



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Elaboración y caracterización de un granulado a partir del
extracto seco de la planta Amazónica *Ilex guayusa***

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Autor: Molina González, Karol Stefanía

Director: Espinoza Tituana, Lupe Carolina.

LOJA
2022



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2022

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 06 de septiembre del 2022

Bioquímica Farmacéutica

Cruz Erazo Claudia Teresa, Mgtr.

Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia

Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Elaboración de un granulado a partir del extracto seco de la planta Amazónica *Ilex guayusa* realizado por Nombres y Apellidos completos del autor o autores (as) ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Espinoza Tituana , Lupe Carolina. Mgtr.

C.I.:1104468440

Correo electrónico: icespinosa@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Karol Stefanía Molina González, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Titulación denominado: Elaboración de un granulado a partir del extracto seco de la planta Amazónica *Ilex guayusa*, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico Elaboración de un granulado a partir del extracto seco de la planta Amazónica *Ilex guayusa*, Capítulo 2. Evidencia empírica. Metodología de la investigación, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Espinoza Tituana Lupe Carolina Mgtr, director (a) del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Molina González, Karol

C.I.:0705970663

Correo electrónico: ksmolina@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Agradezco a Dios y a la Virgen María por haberme otorgado una familia maravillosa y bendecida, quienes durante mis 26 años de vida han creído en mí y en mi potencial, dándome siempre el ejemplo de superación, humildad y sacrificio, enseñándome a valorar mi entorno y todo aquello que me rodea. A ellos dedico este presente trabajo porque han inculcado en mis deseos de lucha y superación personal. Por ello han contribuido a la obtención de este logro más, como lo es mi título universitario. Espero contar hasta el último de mis días con su valioso respeto, tiempo y apoyo incondicional

A todos mis amigos les doy mi más sincero agradecimiento por estar allí en los momentos más difíciles de mi existencia, me es muy grato tenerlos en mi vida presente en mi mente y en mi corazón.

Besos

Karol Molina

Agradecimientos

Todos nuestros sueños se pueden volver realidad si tenemos el coraje de perseguirlos.

Walt Disney

El principal agradecimiento es a Dios, porque sabe en qué momento entregar las cosas que pedimos en oración, siempre me ha guiado y me han dado la fortaleza para seguir adelante pese a mis 2 años enferma siempre está allí para prestarme su hombro para llorar y decirme 'hija estoy aquí para ti, no pierdas la esperanza porque la fe y el amor es último que se pierde', gracias al cielo sigo luchando por mi vida y batallando día a día por estar mejor.

La verdadera educación consiste en obtener lo mejor de uno mismo (Mahatma Gandhi), La UTPL me dio la bienvenida hace más de 6 años a un mundo completamente diferente, rodeado de personas con gran conocimiento y coeficiente intelectual elevado, me dio la oportunidad de ser parte de su comunidad, a Lupe, Santiago y Vladimir les tengo un aprecio y amor infinito por ayudarme a plasmar mis locuras que una vez dije; un fuerte abrazo de aquí al infinito

"Vive como si fueses a morir mañana. Aprende como si fueses a vivir siempre. Mahatma Gandhi"

Índice de contenidos

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de Contenido.....	VII
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
(Marco Teórico).....	5
<u>1.1 Plantas medicinales</u>	5
1.2 Ilexguayusa	6
1.2.1 Generalidades.....	6
1.3 Taxonomía ubicación geográfica.....	6
1.4 Características Botánicas... ..	8
1.5 Composición química aplicaciones terapéuticas.....	8
1.5.1 Cafeína	9
1.5.2 Antioxidantes... ..	10
1.6 Importancia económica	14
1.7 Extractos de plantas	15
1.7.1 Método extracción	15
1.8 Fitomedicamentos	15
1.9 Formafarmacéutica.....	15

1.9.1 Formas sólidas.....	15
1.9.2 Granulados... ..	15
1.9.3 Tipos granulados.	15
1.9.4 Granulación vía húmeda	16
1.9.5 Granulación vía seca.....	16
1.10 Desarrollo de la forma farmacéutica	17
1.10.1 Preformulación de medicamentos.....	17
1.10.2 Compatibilidad con excipientes	17
Capítulo 2.....	19
(Metodología).....	19
2.1 Área de recolección de materia vegetal.....	19
2.2 Procesamiento pos cosecha	19
2.3 Triturado y tamizado de material vegetal.....	19
2.4 Análisis físico químico método gravimétrico	20
2.4.1 Determinación de humedad.....	20
2.4.2 Determinación de cenizas totales	21
2.4.3 Cenizas solubles en agua	21
2.4.4 Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	22
2.5 Extracción de cafeína de las hojas de guayusa.....	22
2.6 Liofilización del extracto.....	23
2.7 Control de calidad del extracto.....	23
2.7.1 Análisis organoléptico del extracto	23
2.7.2 Análisis físicoquímico del extracto	24
2.7.3 Valoración del API.....	24
2.7.3.1 Espectrofotometría UV-vis	24
2.7.3.2 HPLC.....	25
2.8 Estudios de preformulación.....	25
2.8.1 Ensayos de solubilidad.....	25

2.8.1.1 Solubilidad entre excipiente	25
2.8.2 Diseño factorial	26
2.8.2.1 Composición de las mezclas.	26
2.9 Formulación.....	27
2.9.1 Elaboración del granulado farmacéutico.....	27
2.9.2 Proceso de fabricación	27
2.9.3 Control de calidad del producto terminado.....	30
2.9.3.1 Evaluaciones organolépticas	30
Capítulo 3	31
Resultados y Discusión	31
3.1 Caracterización de las hojas de Ilex guayusa.....	31
3.1.1 Observación macroscópica	31
3.1.2 Análisis de la materia vegetal recolectada	31
3.2 Extracto liofilizado.....	32
3.3.1 Control de calidad del extracto liofilizado.....	34
3.3.2 Valoración del principio activo	34
3.4 Preformulación	37
3.4.1 Ensayos de solubilidad	37
3.5 Formulación	40
3.5.1 Control de calidad del producto terminado.....	41
3.5.1.1 Evaluación físico química del producto.....	41
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	44
Referencias	45

Índice de tablas

Tabla 1	Tabla de la taxonomía de Ilex guayusa.....	7
Tabla 2	Tabla de la clasificación de antioxidantes.....	12
Tabla 3	Tabla de los antioxidantes.....	12
Tabla 4	Tabla de la Valoración de las propiedades organolépticas.....	25
Tabla 5	Valoración solubilidad de excipientes.....	26
Tabla 6	Componentes del diseño factorial.....	26
Tabla 7	Diseño factorial.....	26
Tabla 8	Fórmula final.....	32
Tabla 9	Análisis físico químico del material vegetal.....	32
Tabla 10	Rendimiento del extracto.....	33
Tabla 11	Rangos de cafeína de consumo al día.....	33
Tabla 12	Cantidad de cafeína del producto.....	34
Tabla 13	Análisis organolépticos y físico químicos.....	34
Tabla 14	Concentración de cafeína en el extracto Ilex guayusa loes.....	35
Tabla 15	Concentración de cafeína por espectro UV.....	37
Tabla 16	Solubilidad de excipientes.....	38
Tabla 17	Fórmula final.....	41
Tabla 18	Evaluación física y química del producto terminado.....	42

Índice de figuras

Figura 1 Imagen del género <i>Ilex guayusa</i>	7
Figura2 Imágen de la molécula de cafeína.....	9
Figura 3 Imágen de la producción de especies reactivas.....	13
Figura 4 Imagen del Daño celular y ADN mediante estrés oxidativo.....	14
Figura 5 Imagen del Procesamiento Pos-cosecha.	19
Figura 6 Imagen del procesamiento y selección de de las hojas de <i>ilex guayusa</i>	20
Figura 7 Imagen de Extracción sólido líquido.....	23
Figura 8 Gráfica de la formulación.....	27
Figura 9 Granulación por vía húmedad.....	31
Figura 10 <i>Hojas de Ilex guayusa</i>	33
Figura 11 Cafeína presente en alimentos	37
Figura 12 Solubilidad de diluyentes.....	41
Figura 13 Coloración del producto final.....	41
Figura 14 Producto farmacéutico.....	41
Figura 15 Velocidad de flujo del granulado	42

Resumen

Existe una gran diversidad de plantas medicinales con diferente funcionalidad y usos en el tratamiento de inflamaciones, enfermedades del aparato digestivo, y enfermedades de la piel.

El género *Ilex guayusa* está distribuido en regiones tropicales y subtropicales del continente americano, posee altas concentraciones de antioxidantes y cafeína superiores al té verde y el café además de ello contiene: esteroides, quinonas, flavonoides, aceites esenciales, saponinas y triterpenos, es rico en magnesio, calcio, zinc, potasio, vitamina D y C .

La cafeína es una xantina trimetilada 1,3,7 trimetil-xantina que está presente en algunas variedades de plantas, en concentraciones bajas mejora el rendimiento físico, mental, mitiga el cansancio y el sueño, por el contrario, en cantidades elevadas produce ansiedad, distrofia y alteraciones del sueño.

Palabras clave: *Ilex guayusa*, cafeína, xantina, antioxidante

Abstract

There is a great diversity of medicinal plants with different functions and uses in the treatment of inflammations, diseases of the digestive system, and skin diseases. The genus *Ilex guayusa* is distributed in tropical and subtropical regions of the American continent, which have high concentrations of antioxidants and caffeine higher than green tea and coffee, in addition to this, it contains steroids, quinones, flavonoids, essential oils, saponins and triterpenes. Rich in magnesium, calcium, zinc, potassium, vitamin D and C.

Caffeine is a trimethylated xanthine 1,3,7 trimethyl-xanthine that is present in some varieties of plants, in low concentrations it improves physical and mental performance, mitigates tiredness and sleep, on the contrary in high amounts it produces anxiety, dystrophy and sleep disturbances.

Keywords: *Ilex guayusa*, caffeine, xanthine, antioxidant

Introducción

Existe una gran variedad de plantas que requieren ser investigadas para determinar sus actividades biológicas y lograr un uso y aprovechamiento adecuado (Cseke, 2006). La Amazonía ecuatoriana se caracteriza por su biodiversidad, especialmente por su extensa variedad de plantas convirtiendo a la región en una fuente constante de investigación de interés científico y antropológico (Radice & Vidari, 2007)

Taxonómicamente *Ilex guayusa* es descrito como un árbol de hoja perenne el cual es perteneciente a la familia *Aquifoliaceae*, puede llegar alcanzar entre 6 y 10 metros de altura. Las hojas estructuralmente son simples, glabras, oblongas con margen cerrado, miden entre 7-20cm de largo y 2,5-7 cm de ancho (Shemluck, 1978).

La especie *Ilex guayusa* contiene hasta un 3 % de cafeína en estado seco, lo que demuestra que sus hojas poseen una cantidad más elevada de cafeína que el café o el té verde tradicional (Torres, 2013)

La cafeína es un alcaloide perteneciente al grupo de las xantinas, posee un sabor sutil amargo y un color blanquecino (Pacha, 2012). Entre sus propiedades más destacadas se describen: activación del sistema nervioso central, aumento progresivo del estado de alerta, mitigación del cansancio y aumento significativo de la concentración, así como también se le atribuyen otras propiedades diuréticas y de relajación muscular.

Un sinnúmero de procesos ocurre en la naturaleza procedentes de reacciones de oxidación y reducción, son imprescindibles para la vida, pero ocurren diversos cambios en la estructura del ADN y se da la liberación acelerada de radicales libres, esta anomalía trae consigo distintas patologías como: arterioesclerosis, cáncer, insuficiencia renal, diabetes mellitus, demencia senil, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, EPOC, fibroplasia retrolental, Kawashiorkor, isquemia cerebral e hística, glomerulonefritis, miocardiopatías, insuficiencia cardíaca, muerte súbita cardíaca, porfirias, úlcera péptica, Síndromes de ataxia-teleangiectasia, de Down, de Bloom, de Dubin-Johnson-Sprinz, VIH.

En el mercado ecuatoriano se encuentran pocos productos a base de guayusa, de los

cuales únicamente destacan las bebidas gasificadas y enlatadas, lo que hace evidente la necesidad de desarrollar nuevas formas de presentación que sean atractivas para el consumidor y aporten al desarrollo económico del país. A través de los años las formas de dosificación sólidas se han convertido en las formulaciones predilectas para el consumidor por sus múltiples ventajas, entre las que incluyen su forma de administración fácil y su presentación única en envase individual que está destinada a disolverse en agua antes de su administración, generando una bebida agradable y refrescante . (Cueva, 2018) (Agencia Española de medicamentos y Productos Sanitarios, 2005) (Villafuerte, 2011) (Parikh, 2010) .

Capítulo uno

Aspectos generales de la guayusa y los Fito medicamentos

1.1 Plantas medicinales.

Desde los primeros registros históricos se ha evidenciado el uso de plantas con diversas aplicaciones y desempeñando roles importantes para la supervivencia humana, siendo la aplicación medicinal una de las más relevantes datándose registros desde de los años 2000 a.C. en los cuales encontramos el Papiro de Ebers (2278 a.C.) y el Papiro de Smith (2263 a.C.) en donde se describe una serie de drogas o principios activos, su modalidad de cultivo y la preparación para su administración. En el siglo XIV se expone la importancia de las plantas medicinales y posteriormente surgen los primeros Jardines Botánicos, donde fueron cultivadas diversas especies de plantas medicinales con la finalidad de estudiarlas y aprovechar sus beneficios (Salvador, 2017).

Ecuador es un país con una amplia diversidad de flora y fauna, hasta el momento se han documentado la existencia de aproximadamente 17000 especies de plantas vasculares, de los cuales se estima que más de 3000 especies de plantas poseen propiedades medicinales (Iveson-Iveson, 1979).

En los Andes ecuatorianos el uso de plantas con fines terapéuticos es una práctica ancestral que se desarrolla hasta la actualidad, aplicada casi exclusivamente por mujeres que han heredado los conocimientos a través de los años. El 80% de la población tiene conocimientos ancestrales de plantas medicinales, es por ello que en su gran mayoría dependen de la medicina convencional o tradicional y la utilización de estas plantas para tratar enfermedades del sistema digestivo, infecciosas, enfermedades de la piel y del tejido celular e inflamaciones agudas y crónicas (Ansaloni et al., 2010)(Gallegos, 2016). (Villacís, 2017)

La medicina tradicional es utilizada a nivel mundial y su importancia económica presenta un crecimiento progresivo. Actualmente estas plantas medicinales son utilizadas como principios activos para la elaboración de medicamentos sintéticos complejos aprovechando sus propiedades terapéuticas (Bussmann, 2015)(Bermúdez, A;Oliveira, M; Velazquez, 2005).

Ecuador establece diversas políticas gubernamentales que fortalecen y consolidan la

salud intercultural, de tal manera que se logra incorporar la medicina ancestral y alternativa en el Sistema Nacional de Salud Pública, que tiene como finalidad la creación de protocolos que faciliten la inserción de la medicina ancestral y alternativa con un enfoque holístico, en los distintos centros de salud pública y privada (Gallegos, 2016).

1.2. Ilex guayusa

1.2.1 Generalidades

El género *Ilex* está distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano e incluso en Oceanía, se calcula que existen más de 500 especies. El subgénero *Ilex* es el más extenso, incluye varias especies distribuidas en Colombia, Ecuador, Brasil, Uruguay, Paraguay y el norte de Argentina. En los siglos XVII y XVIII, jesuitas y otros misioneros indicaron que la planta fue usada para propósitos psicoactivos y medicinales. Fue recolectada por primera vez en 1898 por Warszewicz en Perú y en 1901 Theodor Loesner le atribuyó el nombre de *Ilex guayusa*. Es considerada una planta sagrada para las comunidades indígenas y se la denomina comúnmente: guayusa, huayusa, Kopíniak (Záparo), wais (Shuar), wayus (Achuar) (Ritsch, 2005) (Melo, 2014).

La guayusa es considerada como una planta sagrada, simboliza vigorosidad y fuente de vida para diversas comunidades amazónicas, sus hojas contienen propiedades energéticas y medicinales, cuya utilización ha sido descrita desde el siglo XVI constituyéndose como la planta ancestral más utilizada e importante en los rituales de muchos pueblos kichwas amazónicos (Melo, 2014).

El género *Ilex* es el único empleado para la elaboración de bebidas o infusiones a partir de sus hojas, el consumo de las preparaciones de guayusa en las comunidades y nacionalidades indígenas es de uso diario; a éste se le atribuyen propiedades estimulantes, digestivas y diuréticas. Los indios Sionas y Sibundoy emplean las hojas secas de la guayusa como expectorante y digestivo además es usado como antidiabético (Villacís, 2017) (García, 1992).

1.3. Taxonomía y ubicación geográfica.

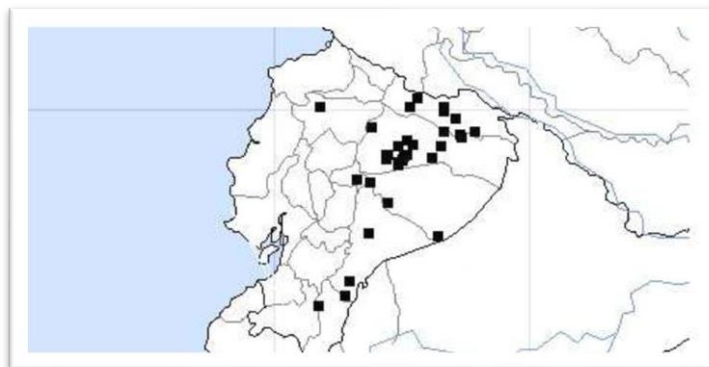
Ilex guayusa Loes es una planta nativa con distribución natural en países como Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Sequeda-Castañeda et al., 2016).

Los registros del Herbario de Loja muestran que las plantaciones de guayusa se encuentran mayoritariamente en provincias amazónicas: Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Figura 1); aunque se han reportado ejemplares en las provincias de Pichincha y Tungurahua. El desarrollo de los cultivos se da en diversos hábitats: valles, laderas, huertos, pastizales. Se adapta a suelos húmedos o secos y temperaturas que oscilan entre los 18°C y 26°C (Radice & Vidari, 2007)(Crespo, 2013) .

La Amazonía ecuatoriana presenta una ventaja comparativa entre el sur de Colombia y el Norte del Perú ya que las condiciones son mejores para el crecimiento de esta especie, sobre todo en la provincia de Napo. Por ello desde Ecuador sale el 95 % de Guayusa para el mundo, la cual es exportada a Estados Unidos, Canadá y Europa (Mora, 2019) .

Figura 1

Imagen del género Ilex guayusa



Nota. Distribución de Ilex guayusa Loes en el Ecuador, por Caranqui Aldaz et al., 2000

Tabla 1

Tabla de la taxonomía de Ilex guayusa

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Celastrales</i>
Familia	<i>Aquifoliaceae</i>
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>Ilex guayusa Loes</i>
Nombre común	<i>Guayusa</i>

Nota. Taxonomía *Ilex guayusa Loes* por
Sequeda-Castañeda et al., 2016

1.4. Características Botánicas

Los individuos de la especie *Ilex guayusa Loes* alcanzan los 15 metros de altura, tienen copa irregular y follaje denso, con ramas flexibles y extendidas. El tronco tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura del pecho, corteza blanca y textura lisa las ramas son extendidas y flexibles mientras que las hojas son de color verde oscuro, oblongo-elípticos y dentados de 15-21 cm de largo, 5- 7,5 cm de ancho y pecíolo corto de 1 cm de largo. El fruto es una baya de 1 cm de ancho y sus flores poseen una corola blanco-verdosa con pétalos. Su fruto es una baya globosa verde o roja y crece hasta alcanzar 1 cm (Caranqui Aldaz et al., 2000) (Radice & Vidari, 2007) (Sequeda-Castañeda et al., 2016).

1.5. Composición Química y Aplicaciones terapéuticas *Ilex guayusa* Loes.

Las hojas de guayusa presentan altas concentraciones de antioxidantes y cafeína en unas cantidades superiores a la encontrada en el té verde o café; posee teobromina y teofilina en menores cantidades, además contiene: esteroides, quinonas, flavonoides, aceites esenciales, saponinas y triterpenos. Los fenoles totales encontrados en extractos etanoicos de las hojas de guayusa tiene varias aplicaciones terapéuticas: disminución de la glucosa postprandial en sangre, fuerte actividad contra microorganismos patógenos como *Cándida albicans*, y *Microsporium canis*, además en países como Bolivia y Perú es utilizado contra enfermedades venéreas (Utreras, 2018)(Ruiz, 2009).

La infusión de guayusa por sus propiedades se lo utiliza como:

- Potente antioxidante: Presenta un 3% de cafeína, contiene antioxidantes con mayor capacidad de absorción de los radicales libres.
- Rica en vitaminas y minerales: Contiene magnesio, calcio, zinc, potasio y vitaminas D y C. También contiene ácidos clorogénicos, beneficiosos para la salud cardiovascular y aminoácidos esenciales.
- Estimulantes. Además de cafeína, la guayusa contiene estimulantes como methylxantinaalcaloidea, theofilina que se encuentran en el té verde y theobromina, que también puedes aprovechar en el chocolate negro (Rocha, 2018).

Cierto grupo de principios activos denominados xantinas o metilxantinas como: la cafeína, la teobromina, la teofilina) hacen su aparición en 6 géneros de plantas que pertenecen a 5 familias diferentes.

Se describen dos mecanismos de acción de las xantinas sobre el SNC. El primero se relaciona con los receptores A1 Y A2a de adenosina, ocurre una inhibición de las fosfodiesterasas y un aumento del AMP Y GMP cíclico. Este mecanismo permite un aumento en la liberación de los neurotransmisores (GABA, serotonina, dopamina, glutamato, acetilcolina, noradrenalina) en distintas áreas cerebrales. El segundo mecanismo implica a los canales de cloro, donde las xantinas van a competir con los receptores de las benzodiacepinas actuando como analépticos clásicos.

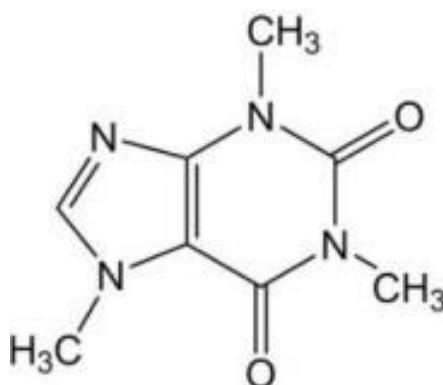
Las metilxantinas presentan una farmacocinética similar, una absorción intestinal rápida y una distribución por toda el agua a nivel corporal atravesando la barrera hematoencefálica, la placenta y la leche materna. Su eliminación en el cuerpo es corta, la cafeína es excretada a las 5 horas, la teofilina a las 6 horas y la teobromina a las 7 horas.

1.5.1 Cafeína

La cafeína es un alcaloide perteneciente al grupo de las xantinas trimetiladas 1,3,7 tri - metil-xantina (Figura 2) que está presente en más de 60 especies de plantas. Es un estimulante del sistema nervioso central (SNC), en bajas concentraciones mejora el rendimiento físico y mental, mitiga el cansancio y el sueño. Dosis elevadas producen ansiedad, distrofia y alteraciones del sueño (Tavares & Kimiko, 2012)(Moratalla, 2008).

Figura 2

Imagen de la molécula de cafeína



Nota. Estructura de la cafeína por

Ebocame, 2017

Las fuentes alimentarias más comunes son: el café, té verde, chocolate, bebidas gaseosas, energizantes, postres y dulces. Se presenta como un sólido cristalino o cristales en forma de prismas hexagonales, blanco, de sabor amargo, soluble en agua pero posee más afinidad a ciertos disolventes orgánicos como el cloroformo, tiene una densidad de 1,23 g/ml, un punto de fusión de 237 °C (Santacruz et al., 2017) (Carvajal,J, 1988).

La cafeína tiene efectos biológicos a través de la adenosina, siendo un antagonista

especialmente en la subclase de receptores A1 y A2A. La molécula de adenosina es considerada como una precursora de moléculas de elevada actividad biológica, es componente de algunos cofactores y posee acciones fisiológicas propias. Actúa como hormona al unirse con los receptores de adenosina y como modulador intracelular después de movilizarse hacia el interior de las células por los transportadores de membrana celular. La principal acción de la adenosina es la inhibición de la enzima fosfodiesterasa y a nivel extracelular actúa como neuromoduladores específicos sobre el glutamato y la dopamina. Los receptores de adenosina están involucrados en la modulación del dolor, el movimiento, el sueño, la cognición, memoria y atención, la termorregulación y el sistema inmune (Santacruz et al., 2017).

Múltiples efectos son asociados con la cafeína; entre ellos el efecto diurético para tratar el edema que ocurre al antagonizar los receptores de adenosina A1 y A2a. Cuando la cafeína antagoniza el receptor en el sistema nervioso central (Tavares & Kimiko, 2012), provoca un aumento de la frecuencia cardiaca, vasodilatación muscular y mejoramiento del rendimiento físico, aumento de la contractibilidad del diafragma, disminución de los niveles de colesterol en la bilis, estimulación de la secreción ácida gástrica y diuresis. Además las xantinas tienen un efecto estimulante sobre el sistema respiratorio, aumentando la sensibilidad de los pulmones al gas carbónico (García, 1992) (Lozano et al., 2007)(Tavares & Kimiko, 2012).

La abstinencia a la cafeína de 12-24 h tras el cese de su ingesta provoca cefaleas, debilidad, cansancio, somnolencia, depresión, ansiedad, vómitos.

La dosis necesaria para producir una intoxicación oscila entre los 500mg en una sola vez. Y su dosis letal se estima entorno a los 10 g en un adulto, aunque se han dado muertes con 6,5 g y índices de supervivencia a dosis de 24g.

1.6 Antioxidantes

En la naturaleza existen un sinnúmero de procesos de oxidación y de reducción que ocurren a cada instante en nuestro alrededor, por ello estos procesos son imprescindibles para la vida, pero una acelerada liberación de radicales produce un cambio en los

macronutrientes (proteínas, lípidos, carbohidratos) que llegan a dañar la estructura y funcionalidad de las células dando como resultado diversas patologías incluidas el cáncer.

Distintas patologías son asociadas a los radicales libres entre ellos podemos divisar: envejecimiento, arterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal, diabetes mellitus, hipertensión arterial, cirrosis, desmielinización, distrofia muscular, artritis e inflamación, enfisema pulmonar, amiloidosis, colagenosis, conectivopatías (LES, esclerodermia, enfermedad de Wegener), colitis ulcerosa, demencia senil, dermatitis de contacto, displasia broncopulmonar, enfermedad de Alzheimer, distrés respiratorio del adulto, mutaciones, lipofuscinosis, enfermedad de Parkinson, EPOC, fibroplasia retroental, Kawshiorok, isquemia cerebral e hística, glomerulonefritis, miocardiopatías, insuficiencia cardiaca, muerte súbita cardiaca, porfirias, úlcera péptica, Síndromes de ataxia-teleangiectasia, de Down, de Bloom, de Dubin-Johnson-Sprinz, VIH.

Actualmente contamos con alimentos funcionales que ayudan a prevenir o reducir enfermedades, dentro de ellos encontramos un grupo predominante que tiende a actuar como antioxidante, teniendo en consideración que son aquellos compuestos que tienen la capacidad de retardar e impedir la oxidación de moléculas es decir la formación de radicales libres, estos pueden ser naturales o sintéticos, además de ello se los clasifica en dos sistemas que pueden ser: enzimáticos (endógenos) y no enzimáticos(exógenos).

El sistema enzimático se basa en la utilización del superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, tiorredoxina, reductasa y glutatión reductasa.

Las dietas ricas en antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo de las células, lo cual ayuda a prevenir el deterioro funcional orgánico, los siguientes componentes deben incluirse dentro de la alimentación diaria para mantener una dieta sana y balanceada:

- **Selenio:** Se recomienda una ingesta diaria aproximadamente de 55 microgramos al día dado que es necesario consumir este mineral en el caso de padecimiento de patologías como el cáncer de próstata, mama, colon, recto, leucocitos, hígado y piel. Ciertos alimentos son ricos en este mineral, tales como: semillas de girasol, nueces de Brasil, nueces, judías, pepino, ajo, huevos, carnes rojas, carnes blancas.

- **Betacaroteno:** Este pigmento pertenece al grupo de los carotenoides, que se logran convertir en vitamina A en el cuerpo y se lo puede encontrar en: verduras amarillas y naranjas (p. ej., zanahorias, batatas y calabazas, albaricoques, melón, papaya, mango, carambola, nectarina, melocotón) y la verdura de hoja verde (p. ej., espinacas, brócoli, col rizada, achicoria, escarola y berros). Por ser un antioxidante puede prevenir algunos tipos de cánceres, enfermedades cardiacas y reducir notablemente las secuelas del envejecimiento.
- **Vitamina C:** es una vitamina hidrosoluble que ayuda a la eliminación de radicales libres y permite la activación de algunas enzimas, destruye las nitrosaminas y se le atribuye su efecto anticancerígeno en los alveolos pulmonares y de inhibición pulmonar. En niños la dosis recomendada es de 20-60 mg al día y en adultos se puede llegar a concentraciones de hasta 100 mg al día. Algunos de los alimentos ricos en vitamina C son: perejil, pimienta, col, berro, papaya, kiwi, fresas, etc.
- **Vitamina E:** La vitamina E aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, ciertos estudios han determinado que una ingesta elevada de esta vitamina en la dieta disminuye el riesgo cardiovascular y arterosclerosis. Su consumo diario debe ser de aproximadamente 15 mg en una dieta balanceada, con alimentos como: maní, avellana, almendra, nuez, semilla de girasol, plantas de hoja verde, etc.

Tabla 2

Tabla de la clasificación de antioxidantes

Tipos de Antioxidantes		
Cofactores	Endógenos	Exógenos
Zinc	Coenzima Q	Lycopeno
Cobre	Ácido Tióctico	Vitamina E
Hierro	Speróxidodismutasa, Catalasa Glutación peroxidasa	Betacaroteno
Magnesio	Glutación	Vitamina C
Selenio		Flavonoides

Nota. Clasificación de los Antioxidantes Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección.

Tabla 3

Tabla de los antioxidantes

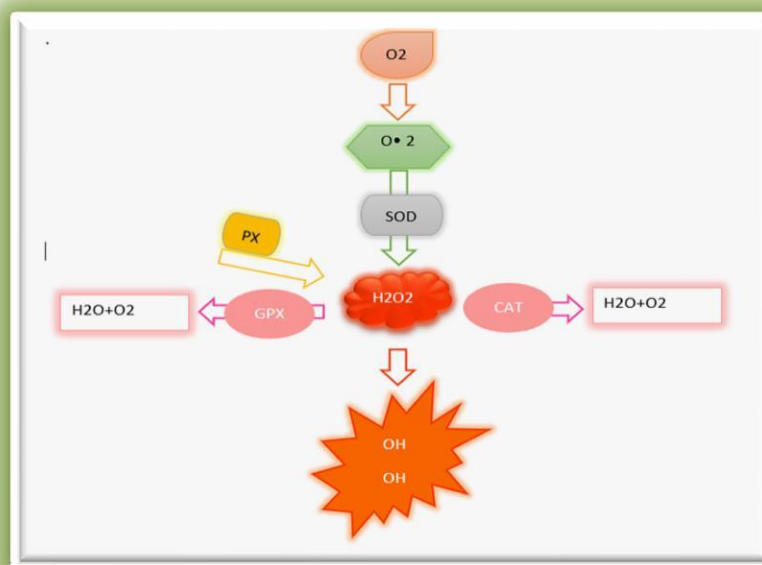
Vitamina	Fuente Alimentaria
Vitamina E	<p><i>Fuentes más importantes</i></p> <p>Aceites vegetales, aceites de semillas, germen de trigo y de maíz, almendras, avellanas, girasol, nuez, maní.</p> <p><i>Otras fuentes significativas</i></p> <p>Papas frescas, pimentón, repollo, apio, pollo, pescado.</p>
Vitamina C	<p>Frutas</p> <p>Limón, guayaba, mango, kiwi, fresa, papaya, piña, mora.</p> <p>Verduras</p> <p>Tomates, espinaca, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, pimentón</p>

Carotenoides	<p><i>Betacaroteno</i></p> <p>Verduras, frutas amarillas, verduras verdes oscuro.</p> <p><i>Alfacaroteno</i></p> <p>Zanahoria</p> <p><i>Licopeno</i></p> <p>Tomate</p> <p><i>Luteína y zaxantina</i></p> <p>Verduras de hoja verde oscuro, brócoli.</p>
---------------------	---

Nota. Antioxidantes y fuentes alimentarias Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea

Figura 3

Imagen de la producción de especies reactivas

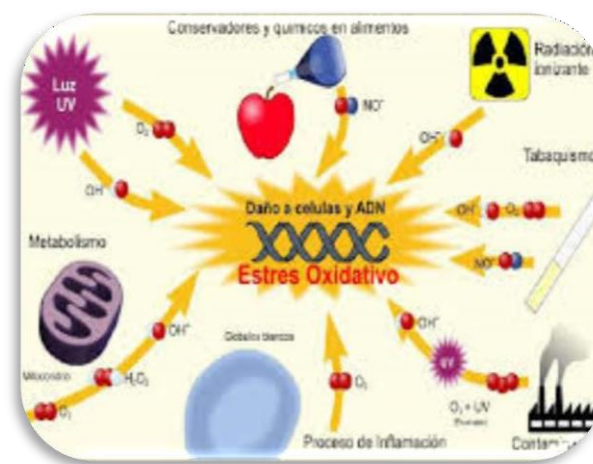


Nota. Mecanismo de formación de especies reactivas (Binipatía higienismo la fuente de la salud , 2022) Carvajal, Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica, 36(1), 91-100

La oxidación del oxígeno tiene como producto final al ion superóxido ($O\cdot^-$); que son generados en el retículo endoplásmico. El ($O\cdot^-$) es degradado por la enzima superóxido dismutasa (SOD), produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual también es generado por los peroxisomas (PX). El glutatión peroxidasa (GPX) reduce el H_2O_2 a agua (H_2O). La catalasa (CAT) es otra enzima que emplea como sustrato al (H_2O_2) reduciéndolo a (H_2O).

Figura 4

Imagen del Daño celular y ADN mediante estrés oxidativo



Nota. Generación de radicales libres por Binipatía higienismo la fuente de la salud . (6 de 09 de 2022).

1.7 Importancia Económica

Las bebidas energizantes son consideradas como un alimento funcional, estos productos son comercializados libremente y tienen como consumidores principales a los adolescentes y adultos jóvenes; su ingesta supone múltiples ventajas, entre ellas: aliviar la fatiga, mantener la vigilia, mejorar y estimular el rendimiento físico y las capacidades cognitivas. Estas bebidas estimulantes han estado presentes desde el siglo XIX, su propagación en el mercado se produjo en el año 1990, generando un proceso expansivo a nivel mundial que concibe múltiples ventas y ganancias en el mercado laboral. Están constituidas por cafeína, taurina y carbohidratos (azúcares) en conjunto con otros componentes como aminoácidos, vitaminas,

minerales, extractos vegetales, acompañados de aditivos acidulantes, conservantes, saborizantes y colorantes (Díaz et al., 2013) (Sánchez et al., 2015)(Mora, 2019).

La mayoría de los productos nuevos comercializados en los supermercados del Ecuador incluyen cafeína, principalmente Red Bull que contiene 80 mg por cada 80 ml de producto, superando el contenido total de la cafeína en comparación con las bebidas gaseosas, refrescos y sodas light o dietéticas que poseen una cantidad que oscila entre los 15 y 35 mg de cafeína por cada 80 ml de refresco (Utreras, 2018).

Actualmente las bebidas energéticas con cafeína son consideradas como un suplemento empleado exclusivamente en el ámbito deportivo, su ingesta mejora el rendimiento físico en atletas y población general que practica deportes, ejercicios aeróbicos o anaeróbicos en general, su dosis recomendada es de cantidades menores a 6 mg por cada kilo una hora antes del inicio de la actividad deportiva. Es importante mencionar que un consumo moderado y a dosis recomendada no genera riesgos para la salud. (López et al., 2017)

1.8 Extractos de plantas con actividad farmacológica

Los extractos de plantas se obtienen con la separación de sus partes biológicas activas, requieren de un solvente y un correcto proceso de extracción. En la elección del solvente es necesario tomar en cuenta aspectos relacionados con el grado de toxicidad, selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad y los riesgos de contaminación ambiental, los fito medicamentos por lo general están desarrollados con mezclas hidroalcohólicas (Muzo, 2016).

1.8.1 Método de extracción

El proceso de extracción sólido-líquido permite la separación de uno o más compuestos que se encuentran en la fase líquida, está presente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y farmacéutica. El componente que es transferido a la fase líquida se lo denomina soluto y el sólido insoluble se lo denomina inerte (Muzo, 2016).

1.9 Fito medicamentos

Un fito medicamento es aquel que posee como principio activo un extracto vegetal estandarizado y estabilizado, cuyo ingrediente principal fue extraído a partir de la parte aérea o subterránea de una planta elaborando con esto diversas presentaciones como tinturas,

resinas o aceites esenciales. La OMS sugiere la aplicación de la fitomedicina en diferentes tratamientos terapéuticos, tomando como base los conocimientos científicos modernos aplicados en la farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos y divulgaciones científicas (Muzo, 2016)(Cerecero et al., 2005) (Morales et al., 2009).

1.10 Forma farmacéutica

La forma farmacéutica de un medicamento es la forma de disposición individualizada en la que se acomodan homogéneamente los principios activos y excipientes constitutivos de un medicamento, estas preparaciones farmacéuticas pueden tener uno o varios principios activos en su composición final (Muzo, 2016).

El principio activo obtenido de las plantas medicinales suelen ser metabolitos primarios o secundarios con la finalidad de provocar una acción terapéutica en el organismo (Muzo, 2016).

Los excipientes son sustancias añadidas auxiliares a la formulación, carece de acción farmacológica y le confiere ciertas características que aseguren la estabilidad, biodisponibilidad y facilidad de administración de unas más sustancias activas (Montesdeoca, 2011).

1.10.1 Formas farmacéuticas sólidas

Las formas farmacéuticas sólidas son aquellas que tienen sus componentes en estado sólido, los más habituales son los comprimidos, capsulas y granulados. Presentan múltiples ventajas entre las que destacan su estabilidad física, química y biológica, la exactitud en la dosificación, liberación controlada del fármaco, fácil administración y bajo costo. Este tipo de formulaciones permite la utilización óptima de cualquier tipo de principio activo (Vila, 2001).

1.10.2 Granulados

Los granulados son aglomeraciones de partículas de polvo que se pueden diferenciar y mantenerse agregadas por acción del aglutinante; usualmente estos granulados se emplean para la fabricación de comprimidos y cápsulas. Los granulados presentan múltiples ventajas, entre las cuales se destaca la prevención de la segregación de componentes, adicionalmente mejora las propiedades de flujo y mejora las características de compactación.

Es importante destacar que los aglutinantes son sustancias que actúan como adhesivos y cohesivos para formar gránulos; están constituidos por macromoléculas de cadena larga que dejan una película de adhesividad que permite el agregado de partículas. (Schwarz et al., 2014)

Los gránulos farmacéuticos tienen habitualmente un intervalo de tamaño entre 0,2 y 4 mm; en la mayoría de los casos el proceso de granulación tiene lugar durante la fabricación de comprimidos o cápsulas donde estos gránulos se elaboran como producto intermedio y tienen un tamaño de 0,2 y 0,5 mm, en donde puede contener uno o más principios activos, excipientes, colorantes y aromatizantes. (Aulton, 2004)

1.10.3 Tipos de Granulados

Se pueden distinguir varios tipos de granulados:

➤ Granulados efervescentes

Los granulados efervescentes son granulados no recubiertos que contienen en ciertas ocasiones sustancias ácidas y carbonatos o hidrogeno carbonatos, los cuales reaccionan rápidamente en presencia de agua con liberación de dióxido de carbono. Están destinados a disolverse o dispersarse en agua antes de su administración (Real Farmacopea Española, 2002).

➤ Granulados recubiertos

Los granulados recubiertos son, generalmente, preparaciones multidosis constituidas por gránulos recubiertos de una o más capas de mezclas de diversos excipientes (Real Farmacopea Española, 2002).

➤ Granulados gastro resistentes

Los granulados gastro resistentes son granulados de liberación retardada que están destinados a resistir la acción del jugo gástrico y a liberar su principio o principios activos en el líquido intestinal. Para obtener estos resultados el granulado se recubre con un material gastro resistente (granulados entéricos) o por otro medio adecuado (Real Farmacopea Española, 2002).

➤ Granulados de liberación modificada

Los granulados de liberación modificada son granulados recubiertos o no recubiertos, que se preparan usando excipientes especiales, mediante procedimientos especiales o ambos medios conjuntamente, con el fin de modificar la velocidad o el lugar o el momento de liberación del principio o principios activos (Real Farmacopea Española, 2002).

1.10.4 Granulación vía Húmeda

La granulación por vía húmeda implica el amasado de una mezcla de las partículas primarias de polvo adicionando un aglutinante disperso en un líquido para formar una solución o suspensión que puede eliminarse durante el secado, casi siempre se emplea agua, alcohol u otro disolvente orgánico. Puede usarse solo o más habitualmente, se le coloca un adhesivo disuelto, también conocido como aglutinante, que se utiliza para garantizar la adhesión de las partículas una vez que el granulado está seco (Schwarz et al., 2014).

1.10.5 Granulación vía seca

Existen dos procesos principales, uno en el que se produce un fragmento grande conocido como tabletón en una prensa de tableado de alta presión, lo que se conoce como doble compresión, y el segundo, es el prensado entre rodillos para producir una lámina de material, compactación por rodillos. Estos productos intermedios se fragmentan usando una técnica de molienda granular que después se tamiza para separar la fracción del tamaño deseado (Schwarz et al., 2014).

1.11 Desarrollo de la forma farmacéutica

1.11.1 Preformulación de medicamentos

La pre formulación se describe como el proceso de investigación y desarrollo de una sustancia activa, estos estudios proporcionan características de sus propiedades físicas y químicas del principio activo, durante esta caracterización es posible conocer las interacciones con los diversos componentes destinados a ser utilizados en el producto (Lázaro, 2012).

En esta etapa de pre formulación se evalúa polimorfismo de la sustancia activa, el

punto de fusión, la solubilidad, el tamaño de la partícula, la velocidad de disolución, la fluidez, la estabilidad y la compatibilidad con los componentes de la formulación; estas propiedades influyen en la cantidad y velocidad a la que el principio activo aparecerá en la sangre tras su administración, por tanto determina la intensidad y duración de la respuesta farmacológica (Hernández, Moreno, Zaragoza, & Porras, 2011).

1.11.2 Compatibilidad con los excipientes

La formulación de granulados farmacéuticos tiene como limitante principal las propiedades del principio activo, el éxito de la formulación de un preparado farmacéutico estable y eficaz depende de una cuidadosa selección de los excipientes que se le añadieran para facilitar la administración y proteger el fármaco de la degradación (Robles, 2011)(Andario, 2013).

Los excipientes son sustancias inertes distintas del principio activo que son esenciales para la fabricación de los medicamentos, ayudan a mantener la forma física, la calidad, la estabilidad, la conservación y la biodisponibilidad del mismo, estos excipientes se clasifican en solventes, lubricantes, desintegrantes, colorantes, aromatizantes, edulcorantes (Robles, 2011).

Para que una sustancia sea considerada excipiente, se requieren las siguientes características:

- No ser peligrosa en las cantidades que se emplea.
- No exceder la cantidad mínima para lograr su misión.
- No interferir en la biodisponibilidad del fármaco, en su eficacia y seguridad.
- No interferir en las pruebas y ensayos que se efectúan en el control de calidad. (Baños & Farré, 2002).

Las mezclas de principio activo y excipientes se desarrollan en la fase de pre formulación, este proceso se obtiene a través de diseños experimentales, entre las más importantes tenemos las mezclas binarias, diseños factoriales centrados y los de Plackett y Burman (Salazar, 2001).

Los diseños factoriales son utilizados en experimentos en los que intervienen varios

factores para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre una variable de interés; es necesario conocer qué variables influyen significativamente en el sistema y como lo afectan para generar una optimización de los procesos de fabricación, condiciones de reacción y métodos de análisis (Medina & Lopez, 2011).

El manejo del diseño factorial nos lleva a la obtención de información para el estudio de la estabilidad de un número determinado de mezclas. La elección de los factores establece el número determinado de estudios a desarrollar, un diseño factorial 2^3 va a emplear 3 factores en dos modelos diferentes, es decir los excipientes se convierten en factores (Salazar, 2001).

Capítulo dos

Proceso de elaboración y caracterización de la planta y el granulado

2.1 Área de recolección de la materia vegetal

Las hojas de la planta *Ilex guayusa* fueron recolectadas en el mes de marzo del año 2019 en la provincia de Zamora Chinchipe, perteneciente a la Región Amazónica del Ecuador, ubicada al sur de país. Posteriormente fueron llevadas al laboratorio de fitoquímica de la Universidad Técnica Particular de Loja para su procesamiento.

2.2. Procesamiento Pos-cosecha

Se seleccionaron cuidadosamente las hojas de *Ilex guayusa* en buen estado y se almacenaron en bolsas plásticas en un lugar fresco a temperatura ambiente hasta su requerimiento.

Figura 5

Imagen del Procesamiento Pos-cosecha



2.3 Triturado y tamizado del material vegetal.

Las hojas seleccionadas fueron cortadas con tijeras podadoras y tamizadas hasta obtener un material vegetal con uniformidad de tamaño, que facilite su manipulación y el proceso de extracción de la cafeína.

Figura 6

Imagen del procesamiento y selección de las hojas de ilex guayusa



2.4. Análisis físico químico por métodos gravimétricos

2.4.1 Determinación de Humedad

El análisis de humedad de la especie vegetal *Ilex guayusa* se realizó usando 2 g de muestra de planta seca que se colocó en una cápsula de porcelana previamente tarada y se secó la muestra a 103 °C hasta obtener un peso constante. Antes de cada pesada, la cápsula se colocó en el desecador y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de registrar el peso la muestra fue colada nuevamente en la estufa durante 1 h, volviéndose a repetir el proceso hasta obtener valores de peso constantes (Villacrés, 2019).

Fórmula de porcentaje de humedad

Ecuación 1

$$\% \text{ Humedad} : \frac{M2-M1}{M2-M} \times 100$$

%H= Pérdida de peso por desecación

M2= Masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M1= Masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M=Masa de la cápsula vacía.

2.4.2 Determinación de cenizas totales

Se pesó 2.0 g de planta tamizada en un crisol de porcelana previamente tarado. Calentamos el crisol hasta carbonizar la muestra y posteriormente se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C durante 2 horas. Se enfrió el crisol en un desecador y se pesó, repitiéndose el proceso hasta obtener una masa constante. A la muestra carbonizada se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% (m/v) y se calienta hasta evaporar los solventes y observar un residuo color blanquecino (Villacrés, 2019).

Fórmula de porcentaje de cenizas totales.

Ecuación 2

$$\%CT : \frac{M2-M}{M1-M} \times 100$$

%CT= Porcentajes de cenizas totales en base hidratada

M2= Masa del crisol con la muestra de ensayos (g)

M1= Masa del crisol con la muestra de ensayo después (g)

M=Masa del crisol vacío.

2.4.3. Cenizas solubles en agua

De las cenizas totales obtenidas previamente, se añadió 15 mL de agua y se hirvió durante 5 minutos en la llama de un mechero, posteriormente se filtró y el residuo se transfirió al crisol, se carbonizó en un mechero y luego se incineró en una mufla a 750 °C durante 2h. Posteriormente, se colocó en una desecadora y se pesó la materia. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un peso constante (Villacrés, 2019).

Fórmula de porcentaje de cenizas solubles en agua

Ecuación 3.

$$\%CT : \frac{M2-Ma}{M1-M} \times 100$$

%CA= Porcentajes de cenizas solubles en base hidratada

MA: Masa del crisol con las cenizas insolubles en agua.

M2= Masa del crisol con las cenizas totales.

M1= Masa del crisol con la muestra de ensayo.

M=Masa del crisol vacío.

2.4.4 Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

A las cenizas totales obtenidas, se añadió 2 mL de ácido clorhídrico al 10%, posteriormente se calentó a baño maría durante 10 minutos, la solución se filtra a través de un papel filtro libre de cenizas y se lavó con agua caliente; al residuo obtenido se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1 mol/L. El filtrado con el residuo se desecó a una temperatura de 100 a 105 ° C, se transfirió al crisol inicial y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750 ° C durante 2 h. Posteriormente, se enfrió y se pesó hasta obtener una masa constante (Villacrés, 2019) .

Fórmula de porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Ecuación 4

$$\%CT : \frac{M2-M}{M1-M} \times 100$$

%CI= Porcentajes de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M2= Masa del crisol con la muestra de ensayos (g)

M1= Masa del crisol con la ceniza ácido clorhídrico / desecada (g)

M=Masa del crisol vacío.

2.5. Extracción de cafeína de las hojas de guayusa.

En la extracción de cafeína de la planta Ilex guayusa se optó por la realización de una extracción sólido-liquido, colocando 50 g de hojas de guayusa triturada en vasos de precipitación, se los llevó al aforo de 1000 mL con agua destilada, seguidamente se sometió a calor (115-130 °C) en una plancha calefactora durante 40 minutos, se dejó enfriar y se colocó en frascos para conservar bajo congelación.

Figura 7*Extracción sólido líquido*

2.6 Liofilización del extracto

El proceso de liofilizado se lleva a cabo mediante la sublimación del agua del extracto en el que se emplean temperaturas y presiones bajas para que no exista la fase líquida. Para iniciar el proceso es necesario que el extracto de la guayusa se encuentre completamente congelada y sin cambio físico, seguidamente se coloca la materia prima en la cámara de secado donde estará sometida a presiones de vacío y se logrará evaporar el hielo.

2.7 Control de calidad del extracto

2.7.1 Análisis organolépticos del extracto

Se tomó 10 mg de extracto y se disolvió en 25 mL de agua previamente calentada. Se realizó el respectivo análisis sensorial de esta muestra registrando parámetros como el color, olor y aspecto (Sarango Granda, 2022).

Tabla 4

Tabla de la Valoración de las propiedades organolépticas.

Color	Olor
Marrón claro	Sulfuroso
Brillante	Fuerte
Amarillo cremoso	Inodoro
Blanco	Aromático

*Nota. Valoración del API por Sarango
Granda, P. C. (6 de 09 de 2022).*

2.7.2 Análisis fisicoquímico del extracto

2.7.2.1 Determinación de pH

Se disolvió 1 g de extracto en 3 mL de agua y seguidamente se midió el pH con ayuda del pHmetro.

2.7.2.2 Densidad Relativa

Se pesó el picnómetro limpio, vacío y seco, posteriormente se llenó dicho picnómetro con agua destilada y se registró el peso. Seguidamente, se colocó la muestra de ensayo de modo que no quedaran burbujas de aire y se pesó (Ochoa, Marín, & Rivero, 2013) La densidad relativa se calculó mediante la siguiente fórmula:

Fórmula de densidad relativa

Ecuación 6

$$\text{Densidad Relativa} = \frac{M1 - M}{M2 - M}$$

M= Masa del picnómetro vacío

M1=Masa del picnómetro con la muestra

M2= Masa del picnómetro con agua

2.7.3 Valoración del principio activo

2.7.3.1 Espectrofotometría UV-Vis

- **Preparación de la solución de referencia:** Se pesó 12 mg de estándar de cafeína USP y se aforó con HCL 0.1 N hasta 25 mL (concentración 480 µg/mL). A partir de esta solución, se realizaron diferentes diluciones de 2, 5, 7, 10 y 20 µg/mL. Se registraron las absorbancias a 273 nm usando el espectrofotómetro UV y se representó gráficamente en Excel concentración versus absorbancia para establecer el coeficiente de correlación lineal.

- **Preparación de la muestra:** Se pesó 40 mg del extracto de *Ilex guayusa* y se aforó con HCL 0.1 N hasta los 100 mL, posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 mL y se aforó con HCL 0.1 N a 25 mL y se registró la absorbancia a 273 nm en el espectrofotómetro UV. Se determinó la cantidad de cafeína presente en la muestra utilizando la ecuación de la curva de calibrado de la solución de referencia.

2.7.3.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Se realizó la cuantificación de la cafeína presente en el extracto de guayusa mediante el método analítico HPLC. Para ello se prepararon las siguientes soluciones:

- **Soluciones estándar:** Se pesó 4 mg de estándar de cafeína USP y se aforó a 10 mL de agua ultra pura para obtener la solución madre y a partir de ella se realizó una curva de calibrado de 0.15, 0.25, 0.5, 1 y 2 µg/mL.

- **Preparación de las muestras:** Se tomaron 4 mg del extracto seco y se aforó hasta 20 mL de agua destilada.

Para el método por HPLC se utilizó como fase móvil una solución de agua : metanol (50:50) a una tasa de flujo de 1 mL/min usando una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB – C18, 4,6 x 75 mm, 5 µm y un volumen de inyección de 20 µL. Se utilizó el método isocrático a una temperatura de 25 °C y el eluido fue analizado a 272 nm.

2.8 Estudios de Preformulación

2.8.1 Ensayos de solubilidad

2.8.1.1 Solubilidad entre excipientes

Se pre-seleccionaron 12 excipientes mediante una investigación de excipientes solubles en agua. Se pesó 1 g de excipiente (disolventes, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, conservantes) posteriormente se añadió 10 mL de agua y se procedió a agitar hasta conseguir una mezcla homogénea. En base a los resultados de este estudio se seleccionaron los excipientes para los estudios futuros.

Tabla 5*Valoración solubilidad de excipientes*

Valoración	Partes de disolvente que se requiere para el soluto
Muy soluble	Menor a 1
Fácilmente soluble	1 a 10
Soluble	10 a 30
Moderadamente soluble	30 a 100
Poco soluble	100 a 1000
Muy poco soluble	1000 a 10000
Insoluble	Mayor a 10000

Nota. Solubilidad de excipientes por la Real Farmacopea Española. (2002). Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento (2a. ed.). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

2.9.1 Diseño factorial

2.9.1.1. Composición de las mezclas

Se realizó un diseño factorial 2^2 utilizando como factores el aglutinante y el diluyente y dos niveles señalados con los signos “+” y “-” (Tabla 6) obteniendo así cuatro posibles mezclas (Tabla 7). Los excipientes que se usaron en esta etapa fueron seleccionados en base a los resultados de solubilidad.

Tabla 6*Componentes del diseño factorial.*

Factores	Niveles	
	(+)	(-)
Aglutinante	Povidona	Goma guar
Diluyente	Maltitol	Lactosa

Tabla 7

Diseño factorial

	A (Aglutinante)	B (Diluyente)
M1	-	-
M2	+	-
M3	-	+
M4	+	+

Tabla 8

Mezclas finales

Mezclas finales

	Diluyente	Aglutinante	Desintegrante	Lubricante	Conservante	Total
Mezcla 1	Lactosa 83.8%	Goma guar 5 %	Cel. Microcristalina 10 %	Aerosil 1%	Benzoato de sódio 0.2%	100%
Mezcla 2	Maltitol 83.8%	Goma guar 5 %	Cel. Microcristalina 10 %	Aerosil 1%	Benzoato de sódio 0.2%	100%
Mezcla 3	Lactosa 86.3%	Povidona 2.5%	Cel. Microcristalina 10%	Aerosil 1%	Benzoato de sódio 0.2%	100%
Mezcla 4	Maltitol 86.3%	Povidona 2.5%	Cel. Microcristalina 10%	Aerosil 1%	Benzoato de sódio 0.2%	100%

2.10. Formulación

2.10.1 Elaboración de granulado farmacéutico

Cada 100 gramos de producto contienen:
 Extracto de guayusa (Ilex guayusa)..... 1,6 g
 Excipientes: Csp

2.10.2 Proceso de fabricación

La granulación consiste en un proceso de aglomeración de polvos o partículas que incluyen: diluyentes, aglutinantes, desintegrante, lubricante, conservante que van a formar partículas de mayor tamaño denominados gránulos. Este granulado puede ser empleado en la fabricación de cápsulas y comprimidos, aunque también se lo utiliza como producto final como sucede en este proyecto. El proceso de elaboración del granulado de Ilex guayusa se resume en la Figura 8.

Figura 8

Granulación por vía húmeda



Se pesaron individualmente todos los excipientes y extracto de Ilex guayusa, seguidamente se realizó un tamizaje y se preparó la solución aglutinante (povidona + agua destilada, 12 mL por cada 100 g de producto + extracto) hasta conseguir una mezcla homogénea, a continuación se colocó esta solución aglutinante sobre la mezcla de maltitol, celulosa microcristalina, aerosil y benzoato de sodio y se mezcló todos los excipientes durante

3 minutos; se tamizó obteniendo un granulo uniforme, finalmente se colocó en la estufa a 40 °C durante un día y se realizó un tamizaje final del producto.

2.10.3 Control de calidad del producto terminado

2.10.3.1 Evaluaciones organolépticas

Se emplearon 2 gramos de granulado de *illex guayusa* que se colocaron en una luna reloj, posteriormente se procedió a registrar sus olor y color.

Solubilidad del granulado: Se pesaron 5 gramos de granulado y se agregó 250 mL de agua, se agitó y observó su solubilidad.

2.11.1 Caracterización reológica

Para la determinación del ángulo de reposo se inició colocando un embudo para sólidos en un soporte universal a 20 cm de la base, se colocó sobre la mesa una hoja milimétrica en la que se trazó un plano cartesiano. Se centró el embudo sobre la hoja milimétrica, coincidiendo la boca estrecha del embudo exactamente con el punto central (0) del plano cartesiano. Seguidamente se tapó la boca estrecha del embudo ayudados de una cinta. Se vertió lentamente 100 gr del polvo a analizarse dentro del embudo, se enrasó con una espátula el contenido para evitar la formación de picos.

Se retiró la cinta de la boca estrecha del embudo para permitir el flujo libre del polvo, este cayó sobre la hoja milimétrica formando un cono.

Una vez formado el cono se tomó medidas de la base del cono formado, así como su altura y se realizó los cálculos correspondientes, en consideración a la siguiente ecuación:

$$\text{tg } (\alpha) = \text{altura} / (0,5 * \text{base})$$

Para la determinación de velocidad de flujo, con la ayuda de un cronómetro se tomó el tiempo que tarda el polvo en precipitarse, desde el momento que se retira la cinta de la boca estrecha del embudo hasta la formación total del cono.

El estudio de ángulo de reposo y velocidad de flujo se realizó por triplicado.

Capítulo tres

Resultados y discusión

3.1 Caracterización de las hojas de *Ilex guayusa*

3.1.1 Observación macroscópica

Las hojas de *Ilex guayusa* presentan una forma oblonga, tamaño alrededor de 20 cm de largo y 7 cm de ancho y un peciolo corto (Figura 10).

Figura 9

Hojas de Ilex guayusa



3.1.2 Análisis de la materia vegetal recolectada

La Tabla 9 describe los parámetros fisicoquímicos de las hojas de *Ilex guayusa* analizados en este estudio. El material vegetal estudiado presentó una humedad relativa de aproximadamente 90%, ocasionado por la cantidad mayoritaria de agua o humedad que circula a través de toda la planta, por ello un buen riego de las mismas trae consigo características estructurales y funcionales favorables para la planta; por el contrario si hay un déficit de humedad menor al 50% ejercerá influencia sobre el crecimiento y la producción de la planta, viéndose afectadas el rendimiento, forraje y en algunos casos la madera de la planta.

El pH normal en la mayoría de las plantas varía entre 5 y 6, su acidez o alcalinidad puede influir en la absorción de distintos nutrientes entre los que se puede denotar el Boro, Fosfatos y Cobre. El material vegetal usado presentó un pH de 6 en planta fresca y 6.32 en

planta seca, lo que indica que esta especie tiene una buena absorción de nutrientes (Anthura, 2022).

Las cenizas totales ayudan a predecir la identidad y pureza del material o droga vegetal que se emplee, además brinda información sobre posibles alteraciones con cuerpos externos o extraños, estas son el resultado de una incineración del material vegetal. Las cenizas fisiológicas provienen de los componentes minerales de la propia planta, por el contrario, las no fisiológicas se obtienen después del proceso de incineración. Según la USP 2010, los límites establecidos para cenizas totales deben ser $> 12\%$. Los resultados en este estudio mostraron un porcentaje del 13% , por lo tanto, se cumple con la normativa.

Tabla 9

Análisis físico químico del material vegetal

Análisis	Ilex guayusa	Rangos normales USP
Humedad Inicial	90%	-
pH planta fresca	6%	-
Humedad Residual	13.3%	>14
Cenizas totales	13%	>12
Cenizas solubles en agua	35.7%	>7
pH planta seca	6.32%	-

3.2 Extracto liofilizado

El extracto liofilizado de Ilex guayusa fue obtenido mediante un proceso de sublimación del agua presente en el extracto para así obtener un material completamente seco. El proceso de obtención del extracto mostró un rendimiento de 40% (Tabla 10).

Tabla 10

Rendimiento del extracto

Peso Inicial	Peso Final	Rendimiento
6000 mg	2400 mg	40%

3.3. Control de calidad del extracto liofilizado

En la **Tabla 11**, se muestran los diferentes resultados del análisis organoléptico. ensayos fisicoquímicos del extracto liofilizado de la planta *Ilex guayusa*. Dicho extracto presentó una coloración marrón claro, olor aromático y aspecto chicloso. El pH de 6.6, ligeramente alcalino del extracto es apto para el consumo por vía oral, según Aragadvay, 2009. Finalmente, se determinó una densidad relativa de 0.974.

Tabla 11

Análisis organolépticos y fisicoquímicos

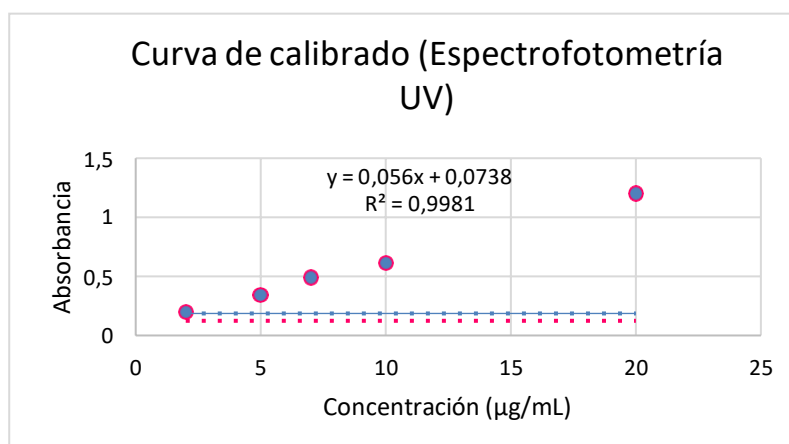
ANÁLISIS	RESULTADO
Color	Marrón claro
Olor	Aromático
Aspecto	Seco chicloso
Ph	6.6
Densidad	0.974

3.3.1.- Valoración del principio activo

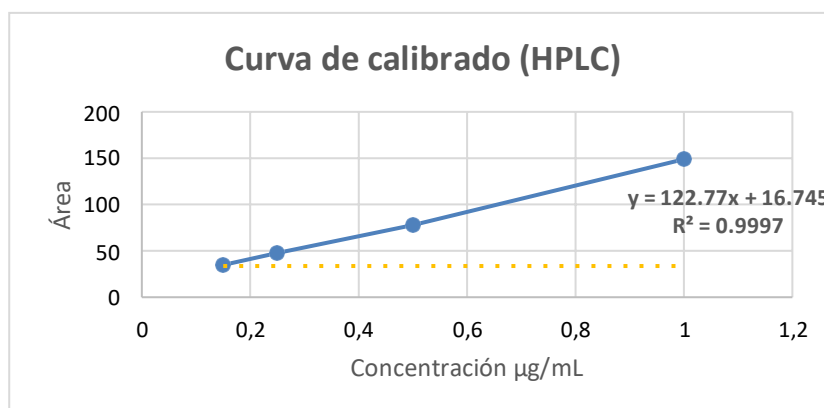
En los estudios por espectrofotometría UV-vis se confirmó el máximo de absorción (λ max) para el estándar de cafeína en 273 nm, por consiguiente, todas las muestras se analizaron a esta longitud de onda. Al representar gráficamente las absorbancias frente a la concentración de la curva de calibrado del estándar de cafeína se observó una linealidad de 0.998, sugiriéndose la fiabilidad del método analítico (Figura 10). Adicionalmente, para reconfirmar se optimizó el método de HPLC para cuantificar la cafeína obteniéndose una linealidad de 0.9997 en la curva de calibrado en un rango de concentración de cafeína de 0.15 a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11).

Figura 10

Curva de calibración obtenida mediante espectrofotometría UV-Vis

**Figura 11**

Curva de calibración obtenida mediante HPLC



Nota. Área versus concentración de cafeína en el rango de 0.15 a 1 µg/mL,

En la Tabla 12, se muestra la concentración de cafeína presente en el extracto de guayusa obtenida mediante las dos técnicas analíticas, mostrándose valores similares en ambos métodos, lo que sugiere confiabilidad en el resultado obtenido en este estudio. En términos generales, se tiene que por cada gramo de extracto existe 15.90 mg de cafeína según la espectrofotometría UV-visible y 14.65 según el método de HPLC.

Tabla 12

Cantidad de cafeína presente en el extracto de guayusa cuantificado mediante técnicas analíticas

Ensayo	Espectrofotometría	HPLC (mg)
	UV-visible (mg)	
Extracto 1 g	15.90	14.65

La cafeína es un compuesto químico que se encuentra de forma natural en componentes vegetales como los granos de cacao y café, las hojas de té, las bayas de guaraná y la nuez de cola, cuyo consumo se remonta a muchos años atrás, es psicoactiva y estimulante del sistema nervioso central (López, 2022).

3.4 Preformulación

3.4.1. Ensayos de solubilidad

La pre formulación de medicamentos se describe como un proceso de desarrollo, el cual se caracteriza por sus propiedades físicas químicas y mecánicas que permite diseñar las diversas formas farmacéuticas que traen consigo estabilidad y eficacia del producto. La caracterización del fármaco es uno de los pasos fundamentales en la preformulación de medicamentos que incluyen estudios de: solubilidad intrínseca cómo velocidad de disolución, coeficiente de reparto, estabilidad química, tamaño de partícula, superficie específica.

En la tabla 12 se puede observar la solubilidad en agua de los diversos excipientes ensayados, mostrándose una mayor solubilidad para el Maltitol con un tiempo de solubilidad de 10 segundos, lactosa con 40 segundos, PVP con 8 segundos, goma guar con 20 segundos, Aerocil con 30 segundos y benzoato de sodio con 20 segundos.

Tabla 13*Solubilidad de excipientes*

Excipiente	Agua (mL)	Tiempo de disolución (segundos)
Cel. Microcristalina	20	50
Almidón	20	25
Lactosa	20	40
Maltitol	20	10
Pvp	15	8
Goma Guar	15	20
Goma xantan	20	45
Alginato de sodio	20	120
CMC	20	120
Aerosil	15	30
Benzoato de sodio	20	20

3.5 Formulación

De las cuatro mezclas obtenidas en el diseño factorial, se eligió aquella que presentó mejor aspecto mediante análisis visual de características como homogeneidad en el tamaño de gránulo, consistencia y resistencia. Esta formulación está compuesta de los siguientes componentes.

Tabla 14*Fórmula final*

Función	Componentes	%
Principio activo	Extracto de Ilex guayusa	1.6
Diluyente	Maltitol	84.7
Aglutinante	Povidona	2.5
Desintegrante	Celulosa microcristalina	10
Lubricante	Aerosil	1
Conservante	Benzoato de sodio	0.2
		100 g

3.5.1 Control de calidad del producto terminado

3.5.1.1 Evaluación físico y química del producto

Los agregados sólidos o granulados están constituidos por partículas de polvo de fácil manipulación, tomando en cuenta el análisis organoléptico del producto final se evidencia un olor agradable y aromático, es uniforme, regular, posee buena fluidez, resistencia mecánica, humedad de 3 al 5% y buena solubilidad en agua.

Figura 12*Producto: granulado farmacéutico*

El granulado una vez disuelto en agua presenta un pH aproximado de 6.8. En cuanto a la caracterización reológica (Figura 12), los datos obtenidos a partir del estudio de ángulo de reposo fueron los siguientes:

Tabla 15

Ángulo de reposo del granulado de Ilex guayusa

N° MUESTRA	ALTURA	BASE	$\text{tg}(\alpha) = \frac{\text{altura}}{0,5 \cdot \text{base}}$
1	4 cm	13,5 cm	30,62 °
2	4,5 cm	12 cm	36,86 °
3	4,5 cm	13 cm	34,69 °
Media			34,02 °

El valor de ángulo de reposo obtenido a partir de las muestras por triplicado fue de 34.02° el cual es considerado “Bueno” como se puede observar en la tabla de criterios de la Farmacopea de los Estados Unidos (Tabla 19), lo cual indica las buenas propiedades reológicas del polvo analizado, evidenciándose así una buena movilidad de las partículas y posesividad entre ellas. (USP, 2012)

Tabla 16

Criterios para las propiedades de flujo

PROPIEDADES DE FLUJO	ANGULO DE REPOSO
Excelente	25-30
Bueno	31-35
Adecuado (no se necesita ayuda)	36-40
Aceptable (puede demorarse)	41-45
Pobre- es necesario agitar o someter a vibración	46-55
Muy pobre	56-65

Extremadamente Pobre	>66
----------------------	-----

Nota. Criterios de aceptación para ángulo de reposo, USP, 2012

Los datos obtenidos a partir del estudio de velocidad de flujo fueron los siguientes:

Tabla 17

Velocidad de flujo del granulado de Ilex guayusa

MUESTRA	TIEMPO
1	09, 27 s
2	05, 86 s
3	08, 68 s
Media	7,93 s

En donde se puede apreciar que el tiempo necesario para la caída total del polvo es de 7.93 segundos, considerándolo aceptable ya que de esto dependerá la fluidez del polvo mejorando el tiempo de mezclado y homogeneidad entre excipientes. Esto a su vez nos permite comprobar que el polvo analizado no posee una elevada humedad, la principal responsable de una pobre fluidez en los polvos, así como una buena interacción entre los diferentes tamaños de partículas de los excipientes usados, dando a entender que los excipientes utilizados en la formulación son adecuados debido a su compatibilidad entre ellos. (Benítez, 1996) (Real Farmacopea Española, 2015)

Figura 13

Velocidad de flujo del granulado



Conclusiones

El proceso de obtención del extracto de *Ilex guayusa* mostró un rendimiento de 40%.

El extracto liofilizado de la planta *Ilex guayusa* presentó una coloración marrón claro, olor aromático y aspecto chicloso.

Por cada gramo de extracto se cuantificó 15.90 mg de cafeína mediante espectrofotometría UV-visible y 14.65 mediante el método de HPLC.

El granulado de extracto de *Ilex guayusa* presentó un olor agradable y aromático, es uniforme, regular, posee buena fluidez, resistencia mecánica, humedad de 3 al 5% y buena solubilidad en agua.

El granulado de *Ilex guayusa* presentó un ángulo de reposo de 34.02° el cual es considerado "Bueno" y una velocidad de flujo aceptable de 7.93 segundos.

Recomendaciones

La materia prima (hojas de ilex guayusa) deben encontrarse secas para aprovechar la concentración de cafeína en ellas, colocarlas en un proceso de secado durante 3 o 4 días.

En el pesaje es necesario separar los excipientes y principio activo según su funcionalidad teniendo en consideración que se deben seguir las indicaciones de la formulación.

En la fase de granulación es necesario diluir primero el principio activo con el agua y seguidamente preparar la solución aglutinante.

Durante el secado del granulado es necesario colocarlo a 35 o 40 °C durante 1 día o en su defecto máximo 2 días; es necesario que el gránulo tamizado esté seco y no pastoso.

Referencias Bibliográficas

Andario, M. (2013). *CAPTOPRIL*.

Ansaloni, R., Wilches, I., Orellana, A., Tobar, V., Witte, P. De, & Leuven, U. (2010).

Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. 23, 89–97.

Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de formas farmacéuticas* (p. 686).

Bermúdez, A;Oliveira, M; Velazquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales Alexis Bermúdez , María a . Oliveira-Miranda. *Revista de Ciencia y Tecnología de América, 30.*

Bussmann, R. W. (2015). *Plantas medicinales de los andes y la amazonia-La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú Medicinal plants and their ecology in Northern Peru and Southern Ecuador View project Ethnobotany and livelihoods in Madagascar and Eastern Africa View project* (Issue November).
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3485.0962>

Caranqui Aldaz, J., Humanante, A., & Runa Tarpuna, F. (2000). *Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (Ilex guayusa Loess.) del Cantón Pastaza. Escuela Superior Politécnica Del Chimborazo.*
http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/767/1/Articulo_Guayusa.pdf

Cerecero, R., Morales, R., Torres, I., & Barrio, T. (2005). en médicos de atención primaria del estado de Morelos. *Rev Med IMSS, 43(4), 281–286.*
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.10.003>

Crespo, P. (2013). La guayusa trayectoria y sentido documento de Sistematización de experiencias. *Ministerio de Asuntos Exteriores de Finlandia (MAEF), Noviembre, 20.* <http://repiica.iica.int/docs/B3414e/B3414e.pdf>

Díaz, B. C., Cancino Botello, M. C., & Dragoi, A. (2013). Bebidas energizantes. *Revista*

Española de Drogodependencias, 38(384), 377–390.

http://www.aesed.com/descargas/revistas/v38n4_4.pdf

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud , en la población rural de Babahoyo . *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4).

Iveson-Iveson, J. (1979). Disease: its cause and effect. 1: Introduction. *Nursing Mirror*, 149(11), 24–26.

Lázaro, E. (2012). Preformulación y formulación de un gel reductor con extracto de toronja. *Universidad Nacional Autónoma De México*, 1, 115.
https://condor.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_lazaro_muniz.pdf

López, P., Pacheco, R., García, L., Ruíz, J., Rodríguez, F., & Royer, P. (2017). *Efectos de la Cafeína como Suplemento Ergogénico en Atletas y Población en General*. 53–62. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091472>

Lozano, R. P., García, Y. A., Tafalla, D. B., & Farré Albaladejo, M. (2007). Cafeína: Un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225–238.
<https://doi.org/10.20882/adicciones.303>

Medina, D., & Lopez, A. (2011). *Análisis crítico del diseño factorial 2k sobre casos aplicados. Critical analysis of 2k factorial design based on applied cases*. 47, 101–106.

Melo, V. (2014). *Composición y Análisis Químico de la Especie Ilex guayusa Loes* [Universidad San Francisco de Quito].
<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3269/1/000110421.pdf>

Montesdeoca, V. (2011). Elaboración y control de calidad de comprimidos fitoterapéuticos de ajeno, romero y manzanilla para combatir la menstruación dolorosa. In *Escuela Superior Politécnica del Chimborazo* (Vol. 1).
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>

Mora, A. (2019). Desarrollo de una bebida energética a base de guayusa, con la

- inclusión de maracuyá y miel. In *Universidad Católica de Santiago de Guayaquil* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Morales, M., Morales, J., Chateaneuf, R., & Benavides, M. (2009). Plantas medicinales , fitofarmacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica . *PLANTAS MEDICINALES Y MEDICINA NATURAL (Segunda Edición Ampliada) Conversaciones con el Ingeniero Roberto Williams Benavente. Plantas Medicinales y Medicina Natural, September.*
- Moratalla, R. (2008). Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos, 10(3)*, 201–207. [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(08\)76368-2](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(08)76368-2)
- Muzo, A. (2016). “*Elaboración De Una Forma Farmacéutica Para Disminuir Niveles De Colesterol En Sangre a Partir Del Extracto De Hojas De La Biblia, Planta Nativa Del Centro Cultural Uni- Shu De La Comuna Chiguilpe De Santo Domingo De Los Tsáchilas.*” 137. <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/4786/1/PIUABQF012-2016.pdf>
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja, 6(2)*, 3. <https://doi.org/10.17163/lgr.n6.2007.01>
- Robles, L. V. (2011). Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos; *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas, 42(1)*, 18–36.
- Ruiz, J. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación, 12(1)*, 41–47.
- Salvador, I. (2017). Plantas Medicinales En España. Uso, Propiedades Y Precauciones En La Actualidad [Universiad Complutence]. In *Zaguan.Unizar.Es*. <http://zaguan.unizar.es/TAZ/EUCS/2014/14180/TAZ-TFG-2014-408.pdf>
- Santacruz, M. D. P., Rodríguez, C. A., & Jiménez, M. L. (2017). Efectos de la cafeína en algunos aspectos de la salud y de la cognición. *Revista Colombiana de Rehabilitación, 6(1)*, 73. <https://doi.org/10.30788/revcolreh.v6.n1.2007.122>

- Schwarz, P., Body, J. J., Cáp, J., Hofbauer, L. C., Farouk, M., Gessl, A., Kuhn, J. M., Marcocci, C., Mattin, C., Muñoz Torres, M., Payer, J., Van De Ven, A., Yavropoulou, M., Selby, P., &)2014. غاوى درال شيبى. *European Journal of Endocrinology*, 171(6), 727–735. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0355>
- Sequeda-Castañeda, L. G., Modesti Costa, G., Celis, C., Gamboa, F., Gutiérrez, S., & Luengas, P. (2016). *Ilex guayusa* loes (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. *Pharmacologyonline*, 3, 193–202.
- Tavares, C., & Kimiko, R. (2012). Cafeína para el Tratamiento del Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 62(3), 387–401.
- Utreras, V. (2018). *Determinación de la concentración mínima de fenoles presentes en extractos etanólicos de hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes.) con mayor actividad inhibitoria en las enzimas α - y β -glucosidasa* [Universidad Central del Ecuador]. <http://200.12.169.19/bitstream/25000/19244/1/T-UCE-0008-CQU-152.pdf>
- Vila, J. (2001). *Volumen II ; Formas Farmacéuticas*. SÍNTESIS S.A.
- Villacís, J. (2017). ETNOBOTÁNICA Y SISTEMAS TRADICIONALES DE SALUD EN ECUADOR. ENFOQUE EN LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes). *Etnobiología*, 15(3), 101. <http://asociacionetnobiologica.org.mx/revista/index.php/etno/article/view/217/213>
- Villacrés, G. (2019). Evaluación de la actividad insecticida del extracto acuoso de Molle (*Schinus molle* L.) frente al gusano blanco de la papa. In *Universidad técnica de Ambato* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Real Farmacopea Española. (2002). *Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento (2a. ed.)*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Agencia Española de medicamentos y Productos Sanitarios. (2005). *Real Farmacopea Española*. España: Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado.
- Anthura . (06 de 05 de 2022). *Anthura Unlimited in varieties*. Fonte: La influencia del pH en el cultivo: <https://www.anthura.nl/growing-advise/la-influencia-del-ph-en-el-cultivo/?lang=es&cookies=ok>
- Baños, J., & Farré, M. (2002). *Principios de Farmacología clínica* . Barcelona : MASSON.
- Binipatía higienismo la fuente de la salud . (6 de 09 de 2022). *Binipatía higienismo la fuente de la salud* . Fonte: La formación de los radicales libres : <http://www.binipatia.com/la-formacion-de-los-radicales-libres/>
- Cseke, L. (2006). *Natural products from plants (2nd ed.)*. Boca Raton : CRC/Taylor & Francis.
- Cueva, R. (2018). EVALUACIÓN DE DOS ATRIBUTOS DE CALIDAD CRÍTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS UTILIZANDO LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO . *Revista de la Sociedad Química del Perú* , 465-476.
- EFSA . (06 de 09 de 2022). *EFSA*. Fonte: La cafeína : https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/efsa-explainscaffeine150527es.pdf
- García, . H. (1992). *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá : Editores tercer mundo .
- Hernández, G., Moreno, A., Zaragoza, F., & Porras, A. (2011). *Tratado de Medicina Farmaceutica*. España: Editorial Médica Panamericana.

- López, B. (09 de 08 de 2022). *La vanguardia* . Fonte: Estos son los efectos adversos de tomar demasiado café: <https://www.lavanguardia.com/vivo/longevity/20220501/8236173/son-efectos-adversos-tomar-demasiado-cafe-nbs.html>
- Muzo, A. (2016). "ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA PARA DISMINUIR NIVELES DE COLESTEROL EN SANGRE A PARTIR DEL EXTRACTO DEHOJAS DE LA BIBLIA, PLANTA NATIVA DEL CENTRO CULTURAL UNI- SHUDE LA COMUNA CHIGUILPE DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS". Ambato: Universidad Regional Autónoma de los Andes.
- Ochoa, A., Marín, J., & Rivero, D. (2013). *Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de Petiveria alliacea L. con acción antimicrobiana*. México: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.
- Pacha, A. (2012). "comprobación del efecto adelgazante de la tintura de guayusa (*Ilex guayusa*) en ratones (*Mus musculus*) con sobrepeso. Riobamba .
- Parikh, D. (2010). *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. New York: Informa healthcare.
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial*. Ecuador : La Granja .
- Ritsch, C. (2005). *The encyclopedia of psychoactive plants*. Rochester: Park Street.
- Rocha, M. (2018). Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de guayusa . *Universidad Central del Ecuador* .
- Salazar, R. (2001). *Gestión de calidad en el desarrollo y fabricación industrial de medicamentos* . España: Glatt Lbortecnic S.A.
- Sarango Granda, P. C. (6 de 09 de 2022). *RIUTPL*. Fonte: Optimización y evaluación in vitro de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de Piper ecuatorense Sodiro de la región sur del Ecuador.: <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/21490>

- Shemluck, M. (1978). The flowers of *Ilex guayusa*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard*, 155–160.
- Torres, G. (2013). *El Aprovechamiento De La guayusa*. Morona santiago: Macías & Ávila Comunicaciones.
- Villafuerte, L. (2011). *Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos*. México: Revista mexicana de ciencias farmacéuticas,.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (2012), USP NF 35, 30° edición, Washington, D.C.
- Beneitez E. Good Manufacturing Practices. La gestión técnica en la fabricación de medicamentos, consejos prácticos. Madrid: Centro de Estudios Superiores de la Industria farmacéutica; 1996.
- 2.9.36. Flujo de Polvo. Real Farmacopea Española. 5º ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Aprobada por la Orden SSI/23/2015, de 15 de enero (BOE de 21 de enero de 2015).