

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Composición y Análisis Químico de la Especie *Ilex guayusa* Loes.

Vinicio Alejandro Melo Gallegos

Carlos Fabara, M.Sc., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniero Químico

Quito, mayo de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Composición y Análisis Químico de la especie *Ilex guayusa* Loes.

Vinicio Alejandro Melo Gallegos

Carlos Fabara, MSc.
Director de Tesis

Diego Gangotena, MSc.
Miembro del Comité de Tesis

David Egas, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova, Ph.D.
Decana de la Escuela de Ingeniería
Colegio de Ciencias e Ingeniería, El Politécnico

Quito, mayo de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Vinicio Alejandro Melo Gallegos

C. I.: 1717176174

Fecha: Quito, mayo de 2014

DEDICATORIA

Con cariño y amor para las personas que estuvieron conmigo en todo momento, que me enseñaron la fe y me motivaron en los momentos que más lo necesitaba.

Papá y Mamá

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del Laboratorio de Química Analítica de la Universidad San Francisco de Quito y a la Fundación Runa por su apoyo durante la realización de este proyecto de investigación.

A mi supervisor Carlos Fabara MSc., por la oportunidad de ser parte del proyecto de investigación de la guayusa, por sus enseñanzas y disponibilidad.

A todos los miembros de la Fundación Runa por su conocimiento, tiempo y amistad: Eliot Logan MSc., Robin Grefa y Juan Dueñas MSc..

A David Egas PhD. por asistirme con su experticia en el HPLC y a los miembros del comité de tesis por su retroalimentación.

Finalmente, a todos mis amigos de la Universidad y en especial a Nicolás Cabrera, Daniel Aguilera y Daniela Dillon por su apoyo en la realización de este proyecto de investigación. Y de la misma manera, a mi profesor Gustavo Muñoz PhD. por su amistad e invaluable lecciones.

RESUMEN

Se realizó un análisis fitoquímico de la especie *Ilex guayusa* que incluyó determinar la capacidad antioxidante mediante el ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP, por sus siglas en inglés) y determinación de la cantidad de cafeína y teobromina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés). Las muestras de *Ilex guayusa* consistieron en hojas que fueron recolectadas en diferentes lugares geográficos de la amazonía ecuatoriana, con el fin de obtener resultados más amplios. Los métodos empleados para los análisis cuantitativos y cualitativos demostraron ser de alta precisión y de buena reproducibilidad, ya que los resultados mostraron ser comparables a los obtenidos con plantas similares como *Camellia sinensis*. La capacidad antioxidante resultó ser relativamente alta y los contenidos de cafeína y teobromina presentaron valores máximos de 16.64 y 0.56 mg/g de peso de hoja fresca respectivamente.

ABSTRACT

A phytochemical analysis of the species *Ilex guayusa* was performed. This included determining the antioxidant capacity by testing the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and determining the amount of caffeine and theobromine by high performance liquid chromatography (HPLC). The samples of *Ilex guayusa* leaves were collected from different geographical sites of the Ecuadorian Amazon, in order to obtain more comprehensive analysis. The methods used for quantitative and qualitative analysis proved high accuracy and good reproducibility and the results were shown to be comparable to those obtained from similar plants such as *Camellia sinensis*. The antioxidant capacity was found to be relatively high and the contents of caffeine and theobromine presented maximum values of 16.64 and 0.56 mg/g per fresh leaf weight respectively.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	12
1.1. Antecedentes y Justificación.....	12
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1. Objetivo General	15
1.2.2. Objetivos Específicos.....	15
2. Marco Teórico	16
2.1. Historia y Cultura de la guayusa.....	16
2.1.1. Cultivo.....	20
2.1.2. Preparación y Dosis.....	20
2.1.3. Uso Ritualístico.....	21
2.2. Nombres comunes	22
2.3. Formas y Subespecies.....	22
2.4. Origen y Distribución	22
2.5. Ecología	23
2.6. Taxonomía y Morfología.....	24
2.7. Usos Comerciales	25
2.8. Análisis Fitoquímico.....	26
2.8.1. Antioxidantes	26
2.8.2. Espectrofotometría	32
2.8.3. Poder Antioxidante Reductor Férrico	35
2.8.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	37
2.8.5. Metilxantinas.....	40
3. Métodos Experimentales	47
3.1. Recolección de las muestras en el campo.....	47
3.2. Preparación del extracto de guayusa.....	49
3.3. Determinación Cuantitativa de la Capacidad Antioxidante Total	49
3.3.1. Equipos.....	49
3.3.2. Reactivos.....	50
3.3.3. Procedimiento Experimental.....	50
3.4. Análisis Químico Cualitativo y Cuantitativo mediante Cromatografía Líquida- Líquida (HPLC)	51
3.4.1. Equipos.....	51
3.4.2. Reactivos.....	51
3.4.3. Procedimiento Experimental	51
4. Resultados y Discusión	53
4.1. Determinación Cuantitativa de la Capacidad Antioxidante Total	53
4.2. Análisis Químico Cualitativo y Cuantitativo mediante Cromatografía Líquida- Líquida (HPLC)	59
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	69
6. Bibliografía	71
7. Anexos	77
7.1. Anexo A: Muestras de <i>I. guayusa</i> recolectadas y su ubicación.....	77
7.2. Anexo B: Curva de Calibración de la Cafeína para el HPLC.....	82
7.3. Anexo C: Curva de Calibración de la Teobromina para el HPLC	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1.- Contenido de Cafeína en diferentes plantas	44
Tabla 2.2.- Contenido de Teobromina en diferentes plantas	45
Tabla 2.3.- Comparación entre Teobromina y Cafeína.....	46
Tabla 4.1.- Capacidad Antioxidante Total (FRAP)* (valores medios y desviaciones estándar para ensayos por duplicado).....	53
Tabla 4.2.- Contenido de Teobromina y Cafeína en las muestras de <i>I. guayusa</i>	59
Tabla 4.3.- Tiempos de Retención de Teobromina y Cafeína de los Estándares.....	61
Tabla 7.1.- Muestras de <i>I. guayusa</i> recolectadas y su ubicación.	77
Tabla 7.2.- Datos obtenidos para la curva de calibración de Cafeína.....	82
Tabla 7.3.- Datos obtenidos para la curva de calibración de Teobromina.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.- Collar de guayusa.....	17
Figura 2.2.- Dispersión geográfica de <i>I. guayusa</i> , de acuerdo a referencias históricas. Para comparación, vea la distribución de mate (<i>I. paraguariensis</i>) como planta espontánea y cultivada. (Patiño, 1968)	19
Figura 2.3.- Pequeña plantación de <i>I. guayusa</i> en Napo (Comunidad: Awatino)	20
Figura 2.4.- Distribución de <i>I. guayusa</i> en Colombia, Ecuador y Perú basado en registros históricos (Lewis et al., 1991)	23
Figura 2.5.- Planta de <i>I. guayusa</i>	25
Figura 2.6.- Estructuras electrónicas de especies reactivas de oxígeno comunes. (Held, 2010)	29
Figura 2.7.- Reacción de Oxido-Reducción de un Antioxidante con un radical libre.(Hamilton, 2007).....	30
Figura 2.8.- Componentes básicos de un espectrofotómetro (Shim, 2013)	33
Figura 2.9.- Medición de la capacidad antioxidante mediante el ensayo FRAP	35
Figura 2.10.- Oxidación del Ácido Ascórbico	36
Figura 2.11.- Instalación de un HPLC. (Agilent Technologies, 2009).....	38
Figura 2.12.- Rutas de biosíntesis de la cafeína a partir de xantosina.(Ashihara et al., 2011) 41	
Figura 2.13.- Molécula de Cafeína	42
Figura 2.14.- Molécula de Teobromina	44
Figura 3.1.- Recolección de muestras de <i>I. guayusa</i> en Orellana (Comunidad: Chiro Islas) ..	47
Figura 3.2.- Georreferenciación de las áreas de muestreo.	48
Figura 3.3.- Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractos	49
Figura 4.1.- Gráfico de barras de los niveles de capacidad antioxidante en cada una de las muestras.....	56
Figura 4.2.- Cromatograma de HPLC con detección UV a 254 nm de una mezcla de estándares de teobromina (a) (TR 5.530 min) y cafeína (b) (TR 7.713 min) con concentraciones de 0.1 y 1mg/mL respectivamente.....	62
Figura 4.3.- Cromatograma de una muestra de <i>I. guayusa</i> (código: PUM2).....	62
Figura 4.4.- Gráfico de barras de los niveles de teobromina en cada una de las muestras	63
Figura 4.5.- Gráfico de barras de los niveles de cafeína en cada una de las muestras.....	64
Figura 4.6.- Relación entre cafeína y teobromina en las muestras de <i>I. guayusa</i>	66
Figura 7.1.- Recta de Calibración de Cafeína.	82
Figura 7.2.- Recta de Calibración de Teobromina.	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y Justificación

Con una rica flora y diversas tribus indígenas, el noroeste del Amazonas nos ha dado cerca de 2,000 especies de plantas empleadas como medicamentos, venenos o narcóticos. Muchas o la mayoría de estas especies nunca han sido estudiadas químicamente, siendo la actividad biológica un indicador de la presencia de principios activos. Muchos de estos principios activos son, sin duda, nuevos para la ciencia. La flora amazónica - en especial la de la Amazonía occidental, la zona más rica de especies hylea - es un emporio inexplorado de compuestos químicos, algunos de cuales podrían tener efectos fisiológicos prácticos que podrían ser de interés en las farmacopeas modernas (Schultes, 1987). No en vano, los indígenas amazónicos han desarrollado un conocimiento ancestral estrechamente relacionado con la naturaleza que les permite vivir en armonía con las condiciones inhóspitas de la selva.

Se estima que existen 350,000 plantas en el mundo, de las cuales un tercio todavía esperan por descubrirse, y del cuarto de millón que han sido reportadas, sólo una fracción ha sido investigada químicamente. Muchos países han tomado conciencia del valor de la biodiversidad dentro de sus fronteras y han desarrollado sistemas para la exploración y la preservación. Sin embargo, la pérdida del hábitat todavía es la amenaza más grande hacia la biodiversidad.(Cseke, 2006)

En este sentido, la Amazonía ecuatoriana representa una de las áreas con mayor biodiversidad del planeta y por su enorme variedad de plantas se convierte en una fuente de interés permanente, especialmente para el desarrollo de nuevas materias primas en el mercado farmacéutico, cosmético y alimentario. Al interés comercial se unen también los intereses científico y antropológico, sobre todo cuando se trata de recuperar una de las plantas

sagradas de las nacionalidades indígenas que habitan en la región amazónica ecuatoriana conocida con el nombre vernáculo de guayusa. (Radice y Vidari, 2007)

Dentro de este contexto, los derivados químicos de las plantas adquieren el nombre de Productos Naturales (PNs), siendo explotados por los humanos como medios para tratar enfermedades, dolencias, e infecciones durante toda la historia humana conocida. Así, a nivel mundial, los PNs todavía son de gran importancia en el cuidado de la salud. Sin embargo, en la actualidad hay un gran debate sobre si los PNs retendrán su importancia como agentes farmacéuticos. A finales del siglo XX, la mayoría de compañías farmacéuticas habían reducido masivamente la inversión en la investigación de PNs. Concurrentemente, muchos entes interesados en el desarrollo internacional planteaban que era tiempo para incrementar el estudio de la diversidad de PNs en países menos desarrollados con el objetivo de generar negociaciones ganar-ganar en términos sociales, económicos y ambientales. (Firn, 2010) De esta manera, el enfoque en la caracterización fitoquímica de especies poco estudiadas (como *I. guayusa*) permite la orientación de las inversiones en el descubrimiento de nuevos productos farmacéuticos.

La planta de *I. guayusa* fue descrita por primera vez en 1901 por Theodor Loesner a partir de material estéril recolectado en 1898 por Warszewic en el oriente de Perú. Loesener llamó al acebo *Ilex guayusa*, porque los indígenas de la parte oriental de Colombia, Ecuador y Perú usaban estas hojas para preparar el té medicinal llamado guayusa. (Shemluck, 1979) Según registros históricos, el Ecuador contiene la mayor parte de plantaciones ancestrales de esta planta entre los tres países que se han reportado. (Radice y Vidari, 2007)

Aunque la planta es bien conocida para las comunidades locales, pocos botanistas la han recogido, y está pobremente representada en el herbario mundial. Esto se puede explicar porque la guayusa es una planta cultivada, lo que la ha hecho menos atractiva para los investigadores que buscan la flora silvestre. Otra razón, y la que se entiende mejor, es que

Ilex guayusa no presenta flores frecuentemente, por lo que ha provocado que los botánicos duden al momento de recolectar especímenes que no tienen ni flor ni fruto.

Consecuentemente, han sido los botánicos interesados en especies económicamente importantes los que han recolectado la mayor parte de especímenes de esta planta.

(Shemluck, 1979)

Dentro de este contexto, el conocimiento fitoquímico de la guayusa es limitado y la literatura científica es escasa, razón por la cual es necesaria una profunda investigación científica con el fin de evaluar su actividad biológica o farmacéutica y los posibles usos comerciales. Actualmente, los pocos datos fitoquímicos de esta planta solo revelan datos de su contenido de cafeína, así como la presencia de triterpenos y ácidos clorogénicos. (Radice y Vidari, 2007)

El presente trabajo de investigación busca elucidar el contenido de cafeína y teobromina, los cuales son importantes estimulantes del sistema nervioso central, diuréticos y vasodilatadores. Considerando estos y otros efectos fisiológicos de la cantidad de cafeína y teobromina que se consume, es trascendental estimar el contenido de estas metilxantinas en las hojas e infusiones de guayusa. Asimismo, la planta de guayusa al tener una estrecha relación taxonómica y morfológica con la planta de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) podría presentar importantes cantidades de compuestos antioxidantes, los cuales al tener efectos beneficiosos para la protección de diversos tipos de cáncer, colesterol, daño cerebral, diabetes, y bacterias patógenas, también se debería estudiar e investigar.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis es realizar una caracterización fitoquímica que incluye la determinación de la capacidad antioxidante, y la determinación del contenido de cafeína y teobromina en extractos acuosos de la especie *Ilex guayusa* Loes.

1.2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinar la capacidad antioxidante de extractos acuosos de *I. guayusa* desde el modelo *in vitro*: Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP, por sus siglas en inglés).
- Determinar el contenido de cafeína y teobromina en las hojas de *I. guayusa* mediante HPLC con una columna en fase reversa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Historia y Cultura de la guayusa

La guayusa es una planta sagrada, una fuente de vida para diversas tradiciones culturales amazónicas, pues sus hojas contienen una variedad de propiedades energéticas y medicinales y su consumo, el cual se remonta a épocas muy lejanas, constituye uno de los rituales más importantes para muchos pueblos amazónicos, sobre todo para los kichwa amazónico. (Jarret, Shiguango, y Salazar, 2012)

La guayusa, desde su descubrimiento hace siglos en una época conocida por el pueblo naporuna como kallari o ñawpa timpu (los primeros tiempos), ha sido ampliamente cultivada cerca de las casas de las familias y consumida en forma de té, hirviendo las hojas en ollas con agua sobre leña. En los diversos idiomas de las nacionalidades amazónicas del Ecuador, se conoce a la guayusa por varios nombres: *wais* en shuar, *emoteibiquime* en waorani y *waysa* en kichwa. (Jarret et al., 2012)

La historia de la guayusa es una historia fantástica pues es imposible relatarla sin incluir elementos ficticios que caracterizan a la filosofía de las culturas indígenas de la Amazonía. Un ejemplo de esto lo constituye una carta del jesuita de Nueva Granada, Juan Lorenzo Lucero que data de agosto 23 de 1683, dirigida al Virrey del Perú, Melchor Navarra y Rocafull, en la cual describe una excursión hecha en 1682 en la cuenca del Santiago o Río Parosa, un afluente del Río Marañón, una región habitada por los indígenas Jíbaros. La carta describe las actividades de los hombres conocedores sobre la medicina de la tribu, en beber ciertas bebidas durante el desempeño de sus rituales mágicos-medicinales, Lucero especifica:

“Juntan estas hierbas del diablo [Datura, Banisteriopsis, y otras plantas narcóticas], con guayusa y tabaco, también inventadas por el diablo, y las ponen a hervir hasta que la pequeña cantidad sobrante de zumo se convierte en la quintaesencia del demonio, y

la fe de aquellos que lo beben es recompensada por el diablo con el fruto de la maldición, y siempre para la gran desgracia de muchos...” (Patiño, 1968)

Para los Naporuna el consumo de la guayusa constituye un ritual sumamente importante para la armonía familiar y cultural, un tiempo de convivencia intensa. En la cultura naporuna, la gente acostumbra a despertarse para cocinar la sagrada guayusa entre las dos y cinco de la mañana. A veces utilizan las hojas recién cosechadas y otras veces las hojas secas, las últimas tradicionalmente se doblan y se guardan en hilos en forma de collares (Figura 2.1). Para prepararla, se hierve agua con las hojas de guayusa en ollas de barro (hoy en día más frecuentemente en ollas metálicas) durante más o menos una hora y se brinda en *kuya*, un tazón hecho de una fruta local despulpada y secada, la cual frecuentemente lleva diseños del sol, de boas y anacondas, de tigres, de flores de la selva, entre otros símbolos importantes (Jarret et al., 2012).



Figura 2.1.- Collar de guayusa

Mientras se toma la guayusa se realizan una serie de actividades sociales y productivas. De acuerdo a Jarret y otros:

Los naporuna aprovechan de “la hora de guayusa” para prepararse para el día, planificando las actividades que van a realizar y fabricando herramientas necesarias para el trabajo en la selva. Además, utilizan la “la hora de guayusa” para conversar entre la familia para resolver conflictos y dar consejos a los niños y jóvenes para la reorientación, reintegración y fortalecimiento de los miembros jóvenes de la familia. (2012)

En la cosmovisión indígena el ritual tiene un significado de purificación, inducción de “pequeños sueños” para adivinar si la expedición de caza será exitosa y también se consume como bebida de “buen presagio”. Es así que, en los rituales es consumida en concentraciones altas para soñar y poder ver el futuro, destacándose que el empleo tradicional de la guayusa entre las nacionalidades indígenas de la amazonía ecuatoriana es muy antiguo (Acosta-Solís 1972; Schultes 1972; Spruce 1996); por ejemplo, los Achuar del sur de Ecuador se han acostumbrado y aún lo practican, a tomar infusión de guayusa antes de salir a sus expediciones de cacería o de pesca. Estos hechos de uso ancestral de la guayusa demuestran que se deben intensificar los estudios farmacéuticos, porque indican diferentes empleos de esta planta en la etnomedicina y que requieren ser más profundizados con pruebas fitoquímicas. (Radice y Vidari, 2007)

El uso ritualístico de la guayusa en Suramérica es muy antiguo y poco conocido. En tierras altas de Bolivia se descubrieron hojas envueltas que servían de ajuar funerario y que mediante la prueba de radiocarbono resultaron ser de 335 E.C. Los análisis químicos revelaron que las hojas todavía contenían cafeína. Las hojas de guayusa se encontraron junto con la parafernalia para fumar tabaco y artefactos para administrar enemas. Empero es incierto si las hojas se usaban para hacer rapés estimulantes o enemas psicoactivos. (Phagan, 1974)

Ya en los siglos XVII y XVIII, jesuitas y otros misioneros sugirieron que la planta fue usada para propósitos psicoactivos y medicinales. (Schultes, 1972) Es posible que el uso de la guayusa fuera mucho más generalizado en la era precolombina que hoy en día. Parece que la gran demanda por la planta llevó a su cultivo a gran escala. (Schultes, 1979)

El botánico inglés Richard Spruce (1817 – 1893) hizo un registro preciso de la utilización de guayusa, pero sorprendentemente descuidó recoger cualquier material botánico. (Schultes, 1972) La planta fue descrita por primera vez a principios del siglo XX. (Shemluck, 1979) Incluso hoy en día, poco se sabe sobre la planta, y mucha investigación etnofarmacológica queda por hacer.

De acuerdo a las referencias históricas la guayusa se ha reportado como se muestra en la Figura 2.2

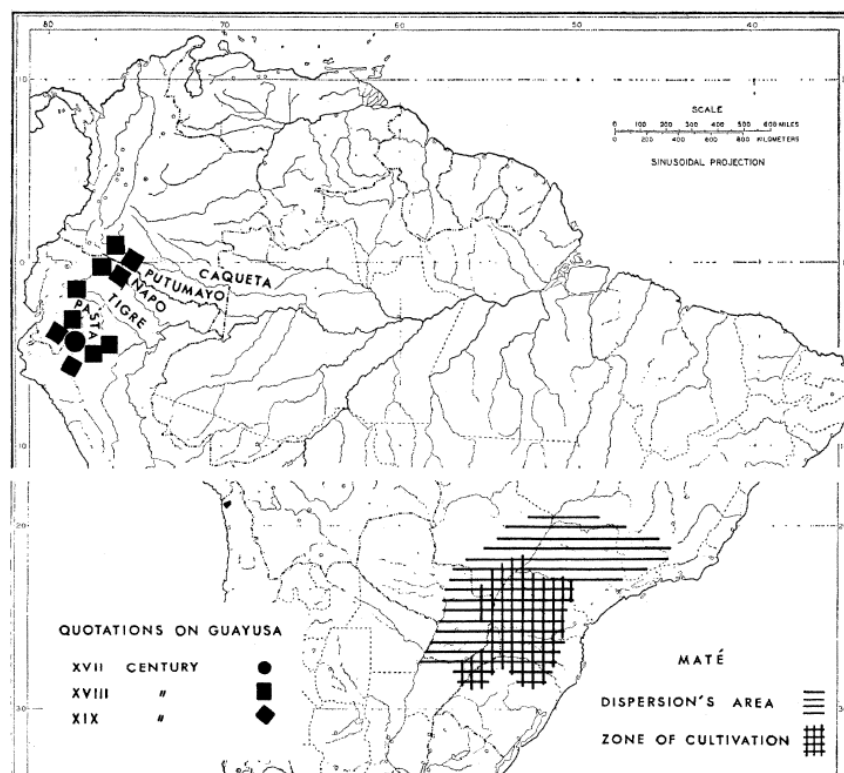


Figura 2.2.- Dispersión geográfica de *I. guayusa*, de acuerdo a referencias históricas. Para comparación, vea la distribución de mate (*I. paraguariensis*) como planta espontánea y cultivada. (Patiño, 1968)

2.1.1. Cultivo

La propagación ocurre solo con estacas que se cultivan en los jardines de las casas o en pequeñas plantaciones. (Fundación Runa, 2013)



Figura 2.3.- Pequeña plantación de *I. guayusa* en Napo (Comunidad: Awatino)

2.1.2. Preparación y Dosis

Las hojas arrancadas se enroscan en una cadena y se cuelgan a secar, ya sea al sol o en la casa. Las hojas secas se hierven a fuego lento durante al menos diez minutos, pero preferiblemente durante treinta minutos o una hora entera.

En general, cinco hojas son suficientes para preparar una taza llena con esta infusión. (Schultes, 1979) Un análisis químico de una bebida de guayusa preparada por los Jíbaro (Achuar) reveló que contenía 3.3% de cafeína. Cada mañana los hombres consumen un promedio de 2.2 litros de bebida. La mayoría de ellos vomitan la mitad de esto luego de 45 minutos. Como resultado, ingieren aproximadamente 690 mg, el equivalente a ocho tazas de café (*Coffea arabica*). (Lewis et al., 1991)

Los Jíbaros a menudo hierven las hojas durante horas o incluso durante toda la noche. Aunque sólo a los hombres Jíbaros se les permite hacer guayusa (o *wayus* como la conocen ellos), las mujeres y niños también beben la infusión.

2.1.3. Uso Ritualístico

Debido a que casi no hay evidencia aparte de la que se ha encontrado en tumbas, sólo se puede conjeturar sobre su uso precolombino en Suramérica. Sin embargo, el descubrimiento de las hojas de guayusa en la tumba de un curandero en Bolivia perteneciente a la cultura Tiahuanaco demuestra que la hojas se conocían y que eran un objeto codiciado; tanto como para ser consideradas un ajuar funerario. (Phagan, 1974)

Del mismo modo, la guayusa tiene una larga tradición de ser un afrodisiaco. En Ecuador, se dice que cuando una persona le entrega la guayusa a un amante, este siempre regresará, no importa que tan lejano sea el trayecto. Asimismo, los indígenas de la frontera oriental de los Andes beben guayusa como un tónico, como un ritual emético, y para tener “sueños de caza”.

El mejor ejemplo del uso de la guayusa es el ritual diario entre los Jíbaros. Cada mañana, por un periodo de alrededor de una hora, y frecuentemente en la compañía de otros, los hombres de la tribu beben unos 2.2 litros de infusión de guayusa que ha sido hervida por al menos una hora. A continuación, introducen un dedo por la garganta o consquillean su garganta con una pluma de manera que inducen el vomito. (Patiño, 1968) Esto causa la regurgitación de casi la mitad de líquido que consumieron. La bebida les despierta y les da fortaleza, y según sus aseveraciones, luego de consumir la guayusa no necesitan comer nada en todo el día (un efecto importante para un cazador). El vómito que sigue al consumo de grandes cantidades de guayusa no parece ser causado por sustancias contenidas en la bebida sino que es una práctica corporal aprendida. (Lewis et al., 1991) Del mismo modo, se dice

que el vómito les ayuda a expulsar a los alimentos no digeridos desde el día anterior.

(Schultes, 1979)

De acuerdo al investigador colombiano Patiño (1968), se conoce que además de los Jíbaros las siguientes tribus usan guayusa: Omagua, Kokama, Panobo, Kaschibo, Koto, Pioche, Lamisto, Kichos, Canelo, Mocoa, Aguano, Kandoschi, Sabela, Chivaro, Mayoruna, Tschayahuita, Tschamikuro, Chebero, Omaruna, Yagua, Auischiri, Ssimaky, Ikito, Zaparo, Yameo y Pintsche.

2.2. Nombres comunes

De acuerdo a Patiño (1968) los nombres comunes tanto del árbol como de la infusión son:

Aguayusa, guayusa, huayusa, guañusa, guayyusa, wayusa, en el oriente de Ecuador.

Para los Jíbaros el árbol se llama *weisa*, y se llama *kopíniak*, en el idioma záparo.

2.3. Formas y Subespecies

Los indígenas amazónicos hacen distinción entre la forma silvestre y la planta cultivada. Pero aparte de esto, hasta la fecha, no se han reportado variedades u otras formas. Sin embargo, se ha sugerido que *Ilex guayusa* es una forma cultivada de *Ilex paraguariensis*. (Shemluck, 1979)

2.4. Origen y Distribución

Conocido casi exclusivamente del cultivo, *Ilex guayusa* Loes. (Aquifoliaceae) crece como un arbusto o árbol pequeño desde el sur de Colombia hasta el norte de Perú (Figura 2.4).

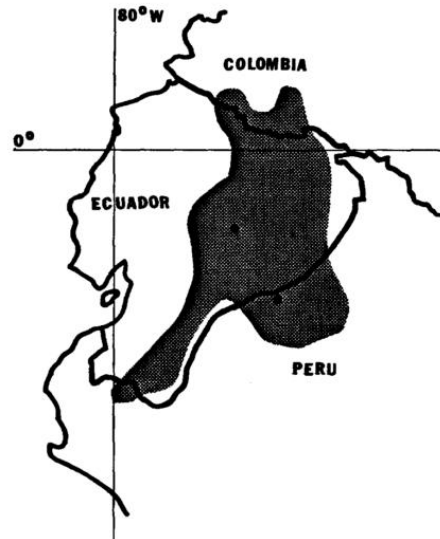


Figura 2.4.- Distribución de *I. guayusa* en Colombia, Ecuador y Perú basado en registros históricos (Lewis et al., 1991)

2.5. Ecología

Casi 600 especies de *Ilex* (Aquifoliaceae) son ahora reconocidas y la mayoría de ellas se encuentran en la América tropical y Asia oriental. (Loizeau, Barrera, Manen, y Broennimann, 2005)

De acuerdo a Loizeau y otros:

Ilex ocurre sobre todo en los trópicos, pero se extiende en las regiones templadas de climas oceánicos hasta los 63° N (América, Eurasia) y a 35° S (América, África). Hay cerca de 300 especies en América tropical, cerca de 250 especies en el sureste de Asia, cerca de 30 especies de América del Norte, cuatro especies en Europa (incluyendo las especies endémicas de las Islas Canarias, Madeira y Azores), unos pocos especies en las islas del Pacífico, uno en el noreste de Australia y uno en África subsahariana. América tropical y el sudeste de Asia son los centros importantes de diversidad de especies de este género. Las especies de *Ilex* se encuentran desde las tierras bajas hasta bosques montañosos (perturbado o primario) hasta 4,000 metros de elevación en los Andes y en la región del Himalaya. La familia se encuentra

generalmente en hábitats húmedos y está totalmente ausente de zonas muy secas.(2005)

En Ecuador, de acuerdo a Loizeau y Barrera (1999), la guayusa se encuentra como un árbol silvestre y cultivado; que se puede encontrar desde la región Andina baja hasta la Amazonía (0 – 1,500 msnm). Su presencia se ha reportado en las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe.

2.6. Taxonomía y Morfología

De acuerdo a Radice y Vidari:

“*Ilex guayusa* Loes. pertenece a la familia Aquifoliaceae y es reconocida con el nombre castellano de guayusa que significa infusión. Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, donde es silvestre, pero también está presente en ciertos lugares subtropicales de la región andina en estado cultivado. En general, los individuos de esta especie alcanzan un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, poseen un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 50-80 cm, tienen una copa irregular y presentan un follaje denso. En la localidad de San Luis ubicada cerca de Sevilla Don Bosco (provincia de Morona Santiago), se ha reportado la existencia de un bosque natural de árboles de guayusa con individuos que alcanzan una altura de 20 m y tienen un DAP de 80 a 90 cm.

El tronco tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura del pecho, corteza blanca y textura lisa. Las ramas son extendidas y flexibles. Las hojas son coriáceas, verde-oliváceas, enteras, oblongo-elípticas, simples, alternas, coriáceas, dentadas, glabras o subglabras en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda, 15 - 21 cm de largo, 5 - 7.5 cm de ancho, pecíolo corto de 1 cm de largo (Figura 2.5). El fruto es una baya

globosa de casi 1 cm de ancho y verde. La flor posee una corola blanco verdosa con pétalos obtusos, estambres en igual número que los pétalos, anteras oblongas, ovario sécil subgloboso y usualmente con 4-6 cavidades.” (2007)

La floración se da de marzo a noviembre. (Loizeau y Barrera, 2007)



Figura 2.5.- Planta de *I. guayusa*

2.7. Usos Comerciales

De los cuatro géneros de la familia Aquifoliceae, el género *Ilex* es el de mayor importancia económica, ya que un gran número de especies se emplean como plantas ornamentales y medicinales. Las especies que se destacan como fuente de varias preparaciones ricas en cafeína y teobromina son: *Ilex vomitoria* Aiton (yaupon), *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. (yerba mate) e *Ilex guayusa* Loes. (guayusa). (Radice y Vidari, 2007)

Para diversas nacionalidades indígenas amazónicas en el Ecuador esta especie se utiliza en infusión como un té tónico para la salud con características purgativas y

estimulantes. Los Shuar utilizan a la guayusa como una bebida emética. (Loizeau y Barriera, 2007)

Debido a la semejanza con la planta *Ilex paraguayensis*, también se la conoce como el “mate ecuatoriano”, pues su consumo en la región amazónica del Ecuador presenta paralelismo con la cultura de consumo de yerba mate de los pueblos guaraníes y guaycurúes. No obstante, la diferencia radica en que la yerba mate se ha convertido en una industria que produce alrededor de 500,000 toneladas por año (Robson, 2013). En comparación con la producción de guayusa del 2013 que fue de 120 toneladas al año (Fundación Runa, 2013), esto representa un 0.024% de la producción de yerba mate, lo cual constituye un indicador para evaluar el potencial de negocio que tiene la producción de esta planta. Esto es más importante si se considera que la guayusa ha demostrado tener un mayor contenido de cafeína (Lewis et al., 1991), y que al ser una planta silvestre de la Amazonía ecuatoriana su cultivo es una alternativa con un componente ambiental y social relevante.

2.8. Análisis Fitoquímico

Los fitoquímicos, como su nombre lo indica, son compuestos químicos individuales, los cuales están en las plantas. (Kaufman, Briemann, Cseke, Setzer, y Kirakosyan, 2006). En el presente trabajo de investigación se estudia los antioxidantes, y el contenido de las metilxantinas cafeína y teobromina por HPLC.

2.8.1. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula lo suficientemente estable para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo de este modo su capacidad de hacer daño. (Lobo, Patil, Phatak, y Chandra, 2010) Estas moléculas tienen una importancia especial para la salud humana, pues está bien establecido el hecho de que un bajo consumo de antioxidantes está asociado con riesgos elevados de desarrollar enfermedades degenerativas y no se disminuye

el proceso de envejecimiento. (Hamilton, 2007) No obstante, el exceso en el consumo de antioxidantes también está asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer a la piel o los pulmones. (Albanes et al., 1996; Hercberg et al., 2007)

Un radical libre puede ser un átomo o una molécula que lleva un electrón no apareado y es extremadamente reactivo, capaz de participar en una reacción de rápido cambio que desestabiliza a otras moléculas y generar más radicales libres. (Mandal, Yadav, Yadav, y Nema, 2009) Desde el punto de vista biológico, los antioxidantes retardan o inhiben el daño celular debido a su propiedad de neutralización de los radicales libres. De esta manera, los antioxidantes pueden interactuar con los radicales libres y terminar la reacción en cadena antes de que moléculas vitales sean dañadas. (Lobo et al., 2010) En plantas y animales los radicales libres son desactivados por los antioxidantes, los cuales actúan como inhibidores del proceso de oxidación, incluso a concentraciones relativamente pequeñas (Mandal et al., 2009)

El proceso de oxidación es una reacción química en la cual un elemento entrega uno o más de sus electrones a un átomo diferente. En un principio, el término oxidación solo se aplicaba a una reacción en la que el oxígeno se combinaba con otro elemento o grupo de elementos para formar un compuesto llamado óxido. Algunos ejemplos incluyen la combustión del carbón que es una oxidación rápida al igual que oxidación del hierro, el proceso de respiración en el que el dióxido de carbono un producto de esta reacción.

El elemento cuyos átomos pierden electrones durante la oxidación se dice que se oxida. El otro elemento, cuyos átomos ganan electrones, se llama agente oxidante. El agente oxidante se dice que es reducido, y el proceso de ganar electrones se llama reducción. La oxidación y la reducción ocurren siempre simultáneamente, y por tanto se usa el término oxidación-reducción (o redox) cuando se refiere a este tipo de reacción.

2.8.1.1. Historia

El término antioxidante originalmente fue usado para referirse específicamente a un químico que prevenía el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y principios del XX, extensos estudios se realizaron sobre los antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión en metales, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en el ensuciamiento de motores de combustión interna. (Lobo et al., 2010)

Investigaciones anteriores sobre el rol de los antioxidantes en la biología se centraban en su uso para prevenir la oxidación de grasas insaturadas, causa principal de la rancidez. La actividad antioxidante podía ser medida simplemente al colocar grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y se medía la rapidez de consumo del oxígeno. Sin embargo, fue la identificación de las vitaminas A, C, y E como antioxidantes lo que permitió elucidar la importancia de estos en la bioquímica de los organismos vivos. Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes fueron explorados por primera vez cuando se reconoció que una sustancia con actividad antioxidante tiene una alta probabilidad de oxidarse fácilmente. Investigaciones en cómo la vitamina E previene el proceso de peroxidación lipídica permitieron la identificación de antioxidantes como agentes reductores que previenen las reacciones de oxidación. (Lobo et al., 2010)

2.8.1.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Radicales Libres

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son un conjunto de moléculas reactivas y radicales libres que provienen del oxígeno molecular. La mayor parte de ROS son generadas como subproductos durante el transporte de electrones mitocondrial. Además, las ROS son formadas como intermediarios necesarios de reacciones catalizadas por metales. El oxígeno atómico tiene dos electrones desapareados en orbitales

separados en su capa electrónica exterior. Esta estructura electrónica hace al oxígeno susceptible a la formación de radicales. La reducción secuencial del oxígeno por la adición de electrones lleva a la formación de ROS incluyendo: superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, ion hidroxilo; y óxido nítrico. (Held, 2010) En la Figura 2.6 se puede observar cada una de estas estructuras, el punto rojo indica un electrón desapareado.

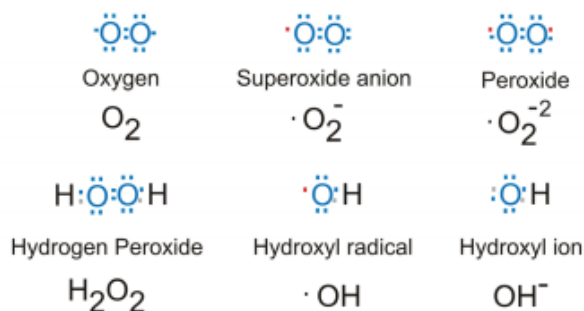


Figura 2.6.- Estructuras electrónicas de especies reactivas de oxígeno comunes. (Held, 2010)

2.8.1.3. Reacciones de oxidación y mecanismos de acción de los antioxidantes

Los radicales libres son tan reactivos que, fácilmente arrancan un electrón de otro par de electrones en un enlace químico cercano, que no sólo destruye el enlace, sino que también crea otro electrón no apareado (i.e. un nuevo radical libre). (Hamilton, 2007) Esto conlleva a una reacción en cadena que potencialmente puede causar mucho daño.

En el cuerpo humano, los tres tipos principales sistemas de autodefensa contra los radicales libres son: sistemas de enzimas antioxidantes, nutrientes antioxidantes (vitaminas y minerales) y antioxidantes fitoquímicos. Todos estos sistemas tienen algo en común, son capaces de donar un electrón a un radical libre, el cual efectivamente aplaca al radical libre y lo hace inofensivo. (Hamilton, 2007)

Las reacciones de óxido-reducción se dan como se muestra en la Figura 2.7. La molécula antioxidante puede fácilmente donar un electrón al radical libre, para que el electrón del radical libre se aparee. Esto hace que el radical libre se convierta en una molécula estable deteniendo la reacción en cadena que normalmente llevaría a cabo. Al

mismo tiempo, aunque el antioxidante ahora tiene un electrón menos, su estructura molecular le permite permanecer estable. (Hamilton, 2007)

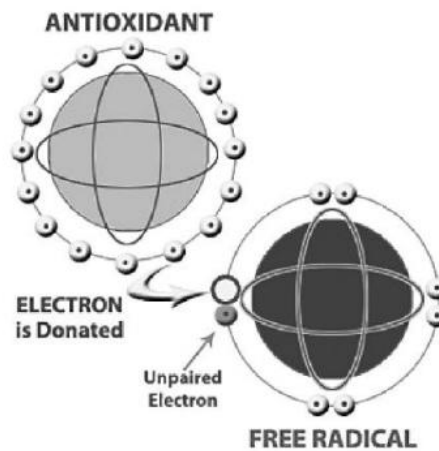


Figura 2.7.- Reacción de Oxido-Reducción de un Antioxidante con un radical libre.(Hamilton, 2007)

Se han propuesto dos mecanismos principales de acción para los antioxidantes. El primero es un mecanismo de rompimiento de cadena en el cual el antioxidante primario dona un electrón al radical libre en un sistema de autodefensa. El segundo mecanismo involucra la eliminación de los iniciadores de ROS mediante la neutralización rápida del catalizador de la reacción en cadena (antioxidantes secundarios). Los antioxidantes pueden ejercer su efecto sobre sistemas biológicos por diferentes mecanismos incluyendo donación de electrones, quelación de iones metálicos, actuando como co-antioxidantes, o por la regulación de la expresión genética. (Lobo et al., 2010)

2.8.1.4. Niveles de acción antioxidante

Los antioxidantes pueden actuar en diferentes niveles, estos son análogos a líneas de defensa contra radicales libres y se los puede clasificar según este criterio de la siguiente manera:

Antioxidantes primarios

Son antioxidantes preventivos, los cuales suprimen la formación de radicales libres. Aunque el mecanismo preciso y sitio de la formación de radicales *in vivo* no está bien elucidado todavía, las descomposiciones de hidroperóxidos y del peróxido de hidrógeno deben ser fuentes importantes. Para suprimir estas reacciones, algunos antioxidantes reducen a los hidroperóxidos y al peróxido de hidrógeno de antemano para convertirlos en alcoholes y agua, respectivamente, sin la generación de radicales libres. Algunos ejemplos de este tipo de antioxidantes son la glutatión peroxidasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPX, por sus siglas en inglés), y las enzimas peroxidases. (Lobo et al., 2010)

Antioxidantes secundarios

Son los antioxidantes que capturan a los radicales activos para suprimir la iniciación de la reacción en cadena y/o impiden las reacciones de propagación. Algunos ejemplos de este tipo de antioxidantes son la vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, y tioles como antioxidantes hidrofílicos, mientras que la vitamina E y el ubiquinol son antioxidantes lipofílicos. (Lobo et al., 2010)

Antioxidantes terciarios

Son antioxidantes de reparación. Es decir, reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Las enzimas proteolíticas, proteinasas, proteasas, y peptidasas, presentes en el citosol y la mitocondria de las células de mamíferos, reconocen, degradan, y eliminan las proteínas modificadas por oxidación y previenen la acumulación de proteínas oxidadas. Otros ejemplos son las enzimas glicosilasas y nucleasas, las cuales reparan el ADN dañado. (Lobo et al., 2010)

2.8.1.5. Antioxidantes vegetales

Las acciones farmacológicas de los flavonoides, lignanos, alcaloides, bisbenzilos, cumarinas y terpenos de las plantas han sido extensamente estudiadas. (Agrawal, 2011) (MacRae y Towers, 1984) (Roberts y Wink, 1998) (Nacci, 2008). Se ha encontrado que algunos terpenoides podrían inhibir el crecimiento de tumores. (Kuttan, Pratheeshkumar, Manu, y Kuttan, 2011) Y de la misma manera, los alcaloides se han introducido en el uso clínico debido a su actividad antitumoral y baja neurotoxicidad. (Chen et al., 2005) Las cumarinas también han sido usadas para tratar infecciones. Por ejemplo, se ha observado que este tipo de compuestos ofrecen una alternativa para tratar lesiones de leishmaniasis en ratones (Tiuman et al., 2012), o aumentan la resistencia en infecciones por Salmonella en ratones (Stefanova et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que la cumarinas tienen actividades antitumorales, inmunomoduladoras, y antibacteriales. (Lacy y O'Kennedy, 2004) Los flavonoides y fenoles también tienen actividades antitumorales, antivirales y antibacteriales y sus propiedades antiradicales y antioxidativas han sido estudiadas extensivamente. (Ng, Liu, y Wang, 2000)

Se ha sugerido que los radicales libres y la peroxidación lipídica son agentes importantes en el envejecimiento y en diversas enfermedades humanas. (Ng et al., 2000) Por tanto, en años recientes, ha habido una explosión de investigación en PNs. (Borris, 1996) Muchos de estos muestran capacidades antioxidantes muy notables. (Hamilton, 2007)

2.8.2. Espectrofotometría

La espectrofotometría es la medición cuantitativa de las propiedades de transmisión de un material como función de su longitud de onda. El principio básico es que cada componente en una muestra absorbe o transmite luz sobre cierto rango de longitud de onda. Esta medición se usa generalmente para determinar la cantidad de un componente conocido.

De esta forma, el espectrofotómetro es el instrumento que se emplea para medir la cantidad de luz que una muestra absorbe. El instrumento funciona haciendo pasar un haz de luz a través de una muestra y midiendo la intensidad de la luz que llega a un detector. En este sentido, los dos tipos de espectrofotómetros más comunes son: el espectrofotómetro UV-Visible (emisión de luz entre 185 – 700 nm) y el espectrofotómetro IR (emisión de luz entre 700 – 1500 nm).

Los componentes básicos de un espectrofotómetro se muestran en la Figura 2.8. La fuente de luz emite una corriente de fotones, los cuales atraviesan un colimador para homogenizar la trayectoria de los fotones, a partir del haz paralelo de fotones estos pasan por un monocromador o selector de longitud de onda y finalmente atraviesan la muestra en una cubeta, para ser detectados a la salida por un detector fotoeléctrico, el cual permite la proyección de una señal en una pantalla digital. Se necesita de un espectrofotómetro para producir una variedad de longitudes de onda debido a que diferentes compuestos absorben mejor a diferentes longitudes de onda. (Atkins, 2011)

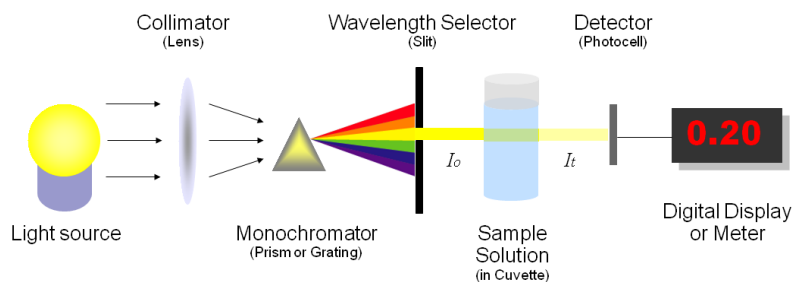


Figura 2.8.- Componentes básicos de un espectrofotómetro (Shim, 2013)

La cantidad de fotones que pasan por una cubeta y el detector es dependiente de la longitud de la cubeta y la concentración de la muestra. Una vez que se conoce la intensidad de la luz que pasa por la cubeta, se puede relacionar a la transmitancia (T). La transmitancia es la fracción de luz que pasa por una muestra (Atkins, 2011). Esto se puede calcular usando la ecuación:

$$\text{Transmitancia } (T) = \frac{I_t}{I_o} \quad (2.1)$$

donde I_t es la intensidad de la luz luego de que el haz atraviesa por la cubeta e I_o es la intensidad de la luz antes de que el haz pase por la cubeta. La transmitancia está relacionada a la absorción por la expresión:

$$\text{Absorbancia } A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_o} \quad (2.2)$$

La absorbancia representa la cantidad de fotones que son absorbidos. Con la cantidad de absorbancia conocida de la ecuación (2.2) se puede determinar la concentración desconocida de la muestra usando la ley de Beer-Lambert.

La ley de Beer-Lambert establece que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de una muestra (Atkins, 2011). Por esta razón, la ley de Beer sólo puede aplicarse cuando hay una relación lineal. De este modo, la ecuación es:

$$A = \epsilon bc \quad (2.3)$$

donde A es la medida de la absorbancia (sin unidades), ϵ es el coeficiente de absorptividad, b es longitud de la trayectoria por la cual pasa la luz, y c es la concentración. (Atkins, 2011) Debido a que b tiene un valor estándar igual a 1 cm, se puede calcular la concentración de una muestra a partir de una curva de calibración que mantenga la linealidad dentro de un rango de concentración específico, lo cual implica que esto es verdadero solo para muestras diluidas.

La linealidad de la ley de Beer-Lambert está limitada por factores químicos e instrumentales. Las causas de la no linealidad incluyen:

- 1) Desviaciones en los coeficientes de absorptividad a altas concentraciones (>0.01M) debido a interacciones electrostáticas entre moléculas que se encuentran en proximidad.

- 2) Dispersión de la luz por partículas en la muestra
- 3) Fluorescencia o fosforescencia de la muestra.
- 4) Cambios en el índice de reflexión a concentraciones altas del analito.
- 5) Cambios en los equilibrios químicos como una función de la concentración.
- 6) Radiación no monocromática, las desviaciones pueden ser minimizados mediante el uso de una parte relativamente plana del espectro de absorción, tales como el máximo de una banda de absorción.
- 7) Luz difusa.

2.8.3. Poder Antioxidante Reductor Férrico

El método utilizado para determinar la capacidad antioxidante consiste en la medición de la capacidad de una muestra para reducir el ión Fe (III) a ión Fe (II). El complejo Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s-Triazina) se agrega en el medio de reacción a pH bajo, cuando este complejo está en presencia de agentes reductores se reduce a Fe^{2+} -TPTZ el cual desarrolla un color azul intenso con una absorción máxima de 593nm. (Benzie, 1999) Las condiciones del ensayo benefician la reducción del complejo y están establecidas de manera que la formación del color ocurra sólo con el efecto de la muestra agregada y no por causas artificiales (Figura 2.9).

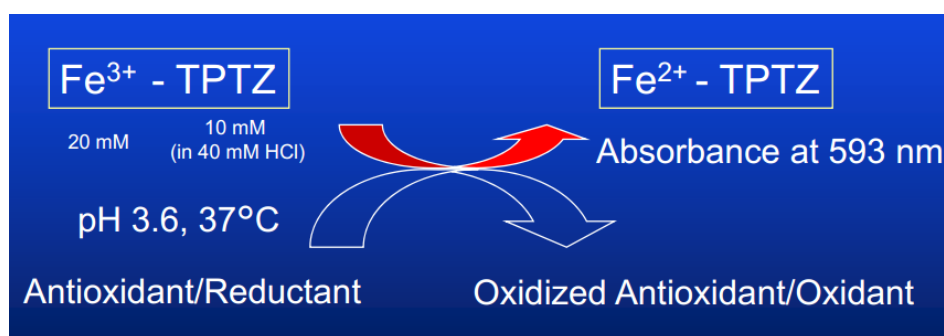


Figura 2.9.- Medición de la capacidad antioxidante mediante el ensayo FRAP. (Langley-Evans, 2000a)

2.8.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “chroma” (color) y “graphein” (escribir). Skoog define a la cromatografía como:

“Una técnica en la cual los componentes de una mezcla son separados en base a la velocidad de elución de estos en una fase estacionaria por una fase móvil que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico.” (2007)

Los métodos cromatográficos se clasifican atendiendo a la naturaleza de la fase móvil (gas o líquido), de la fase estacionaria (líquido o sólido), del soporte utilizado (columna, papel o placa), del mecanismo de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico o permación en gel) e incluso del tipo de soluto (iones, proteínas, polímeros, etc). En cromatografía líquida se utiliza como mecanismo de separación el reparto, cuando la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil el sistema se denomina fase reversa y, por tanto, los analitos polares tienen menos afinidad por la fase estacionaria que los apolares, eluyendo en primer lugar. Este sistema es el utilizado en la mayoría de las separaciones líquido-líquido de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y que se emplea en el presente trabajo de investigación. (Legaz, San Cristóbal, Díaz, Aguarales, y Córdoba, 2011)

El mecanismo de separación será principalmente, la partición, por lo que los solutos se repartirán entre una fase estacionaria líquida y apolar y una fase móvil líquida, más polar que la anterior (si bien no se descarta una cierta adsorción). En cualquier caso, la separación se produce porque las moléculas de soluto se distribuyen entre las dos fases en función (Legaz et al., 2011)

El funcionamiento de un cromatografo de alta resolución HPLC se observa en la Figura 2.11. La mezcla a separar se bombea junto con un medio de elución o fase móvil, lo cual puede ser en modo isocrático (composición constante de la fase móvil) o en gradiente

(composición variable de la fase móvil). La muestra se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. (Universitat de València, 2011) En la separación, las sustancias de muestra se retienen en el material de la columna durante períodos de tiempo diferentes y, por ello, abandonan la columna transcurridos tiempos diferentes. El detector, que puede ser un espectrofotómetro UV como en el presente trabajo de investigación, registra en forma continua cada uno de los componentes de la muestra y se evalúan en una computadora. El resultado es un cromatograma y el número de picos en el cromatograma equivalen a la cantidad de componentes separados de la muestra que absorben en la longitud de onda del detector UV. El área bajo cada pico representa la cantidad proporcional del componente de la muestra. (Mladek y Kromidas, 2014)



Figura 2.11.- Instalación de un HPLC. (Agilent Technologies, 2009)

En el HPLC la fase estacionaria es una columna empacada con partículas, cuyos tamaños generalmente varían entre 3.5 y 5 μm . El material de empaque de la columna de fase reversa es, típicamente, gel de sílice (como partículas), y se modifica con varios grupos funcionales hidrofóbicos, entre los cuales el octadecilo es el más comúnmente empleado; por

ello, las columnas C18 son también llamadas frecuentemente “columnas ODS” (octadecyl silica). El grupo funcional es una cadena recta de 18 carbonos; un gran número de hidrocarburos de esta cadena está atado en la superficie del gel de sílice como también dentro de sus poros. (Shodex, 2012) El método experimental del presente trabajo de investigación está basado en el empleo de una columna con partículas C18 de 5 µm. Este tamaño de partícula permite una buena resolución y eficiencia. Debido a que las partículas en la columna son tan pequeñas, es necesario bombear la fase móvil por la columna a una presión bastante alta para forzar al disolvente a pasar. La bomba mantiene un flujo preciso para que las posiciones de los picos en el tiempo puedan servir para identificar las especies en la muestra. Esto se logra mediante la comparación con cromatogramas de estándares específicos para cada especie que se determinará. Un pico del estándar de una especie con un tiempo de retención igual a uno que aparece en el cromatograma de la muestra corresponderá a esa especie.

El análisis químico cualitativo mediante HPLC por tiempos de retenciones presenta limitaciones relacionadas con coelución (dos compuestos eluyendo la columna al mismo tiempo por presentar polaridades similares), baja o nula sensibilidad de algunos compuestos debido a que la longitud de onda del detector UV no es absorbida.

Con respecto a la cuantificación de metilxantinas como la cafeína y teobromina en plantas similares a la *I. guayusa* como *Camelia sinensis* (planta del té) o plantas del género *Ilex* mediante HPLC, es importante mencionar que una gran variedad de condiciones de extracción han sido utilizados, por lo que se ha obtenido una amplia variedad de resultados. (Lee y Ong, 2000) (Lin, Wu, y Lin, 2003) (Khokhar y Magnusdottir, 2002) (Fernández, Pablos, Martín, y González, 2002) (Friedman et al., 2006). Además, se han usado diferentes solventes, temperaturas, y tiempos de extracción antes de realizar los análisis. (Friedman et al., 2006) Por tanto, la comparación de datos entre estudios usando diferentes métodos de

extracción no siempre puede ser justificada. De este modo, es imperativo estandarizar los métodos de extracción, de análisis y las unidades de medición. Una extracción con agua hirviendo por 5 minutos, como se realizó en este trabajo de investigación, sería una buena iniciativa, pues esto simularía la metodología tradicional para la preparación de té, los análisis se deberían realizar por HPLC y los resultados deberían expresarse en mg de compuesto activo por cada gramo de masa de hoja fresca (mg/g) o como mg/L para infusiones de té o bebidas de té comerciales.

Las ventajas del HPLC en el análisis de metilxantinas como la cafeína y la teobromina son la eficiencia, sensibilidad, y especificidad en comparación con otros métodos. Además, con el HPLC se pueden determinar simultáneamente diferentes componentes en una sola corrida. De esta manera, el método utilizado en la presente investigación fue adaptado del desarrollado por Pura Naik (2001) para la determinación simultánea de cafeína y teobromina en extractos de cacao (*Theobroma cacao* L.).

2.8.5. Metilxantinas

Las metilxantinas son alcaloides purínicos que se han encontrado en cerca de 100 especies y en 13 órdenes del reino de plantas. (Ashihara y Suzuki, 2004) Comparado con otros alcaloides de plantas, tales como la nicotina, morfina y estricnina, los alcaloides purínicos son distribuidos ampliamente por todo el reino vegetal, aunque la acumulación de concentraciones altas está restringida a un número limitado de especies tales como *Coffea arabica* (café), *Camellia sinensis* (té) y *Theobroma cacao* (cacao). (Ashihara, Kato, y Crozier, 2011)

Las metilxantinas se forman a partir de nucleótidos de purínicos de las plantas. Datos de estudios sobre el metabolismo *in situ* de precursores marcados, así como también de enzimas y genes han permitido establecer que la principal ruta de biosíntesis de la cafeína es

una secuencia de cuatro pasos que consiste en tres metilaciones y una reacción de nucleosidasa, empezando con xantosina actuando como el substrato inicial (Ashihara et al., 2011) (Figura 2.12).

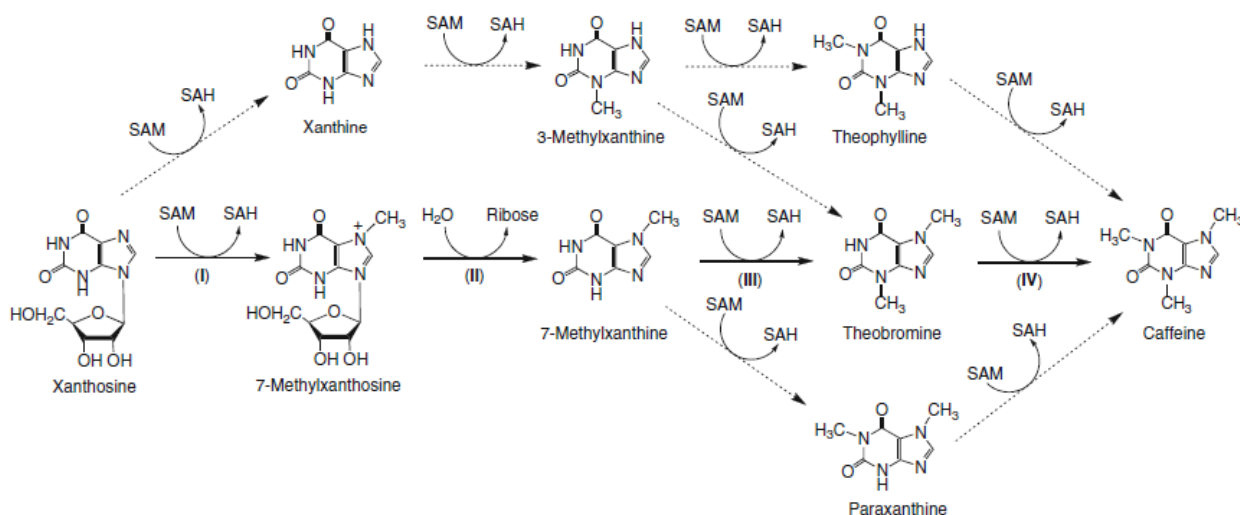


Figura 2.12.- Rutas de biosíntesis de la cafeína a partir de xantosina.(Ashihara et al., 2011)

La Figura 2.12 muestra que la ruta principal consiste de cuatro pasos desde el I al IV.

Las enzimas involucradas son: 7-metilxantosina sintasa con el Enzyme Catalog (EC

2.1.1.158 (I y II); N-metilnucleosidasa (EC 3.2.2.25) (II); teobromina sintasa (EC 2.1.1.159)

(III); cafeína sintasa (EC 2.1.1.160) (III y IV). (Ashihara et al., 2011). Las rutas menores

mostradas en flechas punteadas pueden ocurrir por las amplias especificidades de substrato de N-metiltransferasas, SAM S-adenosil-L-metionina, SAH S-adenosil-L-homocisteína.

Las poblaciones de especies de plantas que crecen en distintas localidades a lo largo de rangos geográficos pueden estar sujetas a de diferentes selecciones y son usualmente diferentes desde el punto de vista genético, fisiológico, morfológico y químico. Tal diversidad inherente puede ser seleccionada por los seres humanos si las especies resultan útiles (Lewis et al., 1991). Este es el caso de *I. guayusa* la cual ha sido cultivada en la cuenca del Alto Amazonas por los indígenas, que seleccionan los cultivos de diversos constituyentes químicos los cuales dan diversos efectos fisiológicos (Schultes, 1979). Por tanto, para una

bebida estimulante usarán plantas que tienen un rango de concentración de cafeína de alrededor de 1.5 a 3.5%, porque saben que los efectos esperados serán experimentados, y evitan plantas que tienen un alto contenido de cafeína puesto que puede resultar perjudicial para la salud.

Se ha observado que los Achuar al consumir la guayusa se inducen emesis. La razón de esto es que al consumir grandes cantidades de la infusión de *I. guayusa* los efectos de las trimetil y dimetilxantinas pueden ser desagradables, incluyendo taquicardia, mareos, agitación, alucinaciones, náuseas y micción más frecuente, De esta manera, una forma de eliminar el exceso de xantinas consumidas es por la emesis que se inducen. (Lewis et al., 1991). Así mismo, se ha reportado que el exceso en el consumo de antioxidantes puede aumentar el riesgo de desarrollar cánceres de la piel y del pulmón, y enfermedades cardiovasculares.(Albanes et al., 1996)(Omenn et al., 1996)(Hercberg et al., 2007)

2.8.5.1. Cafeína

La cafeína (Figura 2.13) es la sustancia psicoactiva más popular del mundo y, sin duda, una de las más aceptadas y toleradas a nivel social. Este alcaloide es aceptado legalmente, y es culturalmente admitido en todas las sociedades del mundo, siendo la fuente de consumo más común el café y diferentes productos elaborados en base a éste que son muy populares.

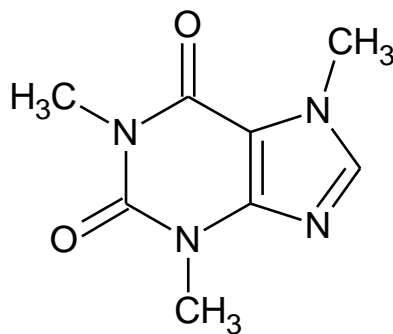


Figura 2.13.- Molécula de Cafeína

Desde el punto de vista químico, la cafeína es un alcaloide xantínico (1, 3, 7 trimetilxantina) y su acción farmacológica se expresa principalmente a nivel de los sistemas nervioso central, cardiovascular y respiratorio, así como en la función renal por actuar como diurético. (Radice y Vidari, 2007)

El conjunto de los efectos causados por los alcaloides xantínicos se reflejan en diferentes acciones a nivel del músculo liso del sistema nervioso central, aparato cardiovascular y músculo estriado, puesto que la cafeína actúa como excitante cortical estimulando el estado de vela y disminuyendo la sensación de cansancio al favorecer la diuresis y acelerar el ritmo cardíaco.(Radice y Vidari, 2007)

La cafeína es un tóxico en dosis excesivas, pues más de 1 g en el cuerpo produce en el ser humano nervios, irritabilidad, insomnio, arritmia cardíaca y palpitaciones. Advirtiéndose, que una dosis superior a 10 g puede ser mortal. La absorción de la cafeína y de las xantinas en general es rápida en caso de administración oral, rectal o parenteral. La cafeína posee una vida media plasmática entre tres y siete horas, la cual aumenta en mujeres en las últimas etapas del embarazo o con el empleo continuo de anticonceptivos orales. La cafeína se metaboliza en el hígado por desmetilación y por oxidación, causando en los seres humanos la formación de paraxantina que produce metabolitos que pueden ser eliminados en la orina. (Radice y Vidari, 2007)

La cafeína ocurre de manera natural en semillas, hojas, o frutas de más de 63 especies de plantas en el mundo (International Food Information Council Foundation, 2007). No obstante, las más comunes de dónde se extrae la cafeína son las que se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Contenido de Cafeína en diferentes plantas

Planta	Contenido de Cafeína (% por peso de hoja seca o granos)
Hoja de <i>Paullinia cupana</i> (Guaraná)	2.5 – 5 (Bempong, Houghton, y Steadman, 1993)
Hoja de <i>Ilex paraguariensis</i> (Yerba mate)	0.5 – 2 (Erowid, 2005)
Hoja de <i>Cola acuminata</i> (Nuez de cola)	1.5 – 2.5 (Scott, 2013)
Hoja de <i>Camellia Sinensis</i> (La planta del té)	5 (Engelhardt, 2006)
Granos de <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> (La planta del café)	1.22 y 2.54 (Ky et al., 2001)

De acuerdo a algunos estudios la guayusa ha demostrado tener un contenido de cafeína de hasta 7.6% por peso de hoja de seca (Lewis et al., 1991) lo cual implica que es una de las plantas con mayor contenido de cafeína en el mundo. De este modo, se atribuye el contenido de la cafeína a los efectos estimulantes de la planta.

2.8.5.2. Teobromina

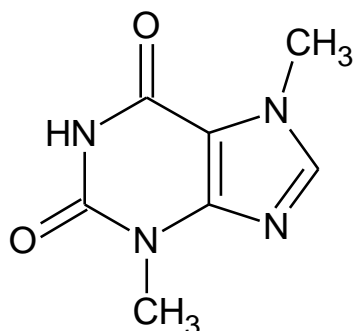


Figura 2.14.- Molécula de Teobromina

La teobromina (Figura 2.14), un compuesto relativamente simple, es un alcaloide con un sabor amargo y de baja solubilidad en agua (0.06 g/100 mL a 15.5° C). (Wadsworth, 1920) Los orígenes griegos del nombre de esta molécula se traducen en “comida de los dioses”, especialmente porque es uno de los componentes principales del chocolate.

Se ha reportado pequeñas cantidades de esta molécula en el té y en la infusión de la yerba mate, pero la fuente principal es el árbol de cacao. *Theobroma cacao*, de dónde se origina el nombre de la teobromina. La molécula fue aislada por el ruso Alexander

Woskresensky en 1841 y fue sintetizada a partir de la xantina hacia el final del siglo XIX por el alemán ganador del premio Nobel, Hermann Fischer. (Clegg, s. f.)

Aunque la teobromina es la metilxantina predominante en el chocolate, las investigaciones sobre los efectos de la teobromina en el hombre son relativamente escasas comparadas con lo llevado a cabo sobre los efectos de la cafeína. Sin embargo, los efectos de la teobromina son muy similares a los que produce la cafeína. (Smit, 2011) Esto no resulta sorprendente si se observa que solo difieren en que, la teobromina tiene un átomo de hidrógeno donde la cafeína tiene un grupo metilo (ver Figura 2.13 y Figura 2.14). De esta modo, la teobromina puede reducir somnolencia y en grandes cantidades produce una sensación de agitación, con un LD₅₀ en humanos de 1000 mg/kg. En el lado positivo, es un supresor de la tos y puede ayudar a reducir los síntomas del asma.

El chocolate y otros productos naturales derivados del cacao son las principales fuentes de teobromina en la dieta occidental. No obstante, también puede ser encontrado en pequeñas cantidades en el té (*Camellia sinensis*), guaraná (*Paullinia cupana*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y la nuez de cola. (Smit, 2011) Se ha reportado que *Camellia ptilophylla* no contiene cafeína, pero si uno de los niveles más altos de teobromina como se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2.- Contenido de Teobromina en diferentes plantas

Planta	Contenido de Teobromina (% por peso seco)
<i>Camellia ptilophylla</i> (té de cacao)	4 -6.8 (Ye Chuangxing, Lin Yongcheng, Zhou Haiyun, Chen Fen, y Li Xiaoyan, 1997)
<i>Theobroma cacao</i> (granos maduros de Cacao)	2.2 – 2.7 (Senanayake y Wijesekera, 1971)
<i>Ilex paraguariensis</i> (Yerba mate)	0.08 - 0.16 (Ashihara et al., 2011)

Debido a la similitud morfológica y genética con *I. paraguariensis* se presume que la planta de *I. guayusa* también contiene teobromina. Empero, hasta la fecha no se han realizado estudios para cuantificar a la teobromina en la guayusa.

2.8.5.3. Solubilidad de la Cafeína y la Teobromina

A pesar de tener una estructura molecular muy similar, la cafeína y la teobromina presentan solubilidades muy distintas. Como se puede apreciar en la Figura 2.13 y Figura 2.14, la única diferencia se encuentra en que la cafeína presenta tres grupos metilo y la teobromina solo dos. Esto indica que existe una mayor probabilidad de puentes de hidrógeno en la teobromina puesto que al tener un grupo metilo menos, el protón restante puede formar un puente de hidrógeno más que en la cafeína. De la misma manera, esto permite que las fuerzas intermoleculares en la teobromina sean de mayor magnitud.

Tabla 2.3.- Comparación entre Teobromina y Cafeína

Parámetro (Unidad)	Teobromina	Cafeína
Magnitud del Dipolo (D)	1.91	1.52
Punto de Fusión (°C)	357	234 - 236.5
Solubilidad en el agua (mg/mL)	0.06	16

En la Tabla 2.3 se muestra la magnitud del dipolo, punto de fusión y solubilidad en el agua de teobromina y cafeína. A pesar de que la polaridad de la teobromina es mayor, esto no implica que se disuelva mejor en el agua ya que las fuerzas intermoleculares son mayores al presentar un punto de fusión mayor (aproximadamente 123 °C de diferencia). Esto se traduce en una solubilidad de la teobromina en el agua mucho menor que en el caso de la cafeína.

La razón por la que se usa agua como solvente para hacer los extractos es porque se trata de simular el protocolo tradicional de los pueblos amazónicos.

3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1. Recolección de las muestras en el campo

Las muestras recolectadas fueron seleccionadas de diferentes localidades indígenas y urbanas de la amazonía ecuatoriana en dónde se tuvo acceso (*ver Anexo A*). Los árboles y arbustos de *I. guayusa* considerados se eligieron de acuerdo al criterio de frecuencia de uso para comercializar y/o preparar infusiones dentro de las comunidades.

El proceso de recolección consistió en el corte de las ramas con hojas jóvenes y su posterior almacenamiento en bolsas plásticas de Ziploc® que se colocaron en un refrigerador portátil a 4 °C. En el momento de la recolección se secaron las hojas con toallas de papel desechables y se trató de minimizar el contenido de aire dentro de las bolsas plásticas. Adicionalmente, se registraron datos sobre la ubicación, mediante GPS, y se asignó un código para cada árbol considerado.



Figura 3.1.- Recolección de muestras de *I. guayusa* en Orellana (Comunidad: Chiro Islas)

La recolección de muestras fue coordinada junto con la Fundación Runa y el autor de este trabajo de investigación (Figura 3.1). En total se recolectaron 154 muestras (Anexo A)

de las ubicaciones que se muestran en la Figura 3.2, con las cuales se realizaron extractos acuosos como se describe más adelante.

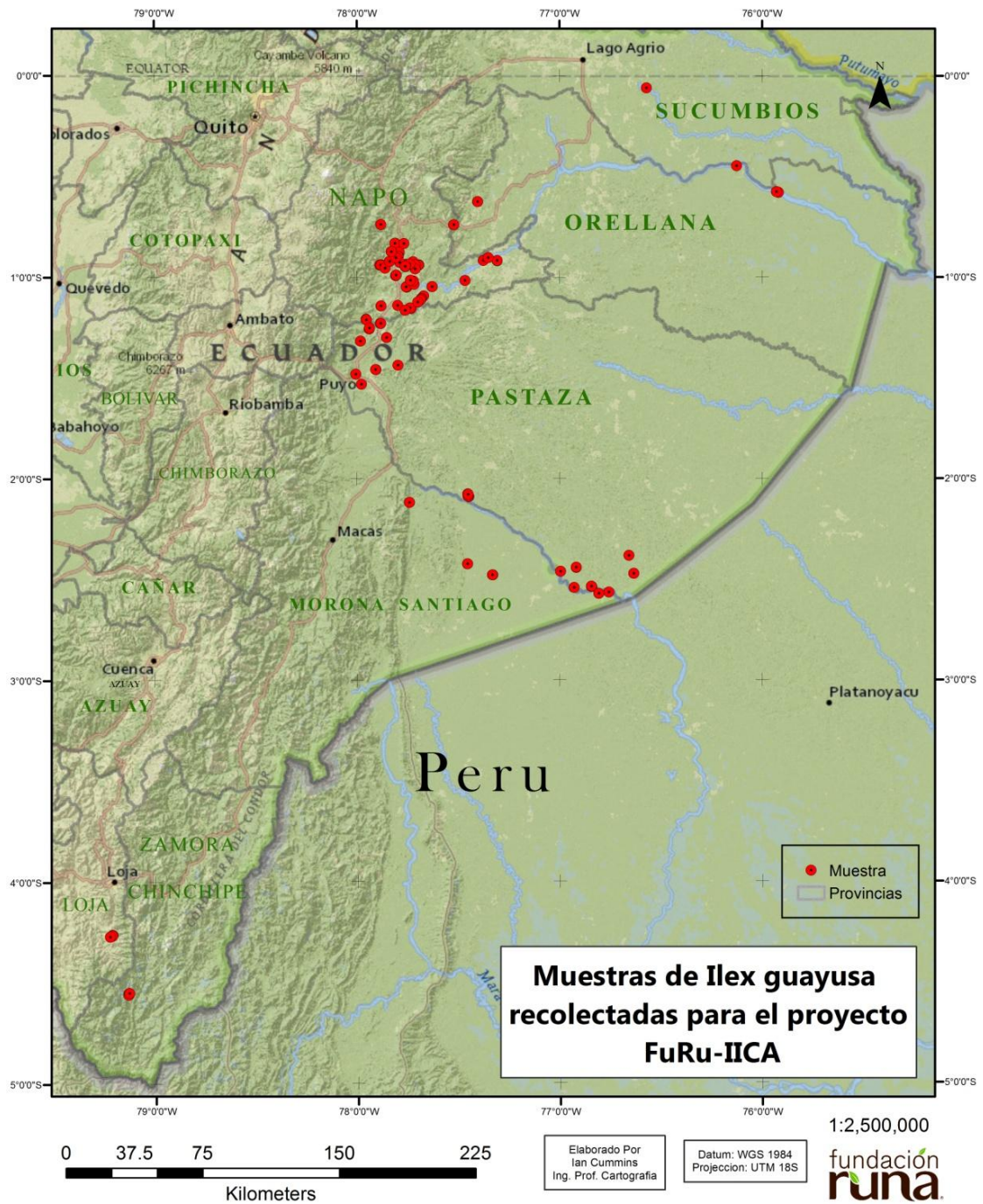


Figura 3.2.- Georreferenciación de las áreas de muestreo.

3.2. Preparación del extracto de guayusa

El proceso de preparación de los extractos de guayusa fue como se muestra en la Figura 3.3. 10 g de muestra de hoja sin tallo de *Ilex guayusa* fueron colocadas junto con 150 mL de agua destilada en una licuadora Fisher Scientific (modelo:700G) a 22000 rpm durante 30 segundos. La mezcla resultante se trasladó a un vaso de precipitación de 200 mL donde se calentó hasta observar la ebullición del extracto. Posteriormente, la infusión fue tamizada con un filtro de 1 mm de apertura y se almacenó en un envase esterilizado de polipropileno a -20 °C hasta su posterior utilización.

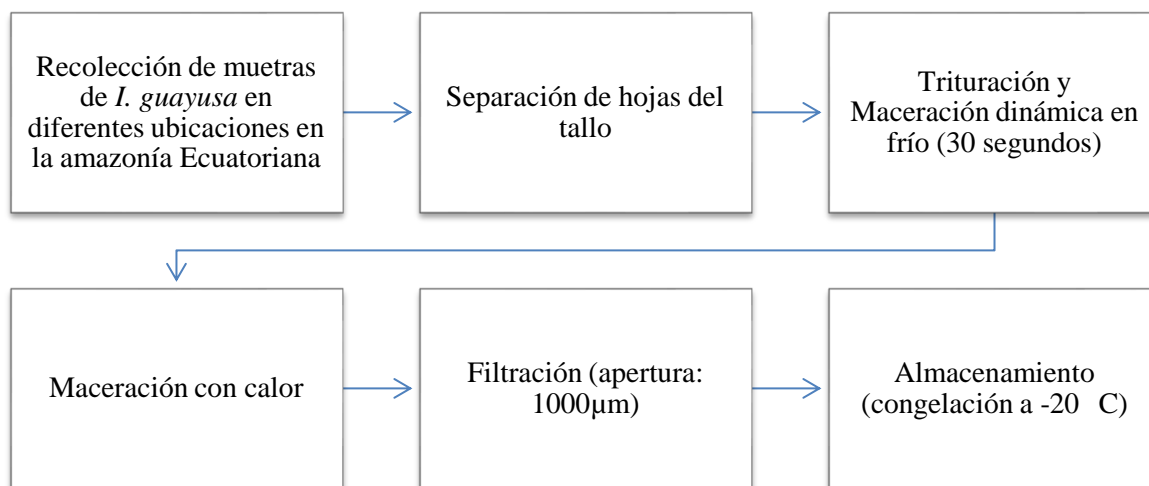


Figura 3.3.- Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractos

3.3. Determinación Cuantitativa de la Capacidad Antioxidante Total

3.3.1. Equipos

Se usó un espectrofotómetro UV Milton Roy (modelo: Spectronic 20D) a una longitud de onda de 593 nm, viales del espectrofotómetro y su respectiva gradilla, un baño de agua Thomas Scientific a 37 °C de temperatura, una micropipeta BOECO de 1000 µL, una

micropipeta EPENDORF de 100 μ L, una balanza OHAUS (modelo: EX124/AD), y un mezclador vortex Fischer Scientific (Número de Catálogo: 02-215-360) de velocidad fija.

3.3.2. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: a) 300 mmol/L tampón de acetato de sodio (Reactivos H.V.O.), pH 3.6, preparado disolviendo 3.1 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada, con 16 mL de ácido acético glacial (Merck KGaA, Lote: K42796763 139) agregado y aforado a 1 litro con agua destilada; b) Solución 10 mM 2,4,6 tripiridil-S-triazina (Sigma-Aldrich, BCBH5087V) en 40 mM HCl (Merck KGaA, Lote: K40039517 912); c) Solución 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, Lote: 5029 V29585) en agua destilada. El reactivo de trabajo FRAP se preparó mezclando a, b & c en la proporción de 10:1:1 en el momento de su uso.

El estándar fue una solución de AA (Reactivos H.V.O.) de 1000 μ M.

3.3.3. Procedimiento Experimental

Los extractos resultantes fueron descongelados y se midió la capacidad antioxidante total siguiendo el protocolo descrito en (Benzie, 1999).

El ensayo se realizó por duplicado tomando alícuotas de 100 μ L de cada extracto y diluyendo con 5 mL de agua destilada, se añadió 3 mL del reactivo de trabajo FRAP y la absorbancia se midió inmediatamente luego de someter a agitación vorticial. Después de eso, las muestras se colocaron en un baño de agua a 37 °C y se midió nuevamente la absorbancia a los 4 minutos.

Finalmente, los resultados de la absorbancia se convirtieron a valores FRAP de acuerdo a la ecuación (2.4).

3.4. Análisis Químico Cualitativo y Cuantitativo mediante Cromatografía Líquida-Líquida (HPLC)

3.4.1. Equipos

Se usaron jeringas de 3 mL (NIPRO, Ecuador), Filtros Merck Millipore tipo LH (Millex, Japón), y filtros de 30 mm con tamaño de poro 0.45 μm (Agilent, Alemania).

Se usó un HPLC modelo BLC-10 (Buck Scientific, Estados Unidos) con detección a una longitud de onda fija de 254 nm y sensibilidad de 0.10 AU FS. El sistema de inyección usado fue un lazo de muestras de 20 μL . Una columna C18 de 5 μm con tamaño de poro A:110, dimensiones 250 \times 4.6 mm, se usó para separar la teobromina y cafeína. El procesador de datos fue un modelo 333 PeakSimple Chromatography Data System. La fase móvil consistió de acetonitrilo y agua (20:80; v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se usó un ultrasonificador Branson modelo 5510 (Fischer Scientific Inc., Estados Unidos) para preparar la fase móvil.

3.4.2. Reactivos

El acetonitrilo grado HPLC se obtuvo de Sigma-Aldrich (Lote: 125305). El solvente fue agua bidestilada filtrada con un filtro de 0.5 μm y desgasificada por 15 min mediante ultrasonido antes de ser usada. El agua fue bidestilada en un aparato de cristal.

3.4.3. Procedimiento Experimental

3.4.3.1. Preparación de Estándar de Cafeína (Solución Madre)

La solución madre de cafeína se prepara al disolver 1000 mg de cafeína (Sigma-Aldrich, Lote: 061M00L2V) en 100 mL de agua bidestilada para dar una concentración de 10 mg/mL.

3.4.3.2. Preparación de Estándares de Cafeína (Solución de Trabajo)

Se prepara un estándar de trabajo diluyendo 10 mL de la solución madre a 100 mL con agua para dar una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.4.3.3. Preparación de Estándares de Teobromina

Los estándares de teobromina (Sigma-Aldrich, Lote: BCBH4839V) se realizaron por disolver cantidades entre 0.5 y 0.1 mg en 1 mL de agua bidestilada.

3.4.3.4. Curvas de Calibración

Las soluciones de estándares de trabajo a diferentes concentraciones de cafeína y teobromina se inyectan en el HPLC y las respuestas de las áreas de los picos se obtienen para concentraciones entre 0.1 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la cafeína y de 0.1 a 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la teobromina, debido a la baja solubilidad de esta en el agua. Las curvas de calibración, concentración versus área, se obtuvieron separadamente. Las regresiones lineales de la teobromina y cafeína presentaron coeficientes de determinación de 0.9971 y 0.9949 respectivamente (Anexo B y Anexo C).

3.4.3.5. Preparación de Muestras

Luego de preparar las muestras como se describió en la sección 3.2, la infusión fue descongelada y se tomaron muestras acuosas con jeringas de 3 mL, las cuales fueron posteriormente acopladas con filtros de 0.45 μm . Se almacenó el filtrado resultante en viales esterilizados de vidrio de 10 mL antes de inyectarse al HPLC.

3.4.3.6. Obtención de Cromatogramas

Los cromatogramas obtenidos luego de la inyección de las muestras al HPLC fueron de 10 min y se realizaron ensayos por triplicado para cada muestra y estándar con el objetivo de obtener una desviación estándar relativa (DER) que asegure precisión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se indican los resultados obtenidos de los análisis realizados.

4.1. Determinación Cuantitativa de la Capacidad Antioxidante Total

Tabla 4.1.- Capacidad Antioxidante Total (FRAP)* (valores medios y desviaciones estándar para ensayos por duplicado)

Muestra	Media FRAP (μmol/L)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
Waychirpas2	17346.3	228.1	1.3%
SJP1	16778.1	141.7	0.8%
KAPAPAS2	15349.5	278.6	1.8%
PON2	13460	173.6	1.3%
SRA1	10830	114.3	1.1%
SMA1	10325.8	101.3	1.0%
RYCP2	10216.2	210.0	2.1%
VALL6	10064.3	115.7	1.1%
ATCP1	8837	245.8	2.8%
CAP2	8678.4	102.2	1.2%
Tinkpas1	8346	205.6	2.5%
SECP2	8264.2	347.1	4.2%
PCT2	8182.4	157.2	1.9%
Waychirpas	7855.1	188.6	2.4%
10AS3	7803.4	221.5	2.8%
KAPAPAS4	7331.4	324.0	4.4%

Muestra	Media FRAP (μmol/L)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
M1	7288.4	250.0	3.4%
REY2	7200.5	382.3	5.3%
CNO3	6598.4	270.2	4.1%
Wayutzpas2	6341.3	536.4	8.5%
G3	6014	215.0	3.6%
RUK2	6010.3	312.4	5.2%
CHIRPAS1	5539.5	150.4	2.7%
VALL1	5392.2	567.0	10.5%
Wayutzpas1	5139.1	70.9	1.4%
AWA2	5020.5	204.6	4.1%
LH4	4950.3	127.3	2.6%
SFP1	4909.4	104.3	2.1%
10AP1	4778.5	370.3	7.7%
CNO2	4733.7	326.6	6.9%
SLSP1	4623	128.1	2.8%
SVN1	4500.3	283.8	6.3%

Muestra	Media FRAP (µmol/L)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
PAÑ3	4462.7	256.3	5.7%
G1	4328.5	219.9	5.1%
AWA3	4303.3	310.6	7.2%
AWA1	4174.2	101.5	2.4%
ALT5	4173	178.6	4.3%
SRA2	3873	90.1	2.3%
VILC2	3845.7	23.1	0.6%
PAN2	3837.5	190.2	5.0%
PUM1	3346.6	11.6	0.3%
UMB2	3289.3	23.1	0.7%
ATT3	3281.1	34.7	1.1%
Suwapas	3240.2	69.4	2.1%
VALL4	3125.7	177.7	5.7%
PUM2	2716.5	231.4	8.5%
PU10AS1	2668.1	53.8	2.0%
UMB1	2642.9	305.0	11.5%
SHAR1	2479.3	219.9	8.9%
PAR3	2462.9	127.3	5.2%
SRA3	2356.5	193.4	8.2%
VALL2	2348.3	104.1	4.4%
PAN3	2298.4	8.7	0.4%
CNO4	2295.1	170.5	7.4%
PUY1	2266.5	34.7	1.5%

Muestra	Media FRAP (µmol/L)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
PUM5	2192.9	130.7	6.0%
VALL3	2152	266.1	12.4%
VILC6	2102.9	196.7	9.4%
TRI1	2045.6	147.1	7.2%
UMB3	2045.6	115.7	5.7%
20MC1	1890.1	127.3	6.7%
VILC5	1865.6	138.9	7.4%
SLSP3	1849.2	116.6	6.3%
VILC3	1783.8	162.0	9.1%
SHAR2	1767.4	147.1	8.3%
SECP1	1742.8	11.6	0.7%
PUM4	1652.8	23.1	1.4%
SD3	1587.4	200.9	12.7%
SICP1	1587.4	170.3	10.7%
PUM3	1571	270.3	17.2%
SASP1	1562.8	150.4	9.6%
ATT2	1555.7	177.2	11.4%
SFP2	1513.7	57.9	3.8%
PUI1	1513.7	34.7	2.3%
REY1	1505.6	186.0	12.4%
G1	1481	11.6	0.8%
20MC4	1391	172.9	12.4%
ALT6	1301	243.0	18.7%

Muestra	Media FRAP (μmol/L)	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
PAR2	1112.8	28.3	2.5%
CMSP1	1063.7	147.1	13.8%
VILC1	990.1	11.6	1.2%
MACH1	965.5	185.1	19.2%
SD1	842.8	122.4	14.5%
SJP2	777.3	81.0	10.4%
VILC4	695.5	97.6	14.0%
SFP3	384.6	14.1	3.7%
MUP1	335.5	46.7	13.9%
CNO1	286.9	24.6	8.6%

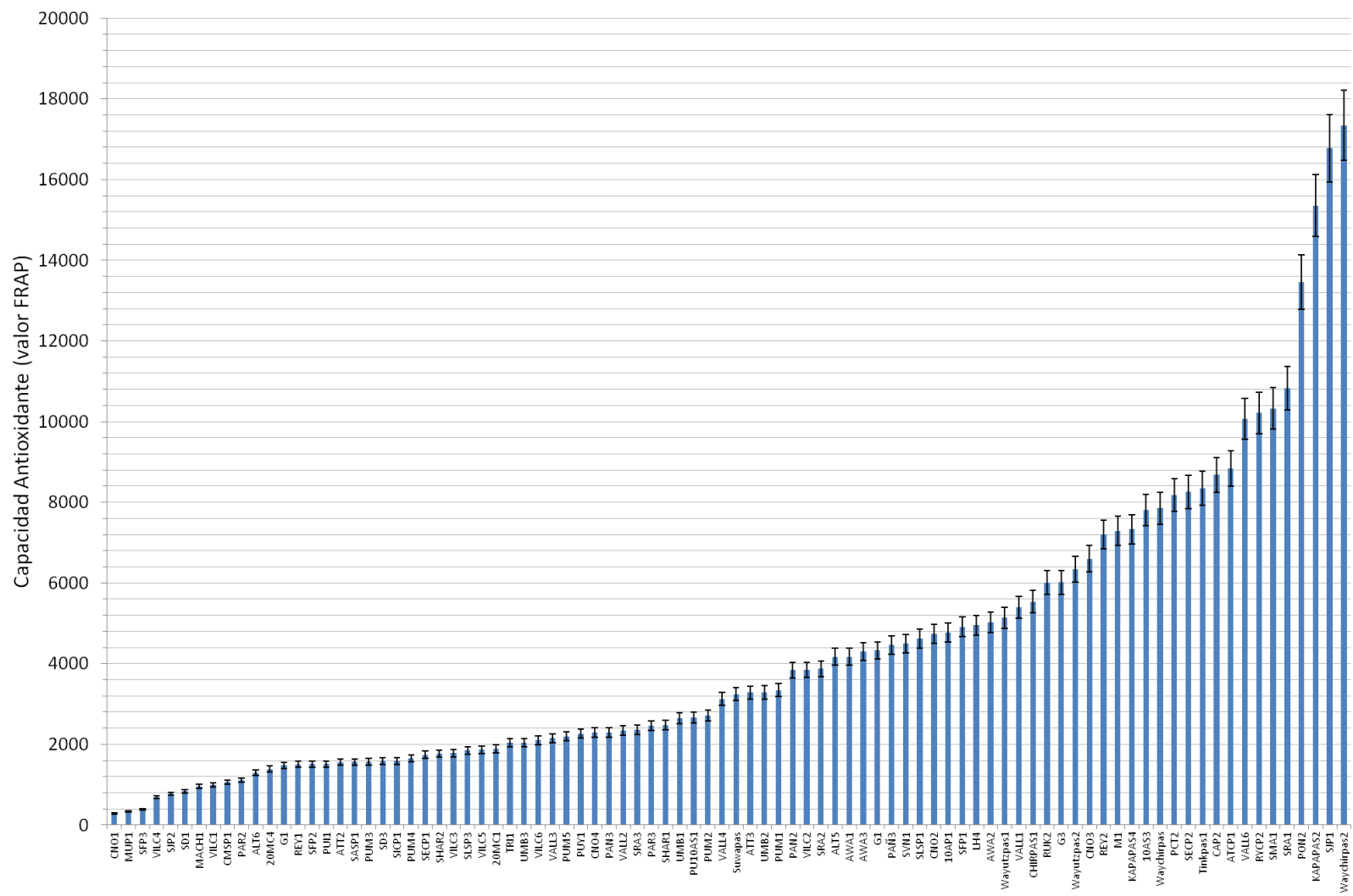


Figura 4.1.- Gráfico de barras de los niveles de capacidad antioxidante en cada una de las muestras

La Tabla 4.1 muestra los valores FRAP ordenados de mayor a menor. Se puede apreciar una gran variabilidad entre las diferentes muestras (Figura 4.1). No obstante, comparando con valores FRAP obtenidos por Langley-Evans (2000) y Benzie y Szeto (1999) siguiendo una metodología de extracción similar para el té, *Camellia sinensis*, conocido por poseer compuestos con alta capacidad antioxidante, se observa resultados similares. Por tanto, se puede subrayar que los extractos muestran una alta capacidad antioxidante dentro del modelo de ensayo. Las diferencias significativas de los valores FRAP se pueden asociar con la composición química de la planta y con parámetros ambientales y fitológicos tales como la edad del arbusto o árbol, madurez de las hojas, exposición solar, etc. En cuanto a la composición química, se ha demostrado que hojas del género *Ilex*, e.g. *Ilex paraguariensis*, poseen compuestos reductores con estructuras fenólicas y xantinas, como la cafeína.

Los valores FRAP menores a 2000 μM implican que tienen un poder reductor menor que el del estándar de AA de 1000 μM . Esto se evidencia en las últimas muestras de la Tabla 4.1. La razón de estos resultados se puede atribuir a los efectos del tratamiento, ya que se ha reportado que el tiempo de almacenamiento, incluso a bajas temperaturas, disminuye el contenido agentes reductores importantes como los polifenoles. (Klimczak, Małecka, Szlachta, y Gliszczyńska-Świgło, 2007) De este modo, es necesario un estudio sobre la estabilidad de los compuestos antioxidantes para revalidar esta hipótesis.

Por otro lado, la variabilidad de los resultados también se puede atribuir a la pérdida o degradación de antioxidantes debido a factores como fermentación de las hojas de *I. guayusa* y/o un transporte no adecuado desde el lugar de recolección hasta el Laboratorio de Química Analítica de la Universidad San Francisco de Quito.

Al observar en la Tabla 4.1, los resultados de la desviación estándar relativa muestran que el ensayo FRAP, es rápido, reproducible, y relativamente simple, haciendo del método bastante atractivo para estudios de monitoreo de alimentos. Asimismo, el método FRAP es

muy útil para estudios de evaluación de la producción de guayusa, preservación, preparación y almacenamiento en términos de los efectos de la capacidad antioxidante.

Por último, es importante considerar que se debe tener cuidado al interpretar estos resultados *in vitro* dentro de un contexto *in vivo*, ya que la biodisponibilidad (fracción de la cantidad inicialmente ingerida que finalmente llega a la sangre) es un factor importante a pesar de que no se conoce completamente. (Szeto et al., 2002). Del mismo modo, los resultados aquí obtenidos sólo pueden ser comparables con estudios donde se emplee metodologías similares.

4.2. Análisis Químico Cualitativo y Cuantitativo mediante Cromatografía Líquida-Líquida (HPLC)

Tabla 4.2.- Contenido de Teobromina y Cafeína en las muestras de *I. guayusa*

Muestra	Teobromina mg/g	Desviación Estándar	Cafeína mg/g	Desviación Estándar
SJS1	0.018	0.003	0.965	0.218
PAN2	0.020	0.003	1.441	0.281
MACH1	0.022	0.002	2.983	0.547
TRI1	0.023	0.001	0.917	0.045
CMSP1	0.024	0.003	1.178	0.226
Ishpink1	0.028	0.005	1.473	0.039
REY1	0.029	0.002	1.331	0.095
SD3	0.029	0.004	3.803	0.574
VILC6	0.031	0.004	1.952	0.370
ALTC3	0.031	0.005	4.247	0.213
20MC1	0.031	0.002	5.129	0.327
ALT6	0.032	0.000	8.010	0.000
SMA1	0.032	0.005	2.817	0.420
VILC3	0.033	0.000	0.599	0.000
SECP2	0.036	0.006	4.524	0.600
SLSP1	0.040	0.005	6.456	0.574
M1	0.041	0.006	1.467	0.176
PAR1	0.041	0.005	2.552	0.323
SFP3	0.046	0.008	1.779	0.142
ATCP1	0.047	0.004	2.935	0.510
PAÑ3	0.047	0.006	2.621	0.037
SD1	0.047	0.008	2.299	0.523
WAYCHIRPAS2	0.047	0.009	1.644	0.229

Muestra	Teobromina mg/g	Desviación Estándar	Cafeína mg/g	Desviación Estándar
VILC1	0.047	0.007	3.748	0.788
PAN3	0.049	0.010	1.781	0.339
10AP2	0.051	0.007	0.690	0.105
ALTC1	0.051	0.004	2.848	0.011
SFP1	0.051	0.010	3.104	0.163
MUP1	0.051	0.008	1.850	0.324
SJP3	0.051	0.008	3.705	0.384
PON1	0.058	0.012	1.581	0.346
G1	0.060	0.011	4.703	1.056
SRA3	0.063	0.012	8.878	1.182
UMB2	0.063	0.000	3.383	0.000
PUM6	0.067	0.013	4.173	0.144
SD2	0.069	0.007	4.257	0.289
REY2	0.072	0.005	7.506	0.320
SJP2	0.073	0.002	4.057	0.289
PAN1	0.074	0.014	7.331	0.868
SLSP2	0.077	0.010	5.126	0.890
VILC5	0.077	0.000	1.749	0.376
PUM5	0.080	0.012	6.858	0.352
SECP1	0.082	0.011	3.548	0.729
VALL2	0.082	0.002	7.408	0.890
VALL1	0.091	0.015	2.855	0.433
PAR2	0.096	0.020	6.270	0.173

Muestra	Teobromina mg/g	Desviación Estándar	Cafeína mg/g	Desviación Estándar
SLSP3	0.104	0.014	3.483	0.704
PUM3	0.108	0.005	8.241	0.112
PUY1	0.108	0.029	1.638	0.407
VALL3	0.115	0.026	5.513	0.830
PON2	0.119	0.031	9.631	0.316
PCT1	0.119	0.019	4.928	0.766
KAPAPAS	0.120	0.005	3.757	0.481
RYCP2	0.120	0.017	9.931	0.457
KAPAPAS2	0.124	0.005	3.273	0.225
UMB3	0.126	0.010	6.656	0.868
PUM4	0.128	0.012	5.597	0.144
SASP1	0.130	0.019	9.884	0.886
SICP1	0.132	0.013	7.479	0.563
UMB1	0.133	0.018	5.659	0.213
PCT2	0.137	0.014	5.141	0.045
Suwapas	0.137	0.019	4.576	0.830

Muestra	Teobromina mg/g	Desviación Estándar	Cafeína mg/g	Desviación Estándar
VILC2	0.137	0.024	2.419	0.633
Waychirpas2	0.142	0.008	1.909	0.263
Kapapas4	0.164	0.025	10.149	0.868
10AP1	0.172	0.029	5.855	0.581
SAM1	0.179	0.030	4.222	0.433
SJP3	0.191	0.030	5.262	0.868
VILC4	0.202	0.005	6.639	0.900
20MC4	0.210	0.005	11.397	0.225
SFP2	0.216	0.040	8.484	0.095
Waychirpas	0.218	0.032	2.918	0.112
PUI1	0.227	0.028	7.536	0.900
SCCP1	0.248	0.014	8.895	0.407
PUM1	0.275	0.036	11.468	0.900
SICP2	0.428	0.005	16.638	0.481
VALL6	0.466	0.000	3.005	0.324
PUM2	0.560	0.063	13.245	0.309

Tabla 4.3.- Tiempos de Retención de Teobromina y Cafeína de los Estándares

Compuesto	Media del Tiempo de Retención ¹	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza (99%) ²	
			Valor Inferior	Valor Superior
Teobromina	5.53	0.26	5.37	5.69
Cafeína	7.60	0.31	7.35	7.85

¹ n = 10
² G.L. = 9

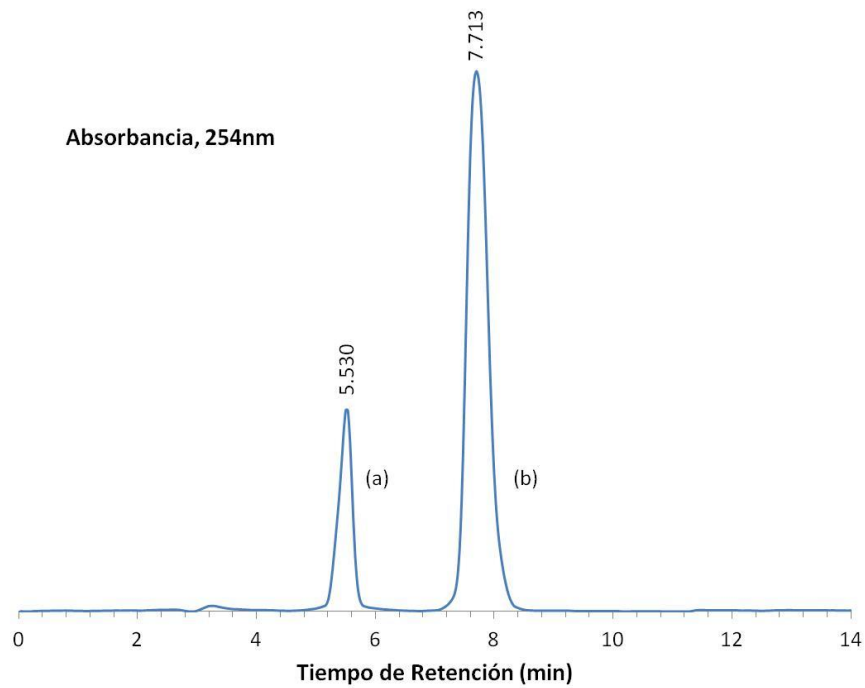


Figura 4.2.- Cromatograma de HPLC con detección UV a 254 nm de una mezcla de estándares de teobromina (a) (TR 5.530 min) y cafeína (b) (TR 7.713 min) con concentraciones de 0.1 y 1mg/mL respectivamente.

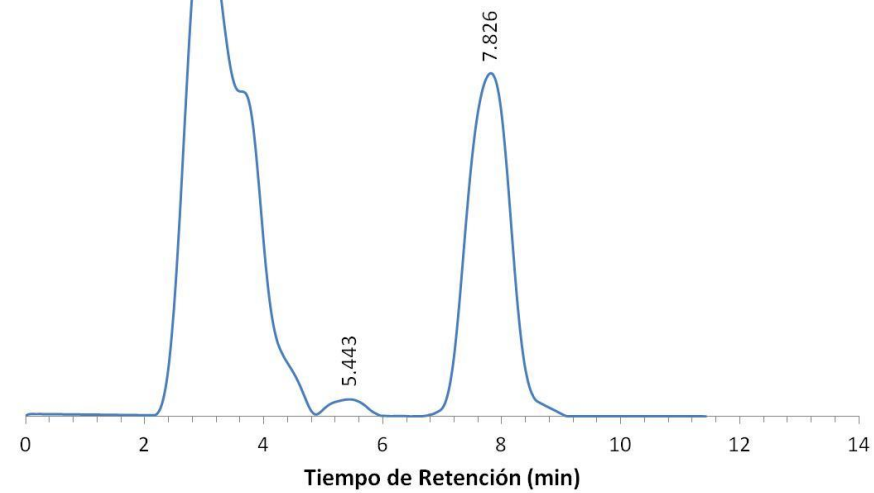


Figura 4.3.- Cromatograma de una muestra de *I. guayusa* (código: PUM2)

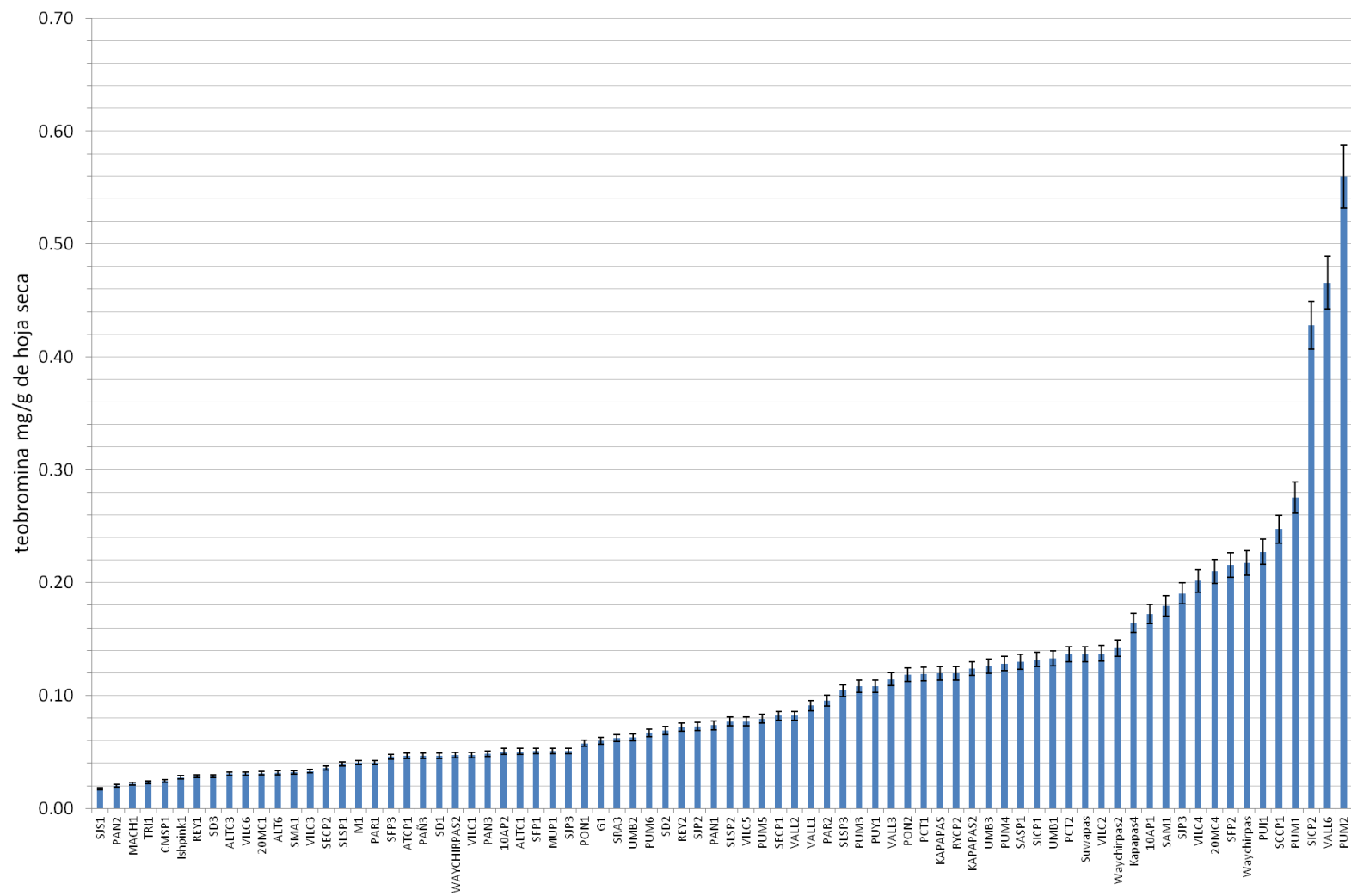


Figura 4.4.- Gráfico de barras de los niveles de teobromina en cada una de las muestras

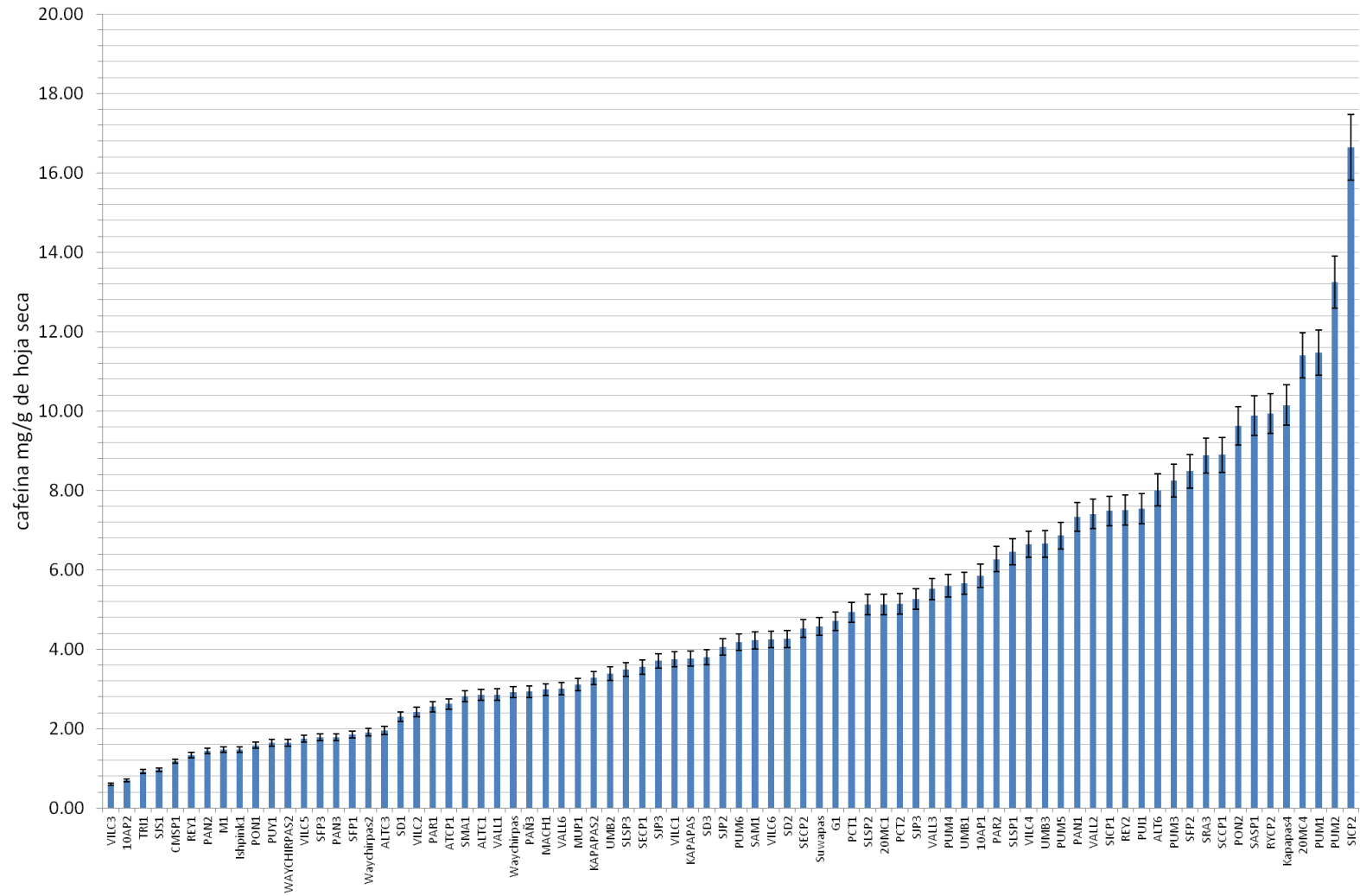


Figura 4.5.- Gráfico de barras de los niveles de cafeína en cada una de las muestras

La Tabla 4.2 muestra el contenido de teobromina y cafeína cuantificado de acuerdo al método descrito. Los resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Friedman et al (2006); ya que emplearon una metodología de extracción relacionada con el presente trabajo de investigación, y se observa que los resultados son similares con respecto a la determinación del contenido cafeína y teobromina de 77 diferentes téis consumidos en Estados Unidos. Como se puede apreciar en la Figura 4.4 y Figura 4.5 los niveles de variabilidad de la cafeína son más pequeños que en el caso de la teobromina.

Para las 78 muestras analizadas se observa que el contenido de cafeína tiene un máximo de 16.64 mg/g, y el de teobromina uno de 0.56 mg/g. Esto implica que la guayusa podría contener más cafeína y teobromina que *I. paraguariensis* (ver Tabla 2.1 y Tabla 2.2). Se observa que existe cierta relación lineal entre el contenido de cafeína y teobromina medido en la guayusa (Figura 4.6). A diferencia de lo obtenido por Friedman et al (2006), la relación entre el contenido teobromina y cafeína es de 1:10, mientras que lo obtenido en el presente trabajo de investigación es de alrededor de 1:30. Esta diferencia se puede explicar debido a una mejor extracción y purificación de la teobromina al realizar centrifugado y filtrado de las muestras, lo cual difiere de la metodología de extracción tradicional (como se mencionó en la sección 2.1) que es la que se empleó en este trabajo. Por otro lado, la relación lineal entre el contenido de teobromina y cafeína evidencia la biosíntesis de las metilxantinas de la cafeína y la teobromina en la planta puesto que se aprecia que estos alcaloides se concentran en cantidades proporcionales. De este modo, la ruta de biosíntesis de la cafeína debe ser como se muestra en la Figura 2.12.

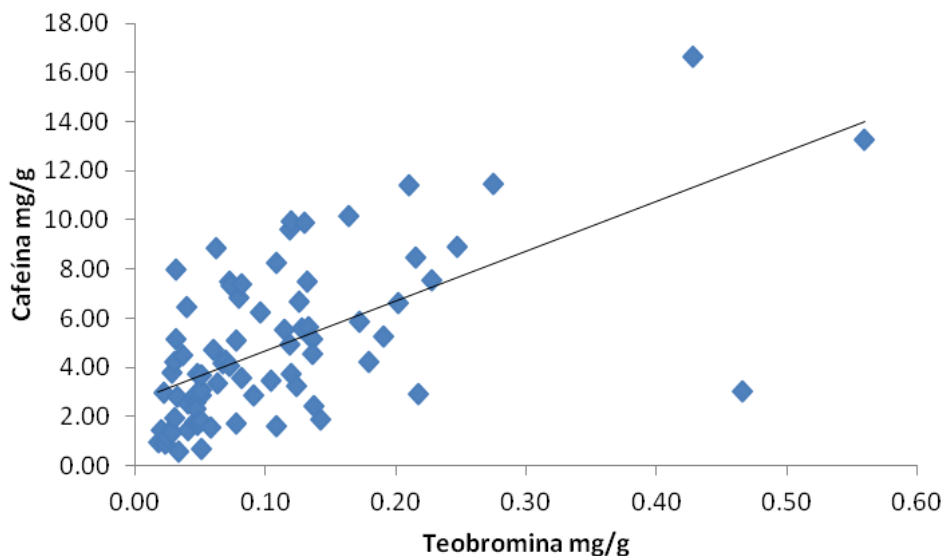


Figura 4.6.- Relación entre cafeína y teobromina en las muestras de *I. guayusa*

La variabilidad entre el contenido de teobromina y cafeína sugiere que el contenido de estas metilxantinas también depende de otros factores relacionados con el mecanismo de degradación, los cuales a su vez dependen de la ubicación geográfica de crecimiento, temporada de recolección, variación de exposición a la luz solar, y altitud de cada planta. De la misma manera, factores como el grado de fermentación y oxidación de la hoja de *I. guayusa* son factores determinantes que contribuyen a la variabilidad de niveles de metabolitos secundarios. (Wang, Hu, Wan, y Pan, 2005)

Investigaciones han demostrado que la cafeína en las hojas secas puede alcanzar niveles de 2.9% (RENASE Cía Ltda, 2009), 3.28% (ABC Testing, 2010), y hasta de 3.33% (Lewis et al., 1991) si se deja hervir la infusión con hojas secas durante una hora, tal como lo hacen los Achuar. La diferencia en el contenido de cafeína y teobromina con los resultados obtenidos se puede explicar por la metodología utilizada con respecto al envejecimiento de la hoja ya que se ha demostrado que las hojas jóvenes pueden contener un mayor contenido de cafeína y teobromina (Ashihara, Monteiro, Gillies, y Crozier, 1996). Esto se puede explicar por el hecho de que metabolitos secundarios como la cafeína actúan como insecticidas

naturales y debido a que las hojas jóvenes son más vulnerables al ataque de los insectos (Cseke, 2006). Otros factores que podrían explicar estos resultados son la temperatura de extracción y en menor grado al tiempo de cocción de la hoja.

Se debe tener cuidado al interpretar estos resultados, ya que no se conoce si las actividades biológicas de los componentes individuales consumidos en forma pura difieren de los mismos compuestos que se observan en las hojas de *I. guayusa*, donde hay la posibilidad de interacciones sinérgicas y/o antagonistas entre los diferentes constituyentes de la guayusa.

Con respecto a los cromatogramas del HPLC, se observa que hay algunos picos solapados que aparecen con tiempos de retención cercanos al tiempo muerto de la columna (entre 2 y 3 minutos) en los cromatogramas individuales de las muestras de *I. guayusa*. Estos se podrían deber a la presencia de catequinas y teaflavinas, las cuales constituyen un 25% en peso seco de la hoja de *Camellia sinensis* (planta muy similar a *I. guayusa*) (Graham, 1984). Para el mejoramiento del método se debería probar elución en gradiente que permita la separación de estos picos.

La fase móvil constituida por acetonitrilo y agua (20:80 v/v) en modo isocrático, separó exitosamente a la cafeína y teobromina. De la misma manera, el método respondió linealmente dentro del rango de concentración mostrado en el Anexo B y Anexo C. Los tiempos de retención fueron los que se muestran en Tabla 4.3 y se realizó una mezcla de los estándares de cafeína y teobromina (Figura 4.2) para observar las diferencias en los tiempos de retención.

Es necesario realizar estudios sobre el porcentaje de recuperación de los extractos después de pasar por la columna, y sobre el límite de detección, ya que esto proporcionaría información sobre si la acumulación progresiva de los diferentes componentes en la columna afecta en la obtención de resultados. Para evitar este problema cada muestra fue inyectada en intervalos de aproximadamente 15 minutos y observando una línea base estable. Los

pigmentos presentes en los filtrados de las infusiones de *I. guayusa* reducen la vida de la columna del HPLC e interfieren en el análisis si no se remueven antes de la inyección en el HPLC. (Pura Naik, 2001)

Una mejor resolución de la teobromina y de la cafeína se alcanzaría si se lograra eliminar la presencia de pigmentos en el extracto de guayusa inyectado al HPLC. Este problema puede ser solucionado pasando las muestras por filtro Sep-Pak antes de inyectarse al HPLC.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se determinó la capacidad antioxidante de 87 extractos de guayusa desde el modelo *in vitro*: Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP, por sus siglas en inglés). Los resultados son similares a los que se obtiene con el té verde (Benzie y Szeto, 1999; Langley-Evans, 2000b).

La capacidad antioxidante de la planta de *I. guayusa* muestra una capacidad antioxidante relativamente alta, considerando que la planta de *C. sinensis* es una de las que presenta mayor capacidad antioxidante de todas las plantas conocidas. Los valores bajos en la capacidad antioxidante de los extractos de guayusa se pueden atribuir a los efectos del tratamiento, ya que se ha reportado que el tiempo de almacenamiento, incluso a bajas temperaturas, disminuye el contenido de antioxidantes.

Se determinó el contenido de cafeína y teobromina en 78 extractos de guayusa mediante HPLC. Al igual que con la capacidad antioxidante, los resultados son similares a los obtenidos para la planta de *C. sinensis*. Para las muestras analizadas se observa que el contenido de cafeína tiene un máximo de 16.64 mg/g, y el de teobromina uno de 0.56 mg/g.

La relación lineal que se aprecia al comparar el contenido de cafeína y teobromina en los extractos de guayusa implica que estas metilxantinas son el resultado de la ruta de biosíntesis de la cafeína y la teobromina (Figura 2.12).

La fase móvil constituida por acetonitrilo y agua (20:80 v/v) en modo isocrático, permitió separar y detectar exitosamente a la cafeína y teobromina. No obstante, se presume que otros componentes como catequinas y teaflavinas aparecen con tiempos de retención muy cercanos al tiempo muerto de la columna (2 minutos). A pesar de esto, el método respondió linealmente dentro del rango de concentración estudiado.

Se recomienda realizar estudios sobre el porcentaje de recuperación de los extractos después de pasar por la columna, y sobre el límite de detección, ya que esto proporcionaría información sobre si la acumulación progresiva de los diferentes componentes en la columna afecta en la obtención de resultados. No obstante, se alcanzaría una mejor resolución de la teobromina y de la cafeína si se lograra eliminar la presencia de pigmentos en el extracto de guayusa inyectado al HPLC. Este problema puede ser solucionado pasando las muestras por filtro Sep-Pak antes de inyectarse al HPLC.

La metodología para la realización de los extractos es fundamental para establecer comparaciones con otros estudios, y se recomienda estandarizar el proceso de extracción. Una buena iniciativa sería realizar la extracción con agua hirviendo por 5 minutos; como se realizó en este trabajo de investigación, pues esto simularía la metodología tradicional para la preparación de té. En este sentido, los resultados del presente trabajo de investigación pueden diferir de otros estudios por la metodología de extracción empleada.

Los resultados obtenidos en este estudio extienden el conocimiento sobre la composición de la hoja de *I. guayusa*. Debido a que hay una gran variedad de factores incluyendo prácticas agrícolas, origen geográfico, temporada de recolección, variación de exposición a la luz solar, madurez de las hojas y demás, es preciso realizar estudios sobre la estabilidad de las hojas de guayusa considerando los parámetros antes mencionados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABC Testing. (2010). *Caffeine Analysis of I. guayusa*. Tustin: ABC Testing.
- Agilent Technologies. (2009, marzo 23). Fundamentals of HPLC. Recuperado marzo 29, 2014, a partir de http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf
- Agrawal, A. N. D. (2011). Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.*, 4(2), 1394-1398.
- Albanes, D., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Edwards, B. K., Rautalahti, M., Hartman, A. M., et al. (1996). Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(21), 1560-1570.
- Ashihara, H., Kato, M., y Crozier, A. (2011). Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants. *Methylxanthines* (Vol. 200, pp 11-31). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13443-2_2
- Ashihara, H., Monteiro, A. M., Gillies, F. M., y Crozier, A. (1996). Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee. *Plant Physiol.*, (111), 747-753.
- Ashihara, H., y Suzuki, T. (2004). Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 9, 1864-1876.
- Atkins, P. W. (2011). *Physical chemistry for the life sciences* (2nd ed.). Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Bempong, D. K., Houghton, P. J., y Steadman, K. (1993). The Xanthine Content of Guarana and Its Preparations, 31, 175-181.
- Benzie, I. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement. *Method Enzymol.*, 299(1995), 15-27.
- Benzie, I. F., y Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 47(2), 633-6.
- Borris, R. P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51(1-3), 29-38. doi:10.1016/0378-8741(95)01347-4
- Chen, Q., Chao, R., Chen, H., Hou, X., Yan, H., Zhou, S., Peng, W., et al. (2005). Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*, 114(5), 675-682. doi:10.1002/ijc.20703

- Clegg, B. (s.f.). Theobromine. Recuperado marzo 4, 2014, a partir de <http://www.rsc.org/chemistryworld/podcast/CIIEcompounds/transcripts/theobromine.asp>
- Cseke, L. J. (Ed.). (2006). *Natural products from plants* (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Engelhardt, U. H. (2006). Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee.
- Erowid. (2005). Caffeine Content of Yerba Mate: a brief summary of the research. *Erowid*. Recuperado marzo 14, 2014, a partir de [plants/yerba_mate/yerba_mate_chemistry2.shtml](http://plants.yerba_mate/yerba_mate_chemistry2.shtml)
- Fernández, P. L., Pablos, F., Martín, M. J., y González, A. G. (2002). Study of catechin and xanthine tea profiles as geographical tracers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1833-1839.
- Firn, R. (2010). *Nature's chemicals: the natural products that shaped our world*. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Friedman, M., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., Han, G.-P., Han, J.-S., Lee, K.-R., y Kozukue, N. (2006). Distribution of Catechins, Theaflavins, Caffeine, and Theobromine in 77 Teas Consumed in the United States. *Journal of Food Science*, 70(9), C550–C559. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb08304.x
- Fundación Runa. (2013). *Mejorando la cadena de valor de guayusa: la bebida energizante de la amazonía*. Corporación Andina de Fomento.
- Graham, H. N. (1984). Tea: the plant and its manufacture; chemistry and consumption of the beverage. *Progress in clinical and biological research*, 158, 29-74.
- Hamilton, A. (2007). *Antioxidants: train longer, train harder*. London: P2P Pub. Ltd.
- Held, P. (2010, febrero 23). An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells. Recuperado a partir de <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>
- Hercberg, S., Ezzedine, K., Guinot, C., Preziosi, P., Galan, P., Bertrais, S., Estaquio, C., et al. (2007). Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *The Journal of nutrition*, 137(9), 2098-2105.
- International Food Information Council Foundation. (2007). Fact Sheet: Caffeine and Health. Recuperado a partir de <http://www.foodinsight.org/Content/76/Caffeine-and-Health-formatted.pdf>
- Jarret, C., Shiguango, M., y Salazar, E. (2012). *Waysa Runa*. Quito.
- Kaufman, P. B., Brielmann, H. L., Cseke, L. J., Setzer, W. N., y Kirakosyan, A. (2006). Phytochemicals. *Natural Products from Plants, Second Edition* (Vols. 1-0, pp 1-49). CRC Press. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1201/9781420004472.ch1>

- Khokhar, S., y Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United kingdom. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 565-570.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., y Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 313-322. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012
- Kuttan, G., Pratheeshkumar, P., Manu, K. A., y Kuttan, R. (2011). Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharmaceutical Biology*, 49(10), 995-1007. doi:10.3109/13880209.2011.559476
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., y Noiro, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75, 223-230. doi:10.1016/S0308-8146(01)00204-7
- Lacy, A., y O'Kennedy, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, (10), 3797-3811.
- Langley-Evans, S. C. (2000a). Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(3), 181-188. doi:10.1080/09637480050029683
- Langley-Evans, S. C. (2000b). Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(3), 181-188. doi:10.1080/09637480050029683
- Lee, B. L., y Ong, C. N. (2000). Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. A*, 881(1-2), 439-447.
- Legaz, M. E., San Cristóbal, M., Díaz, E. M., Agualeles, B., y Córdoba, C. (2011). Serie Técnicas y Métodos: Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). *Reduca (Biología)*, 4(3), 1-32.
- Lewis, W., Kennelly, E., Bass, G., Wedner, H., Elvin-Lewis, M., y Fast, D. (1991). Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 25-30.
- Lin, Y.-S., Wu, S.-S., y Lin, J.-K. (2003). Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide suppressing effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 975-980. doi:10.1021/jf020870v
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. doi:10.4103/0973-7847.70902

- Loizeau, P.-A., y Barriera, G. (1999). Aquifoliaceae. En P. M. Jørgensen y S. León-Yáñez (Eds.), *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (pp 225–227). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75.
- Loizeau, P.-A., y Barriera, G. (2007). Aquifoliaceae neotropicales: Descriptions, Illustrations, Identification, et Recherche d'Information. Recuperado marzo 4, 2014, a partir de http://www.ville-ge.ch/cjb/bd/aqf/species_e/guayus_c.htm
- Loizeau, P.-A., Barriera, G., Manen, J.-F., y Broennimann, O. (2005). Towards an understanding of the distribution of «Ilex» L. ('Aquifoliaceae') on a world-wide scale. *Biologiske skrifter / utgivet af Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab* (Vol. 55, pp 501–520).
- MacRae, W. D., y Towers, G. H. N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23(6), 1207-1220. doi:10.1016/S0031-9422(00)80428-8
- Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S., y Nema, R. K. (2009). Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104.
- Mladek, C., y Kromidas, S. (2014, febrero 27). HPLC für Neueinsteiger. Recuperado a partir de <http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>
- Nacci, G. (2008). *Thousand Plants against Cancer without Chemo-Therapy*. Recuperado a partir de http://www.mednat.org/cancro/nacci_english.pdf
- Ng, T. B., Liu, F., y Wang, Z. T. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66(8), 709-723. doi:10.1016/S0024-3205(99)00642-6
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*, 334(18), 1150-1155. doi:10.1056/NEJM199605023341802
- Patiño, V. (1968). Guayusa, a neglected stimulant from the eastern Andean foothills. *Economic Botany*, 22(4), 310–316.
- Phagan, C. J. (1974). A Medicine-Man's Implements and Plants in a Tihuanacoid Tomb in Highland Bolivia. S. Henry Wassen. *American Anthropologist*, 76(2), 472-474. doi:10.1525/aa.1974.76.2.02a01070
- Pura Naik, J. (2001). Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3579-83.
- Radice, M., y Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 6(1), 3–11.
- RENASE Cía Ltda. (2009). *Análisis Químico de I. guayusa*. Quito: RENASE Cía. Ltda.

- Roberts, M. F., y Wink, M. (1998). *Alkaloids Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Boston, MA: Springer US. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4>
- Robson, G. (2013). Tea with Gary. Recuperado marzo 14, 2014, a partir de <http://teawithgary.com/2013/04/19/argentina-and-yerba-mate-stop-8-on-the-world-tea-tasting-tour/>
- Schultes, R. E. (1972). Ilex guayusa from 500 A.D. to the present. *Etnologiska Studier* (Vol. 32, pp 115-38).
- Schultes, R. E. (1979). Discovery of an ancient guayusa plantation in Colombia. *Botanical Museum Leaflets*, 27(5-6), 143-53.
- Schultes, R. E. (1987). Ethnopharmacology of the northwest amazon: unexpected chemical discoveries. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 16(62), 85-92.
- Scott, G. N. (2013). Which Plants Contain Caffeine? *Medscape*. Recuperado marzo 14, 2014, a partir de <http://www.medscape.com/viewarticle/780334>
- Senanayake, U. M., y Wijesekera, R. O. B. (1971). Theobromine and caffeine content of the cocoa bean during its growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22(5), 262-263. doi:10.1002/jsfa.2740220512
- Shemluck, M. (1979). The flowers of Ilex guayusa. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 27(5-6), 155-160.
- Shim, H. (2013). *Basic structure of spectrophotometers*. Recuperado a partir de http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry
- Shodex. (2012, marzo). Shodex™ Guía del Usuario de la columna C18. Recuperado mayo 5, 2014, a partir de http://www.shodex.net/data/downloads/C18_Spanish.pdf
- Skoog, D. A. (2007). *Principles of instrumental analysis* (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.
- Smit, H. J. (2011). Theobromine and the Pharmacology of Cocoa. *Methylxanthines* (Vol. 200, pp 201-234). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13443-2_7
- Stefanova, T., Nikolova, N., Michailova, A., Mitov, I., Iancov, I., Zlabinger, G. J., y Neychev, H. (2007). Enhanced resistance to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and Infection*, 9(1), 7-14. doi:10.1016/j.micinf.2006.10.001
- Szeto, Y. T., Tomlinson, B., y Benzie, I. F. F. (2002). Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *The British journal of nutrition*, 87(1), 55-9. doi:10.1079/BJN2001483

- Tiuman, T. S., Brenzan, M. A., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., Cortez, D. A. G., y Nakamura, C. V. (2012). Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. *Phytomedicine*, 19(13), 1196-1199. doi:10.1016/j.phymed.2012.08.001
- Universitat de València. (2011, septiembre 13). INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA. Recuperado mayo 5, 2014, a partir de http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf
- Wadsworth, R. V. (1920). Note on the solubilities of theobromine. *The Analyst*, 45(529), 133. doi:10.1039/an9204500133
- Wang, X., Hu, S., Wan, X., y Pan, C. (2005). Effect of Microbial Fermentation on Caffeine Content of Tea Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7238-7242. doi:10.1021/jf050495h
- Ye Chuangxing, Lin Yongcheng, Zhou Haiyun, Chen Fen, y Li Xiaoyan. (1997). Isolation and analysis of purine alkaloids from *Camellia ptilophylla* Chang. *Acta scientiarum naturalium Universitatis Sunyatseni*, 36(6), 30-33.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A: Muestras de *I. guayusa* recolectadas y su ubicación

Tabla 7.1.- Muestras de *I. guayusa* recolectadas y su ubicación.

Código	Provincia	Comunidad	Longitud	Latitud
10AP1	Pastaza	10 de Agosto	-77.9049981	-1.4593650
10AP2	Pastaza	10 de Agosto	-77.9071370	-1.4592701
10AS1	Napo	10 de Agosto	-77.5205000	-0.7397000
10AS2	Napo	10 de Agosto	-77.5205000	-0.7397000
10AS3	Napo	10 de Agosto	-77.5205000	-0.7397000
10AS4	Napo	10 de Agosto	-77.5205000	-0.7397000
20MC1	Napo	20 de Mayo	-77.8109000	-0.8318000
20MC2	Napo	20 de Mayo	-77.8104000	-0.8319000
20MC3	Napo	20 de Mayo	-77.8104000	-0.8319000
20MC4	Napo	20 de Mayo	-77.8104000	-0.8319000
ALT5	Napo	Alto Tena	-77.8800000	-0.9389000
ALT6	Napo	Alto Tena	-77.8795000	-0.9394000
ALTC1	Napo	Alto Copa	-77.6947000	-0.9400000
ALTC2	Napo	Alto Copa	-77.6931000	-0.9396000
ALTC3	Napo	Alto Copa	-77.6932000	-0.9385000
ATA1	Napo	Atahualpa	-77.7560000	-1.0484000
ATA2	Napo	Atahualpa	-77.7544000	-1.0476000
ATA3	Napo	Atahualpa	-77.7534000	-1.0501000
ATCP1	Napo	Atacapi	-77.8594000	-0.9549000
ATT1	Napo	Alto Tena	-77.8860000	-0.9400000
ATT2	Napo	Alto Tena	-77.8807000	-0.9400000
ATT3	Napo	Alto Tena	-77.8809000	-0.9399000
ATT4	Napo	Alto Tena	-77.8812000	-0.9401000
AVIV1	Orellana	Ávila Viejo	-77.4034000	-0.6251000
AVIV2	Orellana	Ávila Viejo	-77.4034000	-0.6251000
AVIV3	Orellana	Ávila Viejo	-77.4034000	-0.6251000
AVIV4	Orellana	Ávila Viejo	-77.4034000	-0.6251000
AVIV5	Orellana	Ávila Viejo	-77.4034000	-0.6251000
AWA1	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000
AWA2	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000
AWA3	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000
AWA4	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000
AWA5	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000
AWA6	Napo	Awatino	-77.6272000	-1.0478000

Código	Provincia	Comunidad	Longitud	Latitud
BOY1	Pastaza	Boayacu	-77.9820000	-1.3169000
BOY2	Pastaza	Boayacu	-77.9820000	-1.3169000
CAP1	Napo	Capirona	-77.6816000	-1.1065000
CAP2	Napo	Capirona	-77.6700000	-1.0929000
Chirpas1	Pastaza	Chichirat	-76.6584000	-2.3827000
CHR2	Orellana	Chiro Islas	-75.9181000	-0.5802000
CHU1	Pastaza	Chumpi	-77.4482000	-2.0897000
CMSP1	Napo	Centro Mamallacta	-77.7582000	-0.9365000
CNO1	Napo	Alto Tena	-77.8763000	-0.9400000
CNO2	Napo	Alto Tena	-77.8763000	-0.9400000
CNO3	Napo	Alto Tena	-77.8763000	-0.9400000
CNO4	Napo	Alto Tena	-77.8763000	-0.9400000
COP1	Pastaza	Copataza	-77.4514000	-2.0778000
COP2	Pastaza	Copataza	-77.4526000	-2.0773000
COP3	Pastaza	Copataza	-77.4513000	-2.0875000
COP4	Pastaza	Copataza	-77.4513000	-2.0875000
G1	Morona Santiago	Wisum	-77.7409000	-2.1187000
G3	Morona Santiago	Wisum	-77.7409000	-2.1187000
INC1	Napo	Inchillaqui	-77.8380000	-0.9220000
INC2	Napo	Inchillaqui	-77.8380000	-0.9220000
INC3	Napo	Inchillaqui	-77.8380000	-0.9220000
INC4	Napo	Inchillaqui	-77.8380000	-0.9220000
Ishpink1	Pastaza	Ishpingo	-76.7572000	-2.5657000
Kapapas	Pastaza	Kapawi	-76.8426000	-2.5365000
Kapapas2	Pastaza	Kapawi	-76.8433000	-2.5364000
Kapapas3	Pastaza	Kapawi	-76.8433000	-2.5364000
Kapapas4	Pastaza	Kapawi	-76.8437000	-2.5373000
KM1	Napo	Km 36 via Tena Quito	-77.7900000	-0.8764000
KM2	Napo	Km 36 via Tena Quito	-77.7900000	-0.8764000
LH1	Napo	Las Hierbitas	-77.8050000	-0.9899000
LH2	Napo	Las Hierbitas	-77.8050000	-0.9899000
LH3	Napo	Las Hierbitas	-77.8050000	-0.9899000
LH4	Napo	Las Hierbitas	-77.8073000	-0.9919000
LH5	Napo	Las Hierbitas	-77.8075000	-0.9921000
M1	Napo	Mondayacu	-77.7673000	-0.8328000
MACH1	Napo	Machacuyacu	-77.7170000	-1.0361450
MUP1	Pastaza	Mushullacta	-77.9772000	-1.5321000
PAN1	Morona Santiago	Panki	-77.4550000	-2.4233000
PAN2	Morona Santiago	Panki	-77.4550000	-2.4233000

Código	Provincia	Comunidad	Longitud	Latitud
PAN3	Morona Santiago	Panki	-77.4550000	-2.4233000
PAÑ3	Orellana	Paña Cocha	-76.1250000	-0.4465000
PAR1	Napo	Alto Para	-77.7220000	-0.9235000
PAR2	Napo	Parayacu	-77.7112000	-0.9394000
PCT1	Napo	Puni Cotona	-77.7311418	-1.1559618
PCT2	Napo	Puni Cotona	-77.7370637	-1.1526083
PON1	Napo	Ponceloma	-77.7197000	-1.0193430
PON2	Napo	Ponceloma	-77.7197000	-1.0193430
Pu10AS1	Napo	Pachakutik	-77.8807000	-0.7392000
PUI1	Napo	Puni Ishpingu	-77.7602708	-1.1650607
PUM1	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3319000	-2.4787000
PUM2	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3302000	-2.4795000
PUM3	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3319000	-2.4787000
PUM4	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3319000	-2.4787000
PUM5	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3319000	-2.4787000
PUM6	Morona Santiago	Pumbuentza	-77.3319000	-2.4787000
PUY1	Pastaza	Puyo	-78.0040916	-1.4822626
QC1	Napo	Quisacocha	-77.6988000	-1.1237000
QC2	Napo	Quisacocha	-77.6858000	-1.1133000
QC3	Napo	Quisacocha	-77.6821000	-1.1080000
REY1	Pastaza	Rey del Oriente	-77.8828000	-1.2297000
REY2	Pastaza	Rey del Oriente	-77.8818000	-1.2293000
RUK1	Napo	Rukullakta	-77.7956000	-0.8973000
RUK2	Napo	Rukullakta	-77.7947000	-0.8965000
RYCP1	Napo	Rayacu de Chonta Punta	-77.3073000	-0.9170000
RYCP2	Napo	Rayacu de Chonta Punta	-77.3076000	-0.9184000
SAM1	Orellana	Samuna	-75.9294000	-0.5766000
SASP1	Napo	Salazar Aytaka	-77.7107000	-0.9592000
SCC1	Napo	San Clemente AT	-77.8797000	-1.1430000
SCC2	Napo	San Clemente AT	-77.8797000	-1.1430000
SCCP1	Napo	San Cristobal de Chonta P	-77.3760000	-0.9174000
SD1	Napo	Santo Domingo de Hollín	-77.7613000	-0.9463000
SD2	Napo	Santo Domingo de Hollín	-77.7613000	-0.9465000
SD3	Napo	Santo Domingo de Hollín	-77.7605000	-0.9484000
SECP1	Napo	Santa Estefanía de ChonPu	-77.3511000	-0.9029000
SECP2	Napo	Santa Estefanía de ChonPu	-77.3511000	-0.9029000
SFP1	Pastaza	San Francisco de Puní	-77.8518000	-1.2993000
SFP2	Pastaza	San Francisco de Puní	-77.8818000	-1.2293000
SFP3	Pastaza	San Francisco de Puní	-77.8519000	-1.2993000

Código	Provincia	Comunidad	Longitud	Latitud
Shar1	Pastaza	Sharamentza	-76.9958000	-2.4619000
Shar2	Pastaza	Sharamentza	-76.9958000	-2.4619000
SICP1	Napo	San Isidro	-77.4653000	-1.0175000
SICP2	Napo	San Isidro	-77.4653000	-1.0175000
SJP1	Pastaza	San Juan de Piatua	-77.9524000	-1.2118000
SJP2	Pastaza	San Juan de Piatua	-77.9524000	-1.2118000
SJP3	Pastaza	San Juan de Piatua	-77.9530000	-1.2093000
SJS1	Napo	San José	-77.7872000	-0.9269000
SLSP1	Napo	San Luis	-77.7388000	-0.9349000
SLSP2	Napo	San Luis	-77.7394000	-0.9364000
SLSP3	Napo	San Luis	-77.7440000	-0.9370000
SMA1	Napo	Santa María	-77.8062000	-0.9033000
SRA1	Napo	Santa Rita	-77.8287000	-0.8739000
SRA2	Napo	Santa Rita	-77.8287000	-0.8739000
SRA3	Napo	Santa Rita	-77.8287000	-0.8739000
SRSC1	Pastaza	San Rafael de Santa Clara	-77.9369000	-1.2530000
SRSC2	Pastaza	San Rafael de Santa Clara	-77.9382000	-1.2574000
Suwapas	Pastaza	Suwa	-76.9287000	-2.5421000
SVN1	Napo	San Vicente	-77.7974555	-1.1408014
T1	Sucumbíos	Tereré	-76.5709000	-0.0607000
Tinkpas1	Pastaza	Tinkias	-76.6344000	-2.4723000
Tinkpas2	Pastaza	Tinkias	-76.6344000	-2.4723000
TRI1	Pastaza	El Triunfo	-77.7965716	-1.4374614
UMB1	Napo	Umbuni	-77.7335900	-1.0154000
UMB2	Napo	Umbuni	-77.7335900	-1.0154000
UMB3	Napo	Umbuni	-77.7335900	-1.0154000
VALL1	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1323000	-4.5519000
VALL2	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1343000	-4.5585000
VALL3	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1341000	-4.5552000
VALL4	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1306000	-4.5505000
VALL5	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1320000	-4.5528000
VALL6	Zamora Chinchipe	Valladolid	-79.1315000	-4.5517000
VILC1	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2115000	-4.2614000
VILC2	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2130000	-4.2653000
VILC3	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2237000	-4.2705000
VILC4	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2115000	-4.2614000
VILC5	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2115000	-4.2614000
VILC6	Zamora Chinchipe	Vilcabamba	-79.2115000	-4.2614000
Waychirpas	Pastaza	Waychirpas	-76.8072000	-2.5717000

Código	Provincia	Comunidad	Longitud	Latitud
Waychirpas2	Pastaza	Waychirpas	-76.8072000	-2.5717000
Wayutzpas1	Pastaza	Wayutzentza	-76.9179000	-2.4419000
Wayutzpas2	Pastaza	Watutzentza	-76.9179000	-2.4420000

7.2. Anexo B: Curva de Calibración de la Cafeína para el HPLC

Tabla 7.2.- Datos obtenidos para la curva de calibración de Cafeína

Concentración de Cafeína (ppm)	Área	DER ³
100	2141.20	4.1%
300	6482.60	2.5%
500	11181.23	3.2%
700	15109.40	1.9%
900	20892.80	2.2%
1000	22382.15	2.6%

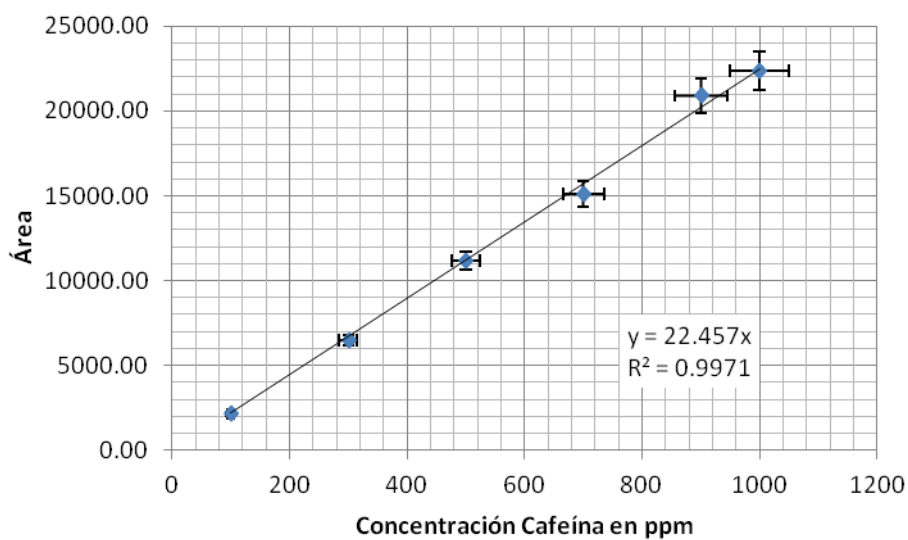


Figura 7.1.- Recta de Calibración de Cafeína.

³ DER, Desviación Estándar Relativa, n = 3

7.3. Anexo C: Curva de Calibración de la Teobromina para el HPLC

Tabla 7.3.- Datos obtenidos para la curva de calibración de Teobromina

Concentración de Teobromina (ppm)	ÁREA	DER ⁴
100	4122.51	3.2%
200	9401.83	3.2%
300	13767.52	1.3%
400	18803.21	1.6%
500	22112.53	2.3%

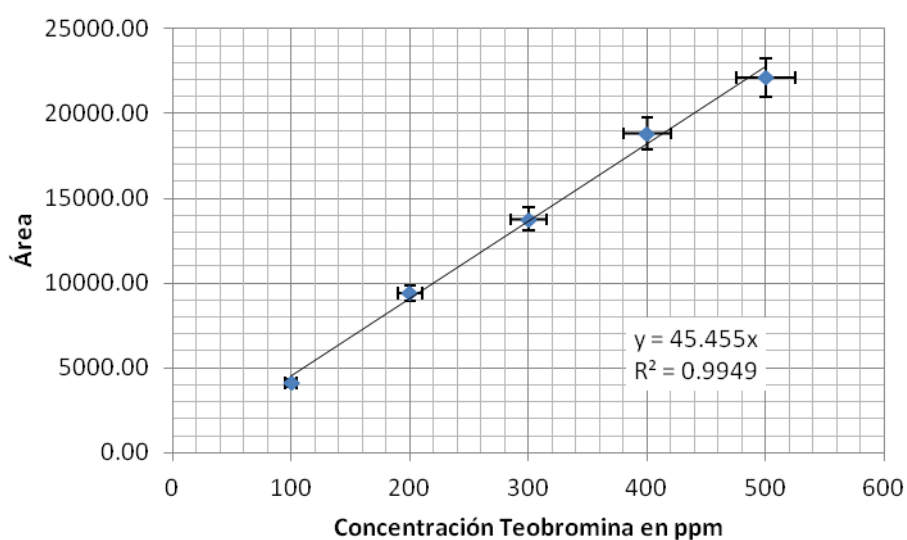


Figura 7.2.- Recta de Calibración de Teobromina.

⁴ DER, Desviación Estándar Relativa, n = 3