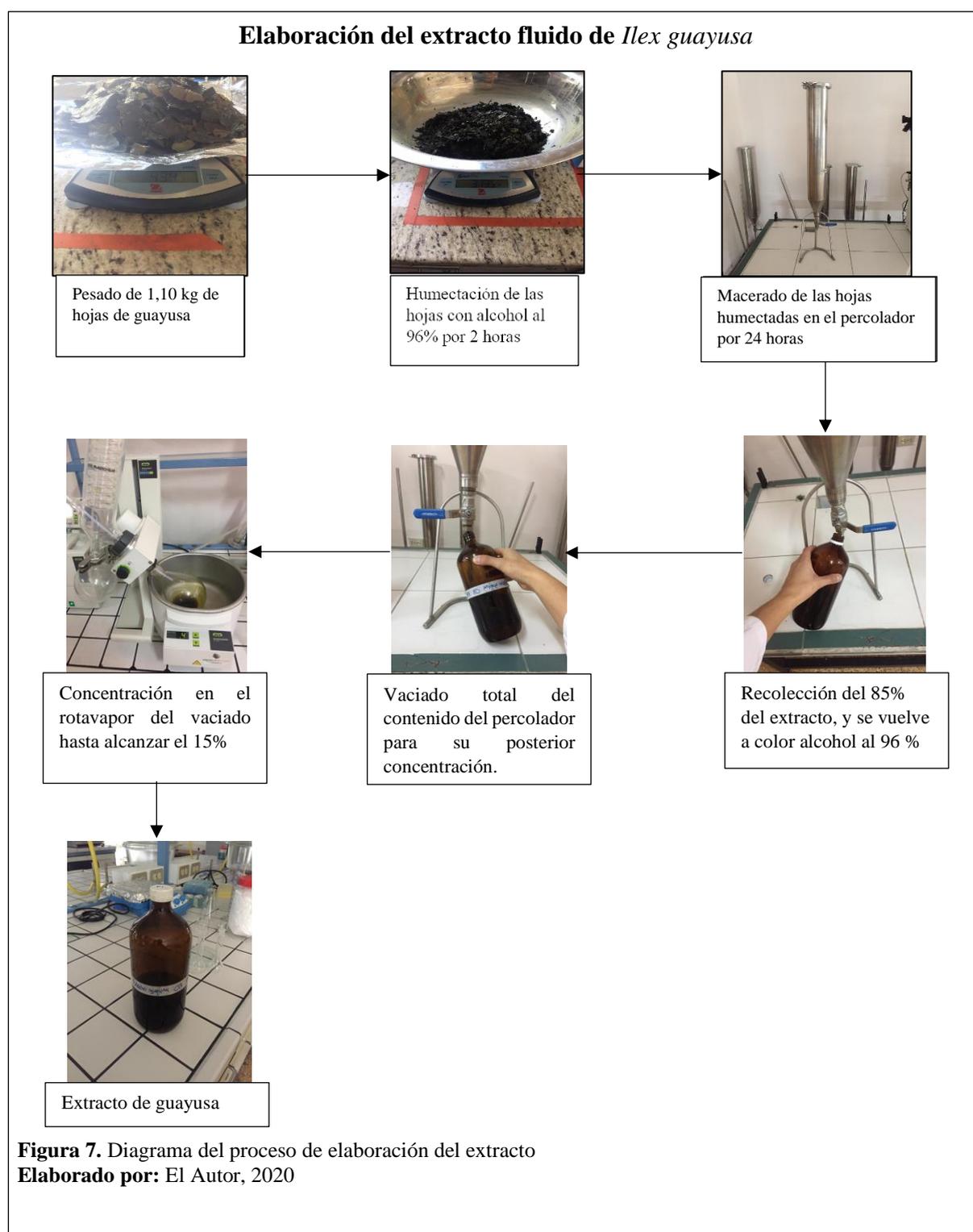
La adquisición de las hojas de guayusa se realizó en el mercado de Santa Clara, en total se adquirieron 2 kg de hojas para la investigación, las cuales se lavaron con agua corriente y posteriormente se enjuagaron con agua destilada.

2.4 Secado de las hojas

El secado de las hojas se lo realizó a una temperatura de 65 °C por 24 horas (Coronel, 2017), empleando una estufa marca Binder modelo BD 5.

2.5 Elaboración del extracto fluido

En la figura 3 se detalla el proceso de elaboración de extracto fluido.



Para la elaboración del extracto fluido se utilizó 1,10 kg de hojas secas de *Ilex guayusa*, las cuales fueron trituradas y humectadas con etanol al 96 % durante 2 horas.

Posteriormente las hojas humectadas se colocaron en un percolador, luego se agregó etanol al 96 % hasta que el líquido cubra una pulgada por encima del material vegetal.

Se dejó macerando por 24 horas, pasado ese tiempo se procedió a realizar la primera extracción que fue el 85 % del peso de material vegetal utilizado, el goteo mediante el cual se realizó la recolección de la primera fracción del extracto fue de 45 gotas por minuto.

Se vuelve a colocar alcohol hasta que cubra el material vegetal una pulgada (2,54 cm) por encima y se dejó macerar por 24 horas adicionales, pasado ese tiempo se descargó todo el extracto del percolador con el mismo goteo realizado en la primera extracción.

La segunda extracción se concentró en el rotavapor a una temperatura de 40 °C a 110 rpm hasta llegar al volumen equivalente al 15 % del volumen total del extracto.

2.5.1 Parámetros de calidad del extracto

Para los parámetros de calidad del extracto se realizó las siguientes pruebas:

Características organolépticas: en las cuales se evaluó olor, color basada en la utilización de la paleta de color verde y amarillo de Pantone (2020) e impurezas mediante el tamizado por papel filtro del extracto, también se evaluó el pH utilizando un pHmetro marca Mettler Toledo modelo S20 Seven Easy, para lo cual se tomó 5 mL de extracto de *Ilex guayusa* y se procedió a medir con el electrodo del equipo; este proceso se lo realizó por triplicado. A su vez, se cuantificó el índice de refracción mediante la utilización de un refractómetro, colocando una gota del extracto de *Ilex guayusa* en la cámara de medición para su posterior análisis por triplicado.

La densidad se la realizó mediante la utilización de un picnómetro de 5 mL y se evaluó con la siguiente ecuación:

Ecuación 1

Densidad en picnómetro

$$d = \frac{\text{Masa picnómetro con extracto} - \text{Masa picnómetro vacío}}{\text{Masa picnómetro con agua} - \text{Masa picnómetro vacío}} \times 1 \text{ g/mL}$$

Fuente: (Atarés, 2013)

Y por último para sólidos totales se colocó 20 mL de extracto fluido de *Ilex guayusa* en un crisol, se pesó y se procedió a secar a 105 °C durante 2 horas, cuando transcurrió ese tiempo se llevó el crisol a un desecador y se realizó la medición, esta prueba se la realizó por triplicado. Se evaluó siguiendo la siguiente ecuación:

Ecuación 2

Cálculo de sólidos totales

$$\text{Sólidos totales} = \frac{\text{Peso del crisol con muestra seca} - \text{peso del crisol vacío}}{\text{Volumen de la muestra}} \times 1000$$

Fuente: (Hernandez, 2007)

2.6 Formulación de las cápsulas

2.6.1 Granulado

Para la elaboración del granulado se utilizó como aglutinante almidón de maíz, los cálculos para la formulación de las cápsulas se hicieron en función de que se utilizarían cápsulas de tamaño número 1 que tienen una capacidad promedio de 400 mg y para elaborar un total de 1250 cápsulas.

En la tabla 7 se presenta las cantidades de aglutinante y extracto utilizadas para la formulación de las cápsulas.

Tabla 7

Cantidades para la formulación

Aglutinante (g)	Cápsulas en total	Extracto (mL)	Concentración (mg)
500	1250	250	250

Elaborado por: El Autor, 2020

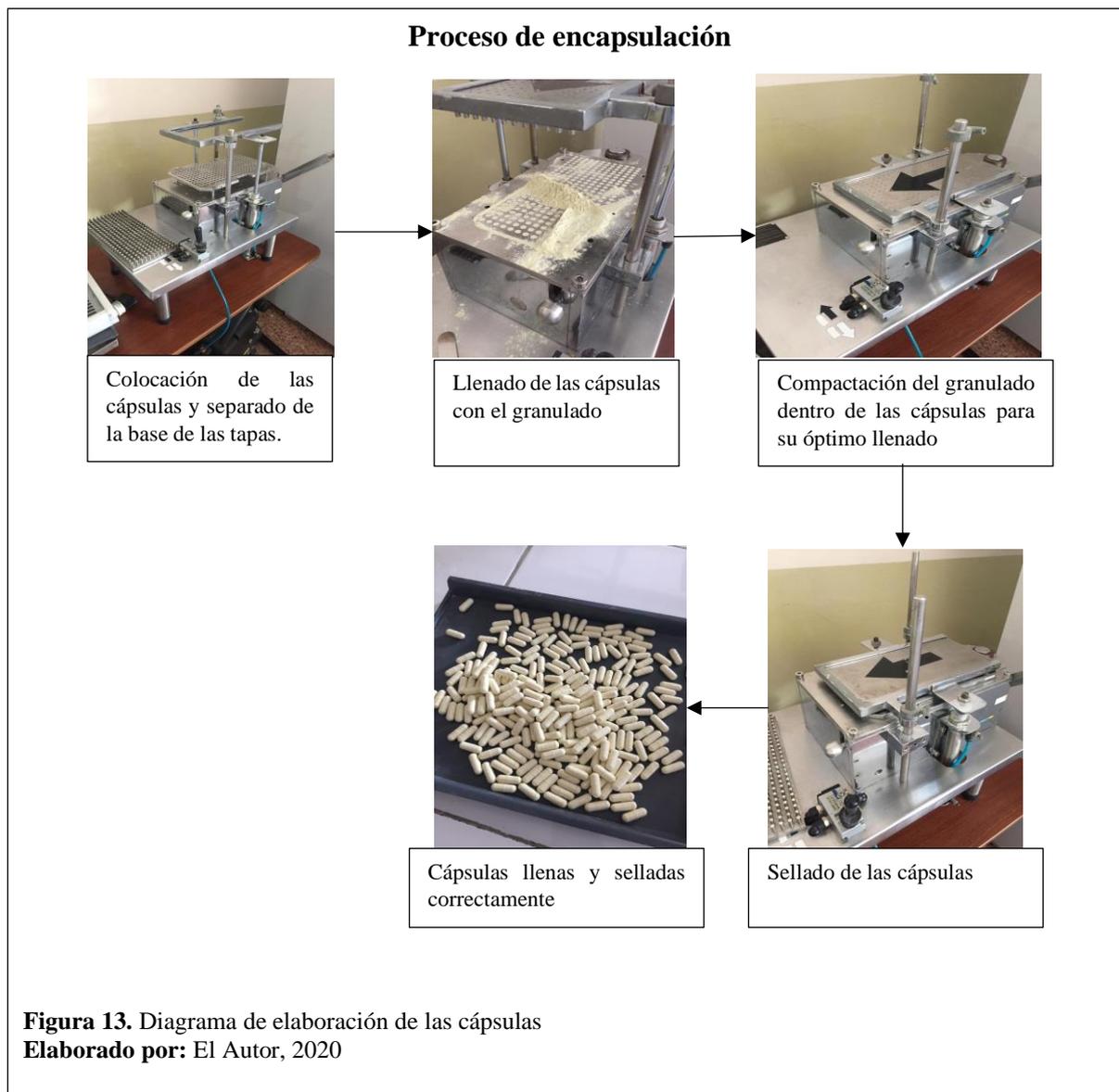
Para el proceso de elaboración del granulado se utilizó una batidora KitchenAid Classic Series 4.5 Quart, en la cual se agregó 500 gramos al almidón de maíz y se fue colocando gradualmente los 250 mL del extracto fluido, se mezcló alrededor de 30 min hasta obtener un color homogéneo en el granulado.

Posteriormente el granulado se puso a secar en una estufa a 70 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se tamizó por 3 mallas número 100, 120 y 140 para lograr un granulado uniforme, proceso detallado en la figura 4.



2.6.2 Proceso de encapsulamiento

Este proceso se realizó en una encapsuladora semiautomática, cuya marca y modelo no se tiene ya que es un proyecto entregado al laboratorio por parte de estudiantes de la universidad, su capacidad es de 300 cápsulas, el proceso se detalla en la figura 5.



2.6.3 Control de calidad de las cápsulas

Al igual que para el extracto se realizaron análisis organolépticos en los que se encuentran el olor, color basada en la utilización de la paleta de color verde y amarillo de Pantone (2020) y sabor.

Control de humedad

Se utilizó la técnica de pérdida por secado (LOD) la cual consistió en el pesado de un crisol vacío, luego se añadió 3 g de granulado utilizado en las cápsulas y se pesó el crisol con la muestra, posteriormente se colocó en la estufa a 105 °C por 24 horas, transcurrido ese tiempo

se colocó el crisol en un desecador para que se enfríe y se pesó, este proceso es establecido por la Farmacopea Argentina (ANMAT, 2013).

Este proceso está dado por la siguiente ecuación:

Ecuación 3

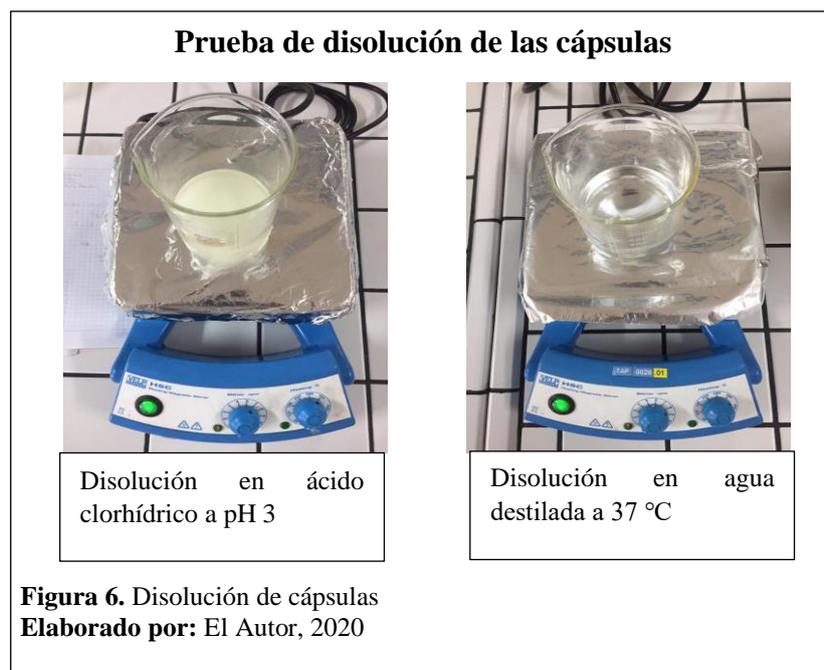
Cálculo del porcentaje de humedad

$$\% H = \frac{\text{Masa crisol con muestra húmeda} - \text{Masa crisol vacío}}{\text{Masa crisol con muestra seca}} \times 100$$

Fuente: (Martínez & Fernández, 2005)

Prueba de disolución

Para la prueba de disolución se utilizó ácido clorhídrico ajustado a un pH 3 imitando los jugos gástricos y agua destilada a 30 °C, se colocó en una plancha de calentamiento y agitación las dos soluciones y en ellas se colocó 5 cápsulas, la disolución debe darse entre 15 y 18 minutos.



Control microbiológico

Para el control microbiológico de las cápsulas se realizó mediante la utilización de MC-Media Pad para aerobios totales, *Escherichia coli* y mohos y levaduras, cada una de estas pruebas se realizó por triplicado.

Para el análisis se utilizó 25 cápsulas equivalentes a 10 g y se colocó en 90 mL de agua peptonada bufferada, esta solución se la llevó a agitación hasta que las cápsulas se disuelvan por completo, luego de transcurrido ese tiempo se colocó 1 mL de la disolución en cada almohadilla, posteriormente se llevó a incubar durante 24 horas a 37 °C los aerobios totales y *Escherichia coli* y a 28 °C mohos y levaduras, cada una de estas pruebas se realizaron por triplicado.

A continuación, en la figura 7 se detalla el procedimiento del control microbiológico de las cápsulas.

Proceso de control microbiológico en cápsulas



Colocación de los 10 g de las cápsulas en los 90 mL de buffer de agua peptonada, por triplicado



Agitación de las muestras por 60 minutos



Colocación de 1 mL de muestra en las 12 pruebas MC- Media Pad



Incubación por 24 horas de pruebas de Aerobios totales y *E. coli* a 37 °C



Incubación por 24 horas de la prueba de hongos y levaduras a 28 °C.

Figura 7. Control microbiológico
Elaborado por: El Autor, 2020

2.7 Cuantificación de la cafeína

2.7.1 Curva de calibración

Para esto se realizó una solución de 5000 ppm de cafeína a partir de la cual se realizó 6 diluciones para obtener estándares de 10, 20, 30, 40, 50 ppm y se procedió a medir en el espectrofotómetro de la marca JASCO modelo V-750 a una longitud de onda de 274 nm.

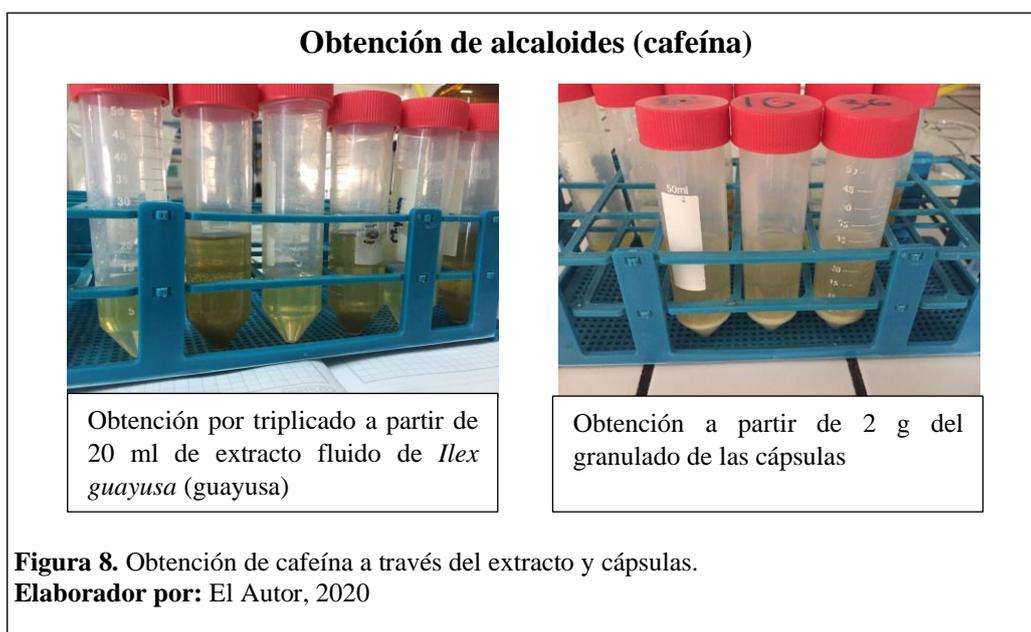
2.7.2 Cuantificación de cafeína en el extracto y cápsulas

Para la cuantificación de la cafeína las lecturas se realizaron a 274 nm.

Para la cuantificación en el extracto se siguió la metodología empleada para la extracción y cuantificación de alcaloides totales descrito por Harborne y replicado por Agatemor (2014) la cual consistió en colocar 2 mL del extracto en un tubo Eppendorf con 10 mL de ácido sulfúrico al 20 % y 10 mL de alcohol etílico y se dejó macerar durante 1 hora, luego se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm: 1 mL del sobrenadante se transfirió a tres tubos que contenían 5 mL de ácido sulfúrico al 60 % y 5 mL de formaldehído al 0,5 %, se dejó reposar por 3 horas y se midió en el espectrofotómetro.

Para la cuantificación en el granulado se realizó el procedimiento anteriormente mencionado partiendo de 2 g de este. Cada uno de estos procesos, tanto el extracto como el granulado, se cuantificó por triplicado.

En la figura 8 se muestra los tubos con la extracción de cafeína realizada con la técnica descrita



Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1 Extracto de *Ilex guayusa*.

Presentó las siguientes características organolépticas: color verde, con olor característico a guayusa.

A continuación, en la tabla 8 se presenta los resultados del control de calidad del extracto elaborado cada parámetro evaluado por triplicado.

Tabla 8

Control de calidad extracto fluido de *Ilex guayusa*

	Parámetros evaluados		
	pH	Densidad mg/mL	Índice de refracción
Muestra 1	5,71	0,87	1,37
Muestra 2	5,70	0,87	1,37
Muestra 3	5,70	0,87	1,37
Promedio	5,70	0,87	1,37

Elaborado por: El Autor, 2020.

El pH fue ácido con un valor de 5,70 mayor al obtenido por Carpintero & Salazar (2014) que presentan un pH de 5,50, en cuanto al índice de refracción se presentó un valor promedio de 1,379 que nos indica que estamos en presencia del alcohol etílico ya que su índice de refracción se encuentra entre 1,36 y 1,37 y la densidad promedio fue de 0,87 g/mL menor a la obtenida por Carpintero & Salazar (2014) con un valor de 1,01 g/mL.

En la tabla 9 se presenta el promedio que se obtuvo de sólidos totales en el extracto de *Ilex guayusa*.

Tabla 9

Sólidos totales

Muestra	ST mg/mL
1	28,80
2	38,25
3	35,96
Promedio	34,34

Elaborado por: El Autor, 2020

Para los sólidos totales se obtuvo un valor promedio de 34,34 mg/mL el cual está en los valores establecidos por la ANMAT (2013) ya que a mayor cantidad de sólidos totales disueltos existe mayor cantidad de activos presentes y con un valor promedio menor al obtenido por Varela & Musuña (2020) que fue de 4,44 g/L.

3.2 Granulado

El granulado presenta las siguientes características organolépticas: color amarillo, olor a guayusa, sabor a guayusa y almidón de maíz, para el porcentaje de humedad se obtuvo un promedio de 8,98 %, menor al obtenido por Varela & Musuña (2020) que presenta un valor de humedad promedio de 11,10 %, esta se encuentra dentro de los parámetros ideales ya que para granulados se debe tener un 15 % de humedad como máximo (ANMAT, 2013).

En la tabla 10 se presenta el contenido de humedad promedio del granulado.

Tabla 10

Porcentaje de humedad del granulado

Muestra	Humedad
1	8,84
2	9,29
3	8,82
Promedio	8,98

Elaborado por: El Autor, 2020

3.3 Cápsulas

Se realizó un total de 1250 cápsulas de gelatina dura número 1, de color transparente tanto la tapa como la base, la formulación se realizó en base a 250 mg que fue la concentración del extracto, dándonos una fórmula farmacéutica presentada en la tabla 11:

Tabla 11.

Fórmula farmacéutica de las cápsulas de extracto fluido de *Ilex guayusa*

Ingredientes	Contenido
Extracto de <i>Ilex guayusa</i> (guayusa).	250 µL
Excipientes	Csp para 500 mg

Nota: csp, hace referencia a la cantidad necesaria de excipientes para completar el peso de cada cápsula

Elaborado por: El Autor, 2020

En la tabla 12 se muestra ara la prueba de longitud de cápsulas se dieron los siguientes resultados:

Tabla 12

Longitud promedio de las cápsulas

Cápsula	Longitud mm	Promedio mm
1	18,70	18,70
2	18,70	
3	18,70	
4	18,70	
5	18,70	
6	18,70	
7	18,70	
8	18,70	
9	18,70	
10	18,70	
11	18,70	
12	18,70	
13	18,70	
14	18,70	
15	18,70	
16	18,70	
17	18,70	
18	18,70	
19	18,70	
20	18,70	
21	18,70	
22	18,70	
23	18,70	
24	18,70	
25	18,70	
26	18,70	
27	18,70	
28	18,70	
29	18,70	
30	18,70	

Elaborado por: El Autor, 2020

Como se puede observar en el cuadro, la longitud de las cápsulas no varió en ninguna de las 30 muestras tomadas para el análisis con una longitud promedio de 18,70 mm.

En la tabla 13 se presenta los pesos de las 30 capsulas tomadas para el ensayo.

Tabla 13

Peso promedio de las cápsulas

Cápsula	Peso mg	Promedio mg	Límite Superior 10%	Límite inferior - 10%
1	374,61	398,03	437,83	358,23
2	375,72			
3	377,10			
4	378,30			
5	385,40			
6	385,60			
7	388,10			
8	388,80			
9	389,70			
10	389,80			
11	390,50			
12	394,30			
13	394,40			
14	394,50			
15	394,90			
16	395,50			
17	398,50			
18	401,80			
19	402,60			
20	403,30			
21	403,70			
22	404,30			
23	407,20			
24	407,70			
25	408,10			
26	412,80			
27	414,30			
28	415,40			
29	428,40			
30	436,60			

Elaborado por: El Autor, 2020.

En cuanto al peso de las cápsulas se registraron variables del mismo con un peso promedio de 398,03 mg, según el ensayo del peso medio bruto el límite superior e inferior están dados por

el $\pm 10\%$ del peso promedio, el ensayo resulta satisfactorio cuando el peso de todas las muestras tomadas se encuentra dentro de esos límites (ANMAT, 2013), por lo que el ensayo del trabajo cumplió con esos parámetros.

El ensayo de disolución de la capsula se logró durante el tiempo estipulado de máximo 30 minutos (Rica & López, 2015) con tiempos por triplicado de 16, 16 y 17 minutos en el ácido clorhídrico y de 20 minutos en los 3 casos del agua destilada a 30 °C.

Para el ensayo microbiológico de las cápsulas se dieron los siguientes resultados presentados en la tabla 14:

Tabla 14

Control microbiológico de las cápsulas

	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	AT	ML	AT	AT	ML	AT	ML	AT	ML
UFC/mL	28	0	0	22	0	0	33	0	0

Nota: UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro, AT: aerobios totales, ML: mohos y levaduras.

Elaborado por: El Autor, 2020

Como se puede observar en el cuadro después de las 24 horas de incubación existió crecimiento en la prueba de Aerobios totales, los resultados están en los términos aceptables ya que para esta prueba el valor máximo de aceptación es de 10^3 UFC/mL (Cerra et al., 2013), en cuanto a *Escherichia coli* no debe existir presencia de ésta al igual que coliformes, por otro lado para mohos y levaduras el límite permisible es de 10^2 UFC/mL (Cerra et al., 2013). Para *Escherichia coli* y mohos y levaduras no se presentó crecimiento.

A continuación, en la figura 9 se puede observar las pruebas microbiológicas para los tres tipos de microorganismos analizados.

Análisis Microbiológico



Figura 9. MC- MediaPad, **amarillo:** aerobios totales, **azul:** *Escherichia coli*, **verde:** mohos y levaduras
Elaborador por: El Autor, 2020

3.4 Cuantificación de cafeína por medio de Espectrofotetría UV

3.4.1 Curva de calibración

Se obtuvo los siguientes resultados para absorbancia, la misma que sirvió para interpolar y obtener la concentración de cafeína en el extracto y en las cápsulas, los valores obtenidos se presentan en la tabla 15.

Tabla 15

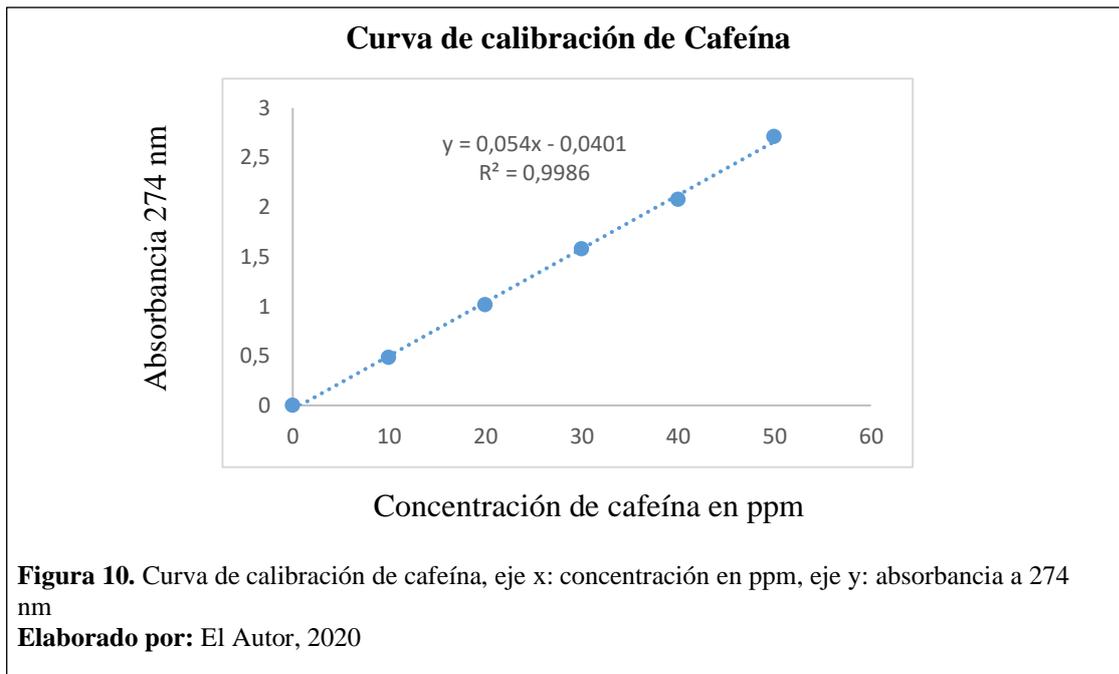
Valores de absorbancia

Concentración en ppm	Absorbancia 274 nm
0	0
10	0,48
20	1,01
30	1,57
40	2,07
50	2,71

Nota: Se realizó 5 estándares de 0 a 50 ppm de cafeína.

Elaborado por: El Autor, 2020

A partir de los datos obtenidos se realizó la curva de calibración de la cafeína



3.4.2 Datos de cafeína obtenidos a partir de espectrofotometría.

A continuación en la tabla 16 y 17 se presentan los valores de concentración de cafeína en el extracto fluido y en el granulado utilizado en las cápsulas respectivamente.

Tabla 16Cafeína presente en el extracto fluido de *Ilex guayusa*

Extracto	Concentración mg/mL
1EX1	0,12
1EX2	0,12
1EX3	0,13
2EX1	0,10
2EX2	0,09
2EX3	0,09
3EX1	0,13
3EX2	0,13
3EX3	0,13
Promedio	0,12
Desvest	0,02
Límite superior	0,13
Límite inferior	0,10

Nota: desvest= desviación estándar, en la columna extractos se sigue una nomenclatura el primer número hace referencia a la extracción y el segundo número hace referencia a la repetición de la extracción, cada una por triplicado.

Elaborado por: El Autor, 2020.

Tabla 17Cafeína presente en el granulado de las cápsulas de *Ilex guayusa*.

Granulado	Concentración mg/mL
1G1	0,04
1G2	0,04
1G3	0,05
2G1	0,05
2G2	0,05
2G3	0,04
3G1	0,03
3G2	0,04
3G3	0,04
Promedio	0,04
Desvest	0,01
Límite Superior	0,05
Límite inferior	0,03

Nota: desvest= desviación estándar, en la columna granulado se sigue una nomenclatura el primer número hace referencia a la extracción y el segundo número hace referencia a la repetición de la extracción, cada una por triplicado.

Elaborado por: El Autor, 2020.

Como se puede ver en la tabla 16 de la concentración de cafeína en el extracto se obtuvo un promedio de las 3 extracciones evaluadas por triplicado de $0,12 \pm 0,01$ mg/mL y para la concentración de cafeína en el granulado mostrada en la tabla 17 se obtuvo un promedio de igual manera de las 3 extracciones medidas por triplicado de $0,04 \pm 0,08$ mg/mL, dichos resultados consolidan que la elección del método espectrofotométrico para la cuantificación de cafeína es valedero, amparados de igual manera en el estudio realizado por Calle (2009) y Amezcua, Blanco, Ríos, & Macías (2018) en el cual la cuantificación de cafeína se la realiza por medio de esta técnica, por lo que este método de análisis puede permitir a empresas farmacéuticas pequeñas, que debido a presupuestos no pueden realizar análisis de cuantificación que conlleven grandes costos, tener una nueva alternativa para la cuantificación de este principio activo y realizar un producto de calidad.

A partir de los resultados de la concentración en el granulado se pudo obtener la concentración de cafeína en cada cápsula, la cual fue de 0,01 mg, según Tavares & Kimiko (2012) la concentración terapéutica de la cafeína va de 100 a 1000 $\mu\text{mol/L}$, utilizando la menor concentración de 100 $\mu\text{mol/L}$ se tiene una concentración de 0,01 mg/mL, en 250 μL , cantidad de extracto de *Ilex guayusa* que tiene cada cápsula formulada, se tendría 0,01 mg de cafeína, las cápsulas tienen una concentración promedio de 0,01 mg por lo que se logró llegar a la concentración para el efecto farmacológico.

En la tabla 18 se presenta la estadística de los resultados alcanzados.

Tabla 18

Análisis estadístico de los datos

	Extracto	Granulado
N	9	9
Media	0,12	0,05
Varianza	0,0032	0,0056
p-valor	< 0,0001	

Nota: En este cuadro se muestra una Prueba T obtenida mediante el programa Infostat.

Elaborado por: Infostat y El Autor, 2020.

De acuerdo con los datos obtenidos mediante la estadística con una confianza del 95 % se obtuvo un *p-valor* de <0,0001 lo que nos dice que hay diferencia que en estadística es significativa entre los dos promedios por lo que se aprueba la hipótesis negativa dado que la concentración de cafeína no se mantiene en el extracto y en el granulado para la elaboración de las cápsulas.

Según Ochoa, Igartua, Hernández, Gascón, & Pedraz (2006) la granulación presenta algunos inconvenientes como es la pérdida de estabilidad de principio activo debido a la exposición al calor o tiempos de secado muy prolongados, a partir de esta esto se puede atribuir a uno de estos factores la diferencia que existe entre el extracto y el granulado en cuanto a la concentración de cafeína.

Conclusiones

Mediante los ensayos de los parámetros de calidad en el extracto fluido, conforme a la Farmacopea Argentina Séptima Edición, la cual establece análisis organolépticos y fisicoquímicos para extractos vegetales, y a revisiones bibliográficas en las que se obtienen resultados similares a los logrados en este trabajo experimental, se concluye que los valores de factores como densidad, pH y sólidos totales coinciden con otras investigaciones que trabajan con extracto fluido de *Ilex guayusa*.

En la elaboración del granulado la Farmacopea Argentina indica que el porcentaje de humedad que el valor máximo para un granulado debe ser menor o igual al 15 %, este es el punto crítico, porque determina la estabilidad del producto formulado. A partir de los resultados obtenidos de esta prueba se confirma que la humedad se encuentra en el parámetro establecido con el procedimiento seguido.

En cuanto al control microbiológico, la Farmacopea Argentina establece que los límites permisibles para microorganismos aerobios son de 10^3 UFC/mL, para mohos y levaduras 10^2 UPML/mL y la ausencia de *Escherichia coli*, mediante los valores que se obtuvieron en el trabajo se concluye que las cápsulas cumplen con los parámetros establecidos.

En cuanto a la concentración de cafeína, en las cápsulas no se llegó a la concentración establecida en formulación, esto se debe al proceso de granulación húmeda específicamente en el secado ya que conforme a revisiones bibliográficas se menciona que el sometimiento a tiempos prolongados de secado o temperaturas altas hacen que el principio activo pierda estabilidad, por lo cual se tendría que realizar otro diseño de producto farmacéutico que podría ser una tintura.

En el extracto fluido de *Ilex guayusa* se obtuvo un valor de cafeína de 0,12 mg, el cual se tomará como referencia ya que no existen trabajos en cuanto a la cuantificación de cafeína en extracto fluido mediante la técnica de Espectrofotometría UV.

Entre la concentración de cafeína del extracto fluido y el granulado utilizado para las cápsulas propuestas, existe una diferencia de 0,07 mg, la cual es estadísticamente significativa y haría válida la hipótesis nula de la investigación.

Recomendaciones

Cuantificar otros principios activos de la guayusa en las cápsulas, como son: la teobromina y la teofilina ya que son activos de importancia en esta planta.

Determinar el período balsámico de la cafeína en la guayusa para determinar la mejor época de recolección con miras a la obtención de productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios a partir de *Ilex guayusa*.

Cuantificar la cafeína por medio de HPLC, ya que al estar el equipo en reparación y en la cuarentena por el COVID se recurrió a un análisis espectrofotométrico que estaba a nuestro alcance en el laboratorio de Ciencias de la Vida, a la vez que se sugiere seguir un programa de mantenimiento anual de los equipos.

Referencias

- Abraham, C., & Casillas, D. (2014). "Elaboración de un vídeo para la operación unitaria de granulación." *Tesis*, 137. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_abraham_resendiz.pdf
- Agatemor, M.-M. U. (2014). *Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Effects of the Homogenate of Cucumis sativus fruits*. Retrieved from <https://oer.unn.edu.ng/read/anti-inflammatory-and-hepatoprotective-effects-of-the-homogenate-of-cucumis-sativus-cucumber-fruits>
- Amaguaña, F., & Churuchumbi, E. (2018). Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). *Tesis*, 1–57. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Amezquita, K., Blanco, A., Rios, N., & Macías, M. (2018). Extracción, caracterización y cuantificación de cafeína en bebidas energéticas más populares de México, y su consumo por estudiantes del CUCEI de la Universidad de Guadalajara Extraction, characterization and quantification of caffeine in the most popular. *Septiembre*, 4(13), 13–18. Retrieved from www.ecorfan.org/spain
- ANMAT. (2013). Farmacopea Argentina Septima Edición. *Journal of Pharmacy Practice*, 30(3), 385. <https://doi.org/10.1177/0897190017699760>
- Arias, B. (2009). Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 389–401. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/856/85611977005.pdf>
- Arias, R., & Gualli, A. (2013). *Estudio Comparativo del Té de la especie (Ilex guayusa) procedente dela Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del*

Tungurahua.”

Retrieved

from

<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/30805/D-79842.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

Atarés, L. (2013). Determinación de la densidad de sólidos y líquidos. *Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia*, 5. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12655/11>. Artículo docente. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro.pdf?sequence=1

Bagde, A., Sawant, R., Sawai, R., Muley, S., & Dhimdhime, R. (2018). *Charak samhita-complete encyclopedia of ayurvedic science*. (January 2013). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/323834769_Charak_Samhita-Complete_Encyclopedia_of_Ayurvedic_Science

Bhattacharya, R. D., Parmar, K. M., Itankar, P. R., & Prasad, S. K. (2017). Phytochemical and pharmacological evaluation of organic and non-organic cultivated nutritional *Centella asiatica* collected after different time intervals of harvesting. *South African Journal of Botany*, 112, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.06.003>

Calle, S. (2009). Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. *Oftalmología (Bucharest, Romania : 1990)*, 53(4), 10–12.

Carpintero, N., & Salazar, M. E. (2014). *Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto alcohólico foliar de Guayusa, Ilex guayusa Loes (AQUIFOLIACEAE)*. Retrieved

from

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7358/1/QT06124.pdf>

Carrion, A., & Garcia, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>

- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., ... Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*. Retrieved from <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
- Cobo, C. (2016). *Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal in vitro en proteínas de hoja de Ilex guayusa*. Retrieved from <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24099/1/AL615.pdf>
- Coronel, G. (2017). Determinacion del contenido de cafeína en infusiones de Hoja de Guayusa (Ilex guayusa) Bajo dos condiciones de secado. *Trabajo de Titulación Presentado En Conformidad Con Los Requisitos Establecidos Para Optar Por El Título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos*, 523, 78. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8381>
- Crespo, P. L. (2018). *Determinación indirecta del contenido de cafeína en el cultivo de guayusa (Ilex guayusa), mediante el NDVI*. Trabajo. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14258/1/T-UCE-0004-A59-2018.pdf>
- Dayami, D., Cano, S., Camilo, L., Bestard, M., Pereira, D. E., Yasmín, L., ... Guzmán, G. (2016). *Farmacología de las plantas medicinales*. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/5517/551757317013.pdf>
- EFSA. (2014). La cafeína ¿ Qué es la cafeína ? ¿ Por qué ha realizado EFSA la evaluación de riesgos ? *European Food Safety Authority*. Retrieved from https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/efsaexplainscaffeine150527es.pdf
- Ekor, M. (2014). *The growing use of herbal medicines : issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety*. 4(January), 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>

Flores, E. (2010). *Evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento en la capacidad aglutinante de dos tipos de almidones para la formulación de comprimidos orales*. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2992.pdf

Gamboa, F., Muñoz, C., Numpaque, G., Sequeda-castañeda, L. G., Gutierrez, S. J., & Tellez, N. (2018). *Antimicrobial Activity of Piper marginatum Jacq and Ilex guayusa Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease*. 2018. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2018/4147383/>

García, B. H., Miguel, J., Martínez, H., Izquierdo, A., Experimental, E., Vivero, F., ... P, P. R. C. (2016). *Influencia del momento de recolección en el algunos parámetros biológicos y el rendimiento de la variedad 'corajo 2006' cultivada bajo tela*. Retrieved from <http://ediciones.inca.edu.cu/files/congresos/2010/CDMemorias/memorias/ponencias/talleres/AES/rc/AES-P.48.pdf>

García, M. (2016). *Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIIS)*. 1–38. Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/68318/secme-1814.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Guerra, E. A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (Phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. *Universidad De San Carlos De Guatemala*, 1(1), 55–60. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf

Hernandez, A. M. (2007). *Sólidos Suspendedos Totales En Agua Secados a 103 – 105 °c*. *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM)*, 1(3), 2–7. Retrieved from

<http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Sólidos+Suspendidos+Totales+en+aguas.pdf/f02b4c7f-5b8b-4b0a-803a-1958aac1179c>

Hernández, I. M., Guerrero, I. T. L. B., K, I. I. G., Valarezo, F., Mercedes, I. I. I., Fernández, C., & Gladys, I. C. (2017). *Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie Moringa Oleífera lam cosechada en Machala*. 22(1), 1–13. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100013

Hernando, B. (2007). *Libro blanco de los herbolarios y las plantas medicinales*. Retrieved from <https://www.fitoterapia.net/archivos/200701/260307libro-2.pdf?1>

Kapp, R. W., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R. S., & Kraska, R. (2016). General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology*, 35(2), 222–242. <https://doi.org/10.1177/1091581815625594>

Lozano, R., Alvarez, Y., Tafalla, D., & Farré, M. (2007). Cafeína Un nutriente, un fármaco o una droga. *Adicciones*, 19(3). Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/2891/289122084002/%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/2891/289122084002.pdf>

Martínez, E., & Fernández, I. (2005). Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. *Universidad Politécnica de Valencia*. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinación de humedad.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinación%20de%20humedad.pdf)

Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la especie Ilex guayusa Loes*. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3269/1/000110421.pdf>

Ochoa, L., Igartua, M., Hernández, R., Gascón, A., & Pedraz, J. (2006). Melt Granulation in High Shear Mixer. *Vitae*, 13(1), 40–47. Retrieved from

<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n1/v13n1a06.pdf>

- Pardau, M. D., Pereira, A. S. P., Apostolides, Z., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* teas. *Food and Function*, 8(12), 4601–4610. <https://doi.org/10.1039/C7FO01067B>
- Pardo, J. (2002). *Patentabilidad de los extractos vegetales*. 40. Retrieved from http://www.ub.edu/centredepats/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
- Radice, M., & Vidari, G. (2005). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes . y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial*. (Figura 1), 3–11. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047390002.pdf>
- Rica, U. D. C., & López, P. (2015). Prueba De Disolución “in Vitro” De Tabletas De Acetaminofén, Cuantificando En Hplc Con Detector Electroquímico. *InterSedes: Revista de Las Sedes Regionales*, XVI(33), 26–37.
- Rocha, M. R., & García, G. M. (2018). Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa (*Ilex guayusa*). *Tesis, I*(Determinar el contenido de cafeína entre individuos de un cultivo comercial de guayusa.), 70. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14259>
- Sanchez, M. (2015). El café, la cafeína y su relación con la salud y ciertas patologías. 2016, 200. Retrieved from <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/14253/1/TFG-M-N370.pdf>
- Schuster, J., & Mitchell, E. S. (2019). More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 89(March 2018), 263–274.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.09.005>

Sosa, I., & López, J. (2004). *Espectrofotometría de absorción*. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf

Tamayo, E. (2017). *Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en la extracción etanólica del polvo de hojas de guayusa (Ilex guayusa loes) deshidratada*. Retrieved from http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/16677/68747_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Tavares, C., & Kimiko, R. (2012). Cafeína para el Tratamiento del Dolor. *Rev Bras Anesthesiol ARTÍCULOS DE REVISIÓN Revista Brasileira de Anestesiologia*, 62(3), 387–401.

Tuquinga, M. (2013). *Efecto estrogénico del extracto de las hojas de guayusa (ilex guayusa loes) en ratas (rattus novergicus)*. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2573/1/56T00340.pdf>

Varela, S., & Musuña, G. (2020). Evaluación de la eficacia antimicrobiana in vitro de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum kunth* (mortiño); en infecciones agudas del tracto urinario. *Tesis*, 1–100. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Wise, G., & Negrin, A. (2019). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa : a stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>

Yacelga, K. (2017). *Elaboración de una bebida energizante a partir de guayusa, pitahaya, frambuesa, jackfruit, mora y uva verde edulcorada con estevia*. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12655/1/T-UCE-0017-0047-2017.pdf>