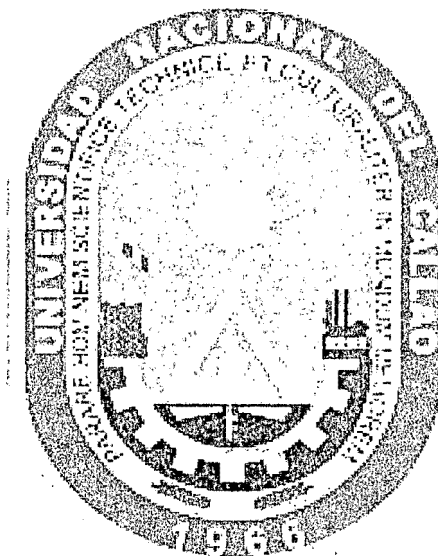


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



**“EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES A PARTIR DE LA  
CORTEZA Y HOJAS DE LA GUANÁBANA”**

**TESIS  
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTADO POR**

**RIVAS CACSIRE, VERONICA DOLORES**

**ASESOR**

**ING. M. SC. PABLO DÍAZ BRAVO**

**CALLAO-PERU  
2006**

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1.- Presentación del problema	4
1.2.-Objetivos de la investigación	5
1.3.- Enunciado del problema	5
1.4.-Justificación	5
1.5.- Antecedentes	6
1.6.-Formulación de la Hipótesis	7
<b>II.- MARCO TEORICO</b>	8
2.1.-La Guanábana	8
2.1.1.-Descripción	8
2.1.2.-Clasificación Botánica	10
2.1.3.-Características - Propiedades	12
2.1.4.- Producción de la Guanábana en el Perú	13
2.2.-Alcaloides	20
2.2.1.- Definición	23
2.2.2.-Estado natural y distribución	24
2.2.3.-Funciones de los Alcaloides en las plantas	28
2.2.4.-Clasificación de los alcaloides	29
a.-Alcaloides Isoquinolínicos	31
2.2.5.- Alcaloides presentes en la guanábana	32
<b>III.- METODOLOGÍA A EMPLEAR</b>	41
3.1.-Descripción de la metodología empleada para la extracción de alcaloides	41

a.- Recolección y acondicionamiento de la muestra vegetal-----	41
1.- Etapa vegetativa de recolección de la muestra vegetal-----	42
2.- Acondicionamiento de la muestra vegetal -----	44
b.- Extracción de alcaloides -----	46
1.- Extracción con solventes no miscibles con el agua -----	51
2.- Extracción con solventes miscibles con el agua -----	54
3.- Extracción con agua acidulada -----	57
3.2.-Descripción de la metodología empleada para los análisis químicos cualitativos-----	59
a.-Marcha Fitoquímica -----	60
b.-Cromatografía de Capa Fina -----	63
3.3.-Descripción de la metodología empleada para los análisis químicos cuantitativos -----	69
a.-Método de Titulación Ácido – base en medio acuoso-----	71
b-Método de Titulación Ácido -- base en medio no acuoso-----	71
3.4.-Descripción de la metodología empleada para los análisis microbiológicos -----	73
Método Turbidimétrico -----	75

#### **IV.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL -----79**

4.1.-Equipos y materiales -----	79
4.2.-Preparación de la muestra -----	84
4.2.1.-Etapa vegetativa de recolección de la muestra.-----	84
4.2.2.-Limpieza-----	86
4.2.2.-Secado-----	87
4.2.4.-Molienda-----	89

4.3.- Análisis físico – químicos de la muestra -----	90
a.- % de Humedad -----	91
b.- Cenizas Totales -----	91
c.- Cenizas insolubles en Ácido -----	93
4.4.-Métodos de extracción de alcaloides -----	94
1.- Extracción con solventes no miscibles con el agua -----	94
2.- Extracción con solventes miscibles con el agua -----	97
3.- Extracción con agua acidulada -----	99
4.5.-Análisis químico cualitativo de alcaloides -----	100
4.6.-Análisis químico cuantitativo de alcaloides -----	105
4.7.-Análisis microbiológico del extracto alcaloidal -----	107
<b>V.-ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS -----</b>	<b>115</b>
<b>VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES -----</b>	<b>120</b>
6.1.-Conclusiones -----	120
6.2.- Recomendaciones -----	122
<b>VII.- FUENTES DE INFORMACION CONSULTADAS -----</b>	<b>124</b>

**APÉNDICE .**

**ANEXOS .**

## INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS

<b>TABLA N°1:</b> Producción de Guanábana en el Perú (1970-1994)-----	<b>18</b>
<b>TABLA N°2:</b> Exportaciones de Guanábana y sus derivados -----	<b>19</b>
<b>TABLA N°3:</b> Distribución de los Alcaloides en Familias de Monocotiledóneas -- -----	<b>26</b>
<b>TABLA N°4:</b> Distribución de los Alcaloides en Familias de Dicotiledóneas ----- -----	<b>27</b>
<b>TABLA N°5:</b> Principales Alcaloides de la Guanábana -----	<b>36</b>
<b>TABLA N° 6:</b> Disolventes orgánicos y algunas constantes físicas mas Características-----	<b>(Apéndice)</b>
<b>TABLA N°7:</b> Pruebas de Identificación de Compuestos orgánicos en extractos vegetales -----	<b>60</b>
<b>TABLA N°8:</b> Análisis cualitativo en dos etapas vegetativas de la Guanábana---	<b>84</b>
<b>TABLA N°9:</b> Cuantificación de los complejos metálicos alcaloidales en dos etapas vegetativas de la Guanábana.-----	<b>85</b>
<b>TABLA N°10:</b> Resultados del análisis cualitativo para la detección de alcaloides -----	<b>101</b>
<b>TABLA N° 11:</b> Resultados de la Marcha Fitoquímica de Hojas ,Corteza de Guanábana-----	<b>102</b>
<b>TABLA N°12:</b> Valores de Rf obtenidos en la Prueba de Cromatografía-----	<b>105</b>
<b>TABLA N°13:</b> Resultados de la Cuantificación de Alcaloides de Hojas y Corteza de Guanábana ( <i>Anona muricata</i> )-----	<b>106</b>
<b>TABLA N°14:</b> Conteo del crecimiento de <i>Enterococcus</i> en acción del extracto alcaloidal de Hojas de Guanábana ( <i>Anona muricata</i> ) -----	<b>111</b>
<b>TABLA N°15:</b> Conteo del crecimiento de <i>Porfiromonas</i> en acción del extracto alcaloidal de Corteza de Guanábana ( <i>Anona muricata</i> ) -----	<b>114</b>

<b>GRAFICO N°1: Efecto de las Hojas de Guanábana sobre el crecimiento de</b> <b>Enterococcus-----</b>	<b>113</b>
--	------------

<b>GRAFICO N°2: Efecto de la Corteza de Guanábana sobre el crecimiento de</b> <b>Porfiromonas-----</b>	<b>114</b>
---	------------

## **INDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS**

<b>FIGURA N° 1: Vista de un área de plantación de Guanábana-----</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA N°2: Árbol de Guanábana -----</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA N°3: Ruta Metabólica de Compuestos secundarios -----</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA N°4: Denominación de los Alcaloides por la presencia en sus</b> <b>respectivas moléculas de ciertas agrupaciones funcionales -----</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA N°5: Estructura de la Isoquinolina -----</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA N° 6: Clases de Alcaloides y su estructura química-----</b>	<b>(Apendice)</b>
<b>FIGURA N°7: Estructura química de la Reticulina -----</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA N°8: Estructura química de la Aterospermina-----</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA N°9: Estructura química de la Anonaine-----</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA N°10: Estructura química de la Tiramina-----</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA N°11: Estructura química de la Coclaurina -----</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA N°12: Estructura química de la Asimilobina -----</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA N°13: Cromatograma Unidimensional -----</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA N°14: Equipo SOXHLET-----</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA N°15 : Rotavapor-----</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA N° 16: Hojas secas de Guanábana (<i>Anona muricata</i>)-----</b>	<b>88</b>

**FIGURA N° 17:** Cortezas secas de Guanábana (*Anona muricata*)-----88

**FIGURA N° 18:** Muestra Vegetal seca y molida (*Anona muricata*)-----  
90

**FIGURA N° 19:** Revelado de la Cromatografía de Capa Fina de Hojas y Corteza  
de Guanábana (*Anona muricata*)-----104

**FIGURA N° 20:** Pasos del análisis Microbiológico -----109

**DIAGRAMA N°1:** Extracción de alcaloides con solventes No miscibles con el  
Agua----- 53

**DIAGRAMA N° 2:** Extracción de alcaloides con solventes Miscibles con el Agua  
-----56

**DIAGRAMA N° 3:** Extracción de alcaloides con Agua Acidulada -----58

## RESUMEN

En la presente investigación, efectuada a nivel laboratorio , se trabajó con Hojas y Corteza de Guanábana (*Anona muricata* ) procedentes de Pachacamac – Casablanca.

La parte experimental comprende 4 etapas :

- Extracción de los alcaloides .
- Análisis químico Cualitativo de Alcaloides.
- Cuantificación de los Alcaloides .
- Actividad microbiológica del extracto Alcaloidal .

La extracción de los alcaloides se realiza con tres métodos diferentes para cada una de las drogas vegetales analizadas ( hojas , corteza ) .

1. Extracción con solventes no miscibles con el agua –Diclorometano.
2. Extracción con solventes miscibles con el agua –Metanol.
3. Extracción con agua acidulada –Solución HCl 1% .

Los extractos alcaloidales obtenidos con cada uno de estos métodos son sometidos a pruebas cualitativas con 3 reactivos de precipitación de alcaloides (Dragendorff, Mayer ,Wagner); los extractos del Método de extracción con solventes miscibles con el Agua son los que presentan mayor precipitado, de los cuales el extracto alcaloidal de hojas tiene mayor precipitado que el de Corteza de guanábana .



Se realiza una cromatografía de Capa Fina para cada uno de estos dos extractos alcaloidales seleccionados de manera de poder conocer cuantos alcaloides contiene cada extracto, resultando que el extracto alcaloidal de Hojas contiene 6 alcaloides mientras que el extracto de Corteza contiene 5 alcaloides .

Posteriormente los dos extractos seleccionados son acondicionados para la cuantificación volumétrica de los alcaloides totales, de esta prueba se obtiene que las Hojas contienen 0.394 % de alcaloides totales mientras que las Cortezas contienen 0.131 % .

El extracto alcaloidal de Hojas, el cual contiene mayor porcentaje de alcaloide total es sometido a ensayos microbiológicos para poder determinar su actividad microbiana frente a la bacteria *Enterococcus* , dando resultados positivos de inhibición de la bacteria en una dosificación de 0.4 ml en 96 horas .

## I.- INTRODUCCION

El Perú es considerado mundialmente como el país de mayor riqueza vegetal . Las causas de esta riqueza son muchas, siendo el principal la especial posición geográfica de nuestro país .

La planta de Guanábana (*Anona muricata*) es un árbol frutal de los muchos otros existentes en nuestro país y nativamente reconocido por sus poderes curativos .

Interés que nos ha motivado a realizar la presente investigación para tratar el tema desde el punto de vista científico con la finalidad de verificar la acción medicamentosa y establecer una serie de pautas que permitan el uso adecuado del denominado “medicamento vegetal”.

La información contenida en la presente investigación ha sido extraída de diversas fuentes y esta basada en resultados experimentales realizados en el Laboratorio de Química del Centro Experimental Tecnológico de nuestra universidad .

La presente investigación pretende concienciar que el tema de las plantas medicinales es, y debe ser, multidisciplinario, involucrando a diversas áreas, solo así es posible obtener un conocimiento integral del recurso vegetal y por ende su mejor aprovechamiento .

## 1.1.- Presentación del Problema .

El reino vegetal representa un enorme potencial de moléculas para ser descubiertas , ya que se estima que más del 90% de las especies vegetales no han sido aún exhaustivamente estudiadas, por otra parte constituyen un reservorio de compuestos útiles, ya que han desarrollado sustancias químicas para protegerse contra las condiciones adversas del medio ambiente .

En el Perú existen gran variedad de especies vegetales que contienen principios activos (alcaloides) con diferentes actividades citotóxicas, antiparasitarias, pesticidas, antiséptica , etc. ; estos alcaloides se encuentran generalmente en las semillas , raíces, cortezas y hojas de la planta .

La Guanábana cuyo nombre científico es *Anona muricata Linn* , es usado por los nativos de la amazonia peruana en infusiones , usando así las hojas para curar la gripe, diabetes y como un sedativo .

Sin embargo, lo más sorprendente de la Guanábana son los estudios realizados en Colombia – España sobre los alcaloides presentes en esta planta con alto poder citotóxico ; poder antitumoral y su aplicación en el campo agrario como pesticida.<sup>7</sup>

No existiendo un método oficial para la extracción de las Alcaloides a partir de la Guanábana , por lo que es necesario determinar una metodología partiendo de los métodos tradicionales de extracción de alcaloides , determinando así los parámetros de extracción de los alcaloides presentes en la planta en mención .

## **1.2.- Objetivos de la investigación .**

Determinar una metodología para extraer alcaloides a partir de la corteza y hojas de la Guanábana .

### **Objetivos específicos .**

- Seleccionar la etapa vegetativa mas favorable de la planta de Guanábana para obtener la mayor cantidad de alcaloides .
- Determinar las operaciones previas para acondicionar el material de manera de obtener mayor rendimiento en la extracción de los alcaloides .
- Determinar el tipo de solvente mas apropiado para la extracción de alcaloides.
- Determinar el % de Alcaloides en el extracto obtenido .
- Determinar la actividad microbiológica del extracto obtenido .

## **1.3.- Enunciado del Problema .**

¿ Cómo se logrará extraer alcaloides a partir de la corteza y hojas de la Guanábana?.

## **1.4.- Justificación.**

1. La tesis servirá como antecedente en el Perú para extraer selectivamente Acetogeninas de un extracto de alcaloides obtenido de la guanábana , ya que estos son muy estudiados en otros países por su poder antitumoral , y otros con poder pesticida .

2. Aportará una metodología para extraer alcaloides de las partes no usadas de la Guanábana (hojas , corteza) , de manera que se aproveche la planta en su totalidad .
3. La industria farmacéutica busca constantemente fuentes naturales que posean principios activos con algún efecto biológico, de manera de no recurrir a la síntesis en el laboratorio , por esta razón es necesario establecer técnicas de extracción de estas sustancias de particular interés en la industria .

### **1.5.-Antecedentes .**

Los conocimientos Etnobotánicos de la Medicina Tradicional describen que desde hace varios años, diversos grupos étnicos de nuestra amazonía usan infusiones de corteza, hojas y raíz de la Guanábana para curar diferentes enfermedades ; lo cual permitió iniciar la búsqueda de investigaciones referente a la extracción de los metabolitos secundarios ( Alcaloides) que se encuentren en dicha planta. En esta búsqueda se encontraron los siguientes resúmenes virtuales :

- Investigación realizada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo , titulada “ Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de la *Anona cherimolia miller* (Chirimoya) y (*Anona muricata linn.* (Guanábana) sobre larvas del IV Estadio de *Anopheles sp.*”
- Technical Data Report for Graviola (*Anona muricata linn.*), sobre estudio fotoquímico de la planta .

- Studies on Annonaceous Tetrahydrofuranic Acetogenins from *Annona squamosa L.* , sobre síntesis de acetogeninas y determinación de estructuras químicas .

Se encontraron también publicaciones de las siguientes revistas:

Journal of Natural Products sobre :

- Murisolin : A new Cytotoxic Mono-Tetrahydrofuran  $\gamma$ -Lactone- from ANNONA MURICATA.
- $\gamma$ -Lactone Funtionalized Antitumoral Acetogenins are the Most Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I.
- New Method for the Determination of the Absolute Stereochemistry in Anttumoral Acetogenins .

Revista Química (Pontificia Universidad Católica del Perú) sobre:

- Química y Farmacología de Anona muricata Linn.("Graviola").

Y una tesis de la India : The alkaloids of Annona muricata .

Debido a que en el Perú existen muy poca información sobre la extracción de alcaloides a partir de la Guanábana , la tesis propuesta resulta novedosa en el tema .

### **1.6.- Formulación de la Hipótesis .**

Se logrará extraer alcaloides a partir de la corteza y hojas de la Guanábana mediante la Extracción Sólido-liquido en Soxhlet con solventes miscibles con el agua.

## **II.- MARCO TEORICO .**

### **2.1.-La Guanábana.**

La guanábana es un frutal originario del trópico sudamericano , de donde se expandió por el resto de América tropical y por ámbitos vecinos como las Antillas.

Los Europeos llegados al continente americano , desde fines del Siglo XV se encargaron de llevar a la guanábana , junto con otras especies de plantas valiosas a las áreas tropicales de los otros continentes . De este modo , el guanábano llego a Asia , Australia y África . Ya desde el siglo XIX , en los países tropicales del mundo , el cultivo de la guanábana ha tenido una gran expansión con niveles tecnificados , esto como respuesta a la gran aceptación del producto en los mercados internacionales .

El cultivo de la guanábana en el Perú , en gran parte aun sigue procedimientos tradicionales , en huertos relativamente pequeños .

#### **2.1.1.-Descripción .**

La guanábana es un árbol de follaje compacto , formando un cono y alcanzando en su crecimiento alturas entre 4 á 12 m .

**Corteza** .- El tronco es recto y cilíndrico ; la corteza es oscura y tiene manchas verdes –grisáceos . Las ramitas terminales son pubescentes .La corteza suele desprenderse en tiras largas al romperse las ramas .

**Hojas.-** Las hojas son simples y alternas , tienen el envés blanco-grisáceos, pubescentes y de textura aterciopelada al tacto . Las hojas son de forma oblongo – lanceolada , con ápice agudo , bordes enteros y base redondeada . El pecíolo es corto y grueso , ligeramente acanalado arriba .

**Flores.-** Constan de tres sépalos , de tres a seis pétalos y numerosos estambres . Tiene varios pistilos y un solo óvulo , el fruto es compuesto ( unión de varios ovarios que contienen una semilla cada uno ) , sincarpio ( se forma por la fusión de pistilos y receptáculos ) . Las semillas son negras , brillantes y se encuentran diseminadas en la pulpa . Las flores son solitarias y nacen en cualquier sitio del árbol ( tronco , ramas o ramitas ), tienen un pedúnculo corto y forma acorazonada , poseen tres pétalos de color amarillo verdoso y tres pétalos interiores de color amarillo pálido , las flores también son hermafroditas aunque protóginas , esto es el estigma pierde su receptividad antes de que el polen sea derramado . Esto implica la necesidad de polinización cruzada aunque sea dentro del mismo árbol . Normalmente esta labor ( polinización ) la realizan los abejones y otros insectos .

**Raíces.-** Su sistema reticular extensivo le permite soportar periodos relativamente largos de sequía , ya que explora y cubre una amplia franja de terreno . En suelos sin ningún obstáculo , las raíces llegan a penetrar mas de un metro de profundidad , por lo que al seleccionar un sitio para establecer una plantación comercial , se debe buscar suelos con esa profundidad mínima efectiva .

**Fruto.-** Es un sincarpio-ovoide , a menudo asimétrico ( encorvado ) debido a deficiencia en la polinización de los carpelos en el lado cóncavo .



Los frutos se obtienen casi a los dos años de la planta , estos son grandes y en algunas ocasiones pesan hasta 2 Kg. , su superficie es verdosa . La pulpa es blanca lechosa , ligeramente ácida y de un sabor característico y agradable , de olor a trementina , fibrosa y dentro de esta se encuentra pepitas de color marrón claro . Se determina la madurez del fruto cuando se ponen negras las protuberancias .

### **2.1.2.- Clasificación Botánica .**

En la clasificación botánica , la guanábana se encuentra dentro :

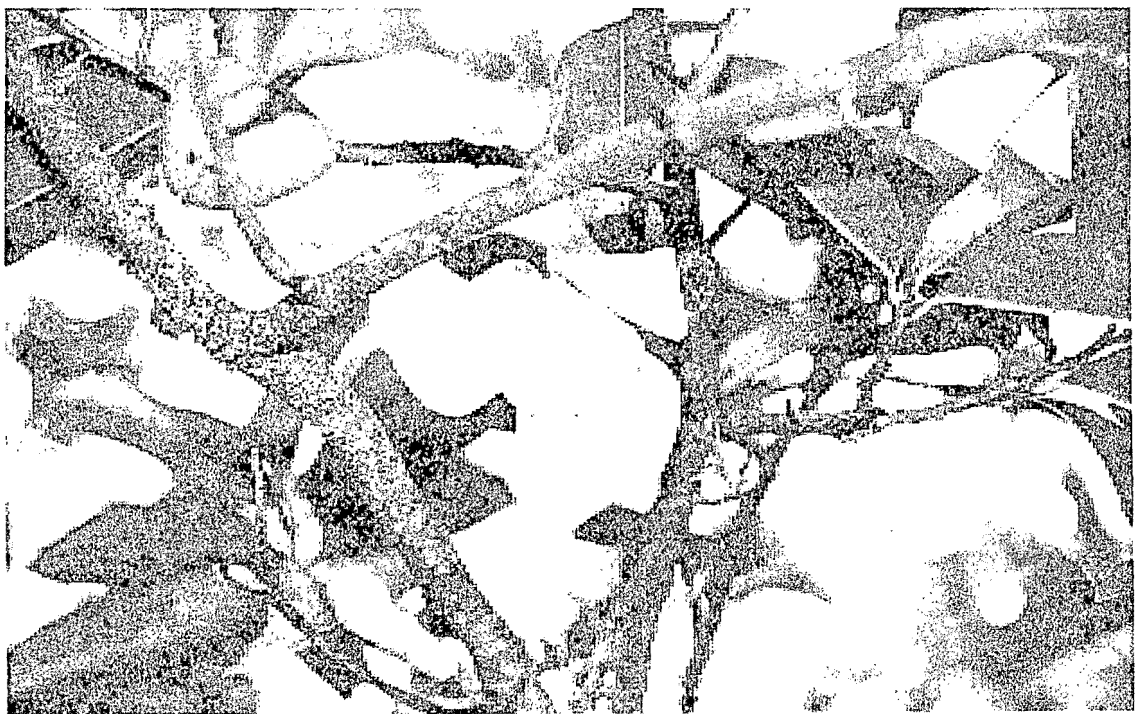
Orden	: Ranales .
Suborden	: Magnolíneas.
Familia	: Anonáceas.
Genero	: Anona .
Especie	: Anona Muricata .
Nombre vulgar	: Guanábana .

El genero anona comprende alrededor de 800 especies , gran parte de ellas nativas de las áreas tropicales de América .

Dentro de los géneros de Anona Y Rollinia , además del guanábano se tiene un buen numero de especies cultivadas por sus frutos, tales como : A. Reticulata(anon) ; A. Diversifolia ( Ilamá ) ; A. Purpurea ( Soricaya ) ; Rollinia jimenezii (Anonillo) ; y A.Chirimola ( Chirimoyo) .



**Figura N°1 .Vista de un área de plantación de guanábana.**



**Figura N° 2 Árbol de guanábana .**

**Fuente:**

(18) Oficina de Información Agraria , OIA, Ministerio de Agricultura .

### **2.1.3.- Características – Propiedades .**

Las características mas destacables del árbol de la Guanábana son sus propiedades antibacterianas, antiparasitarias, astringente, citotóxica, hipotenso, insecticida, sedativo, estomacal, vasodilatador.

Todas las partes del árbol se usan en la medicina natural indígena : corteza, hojas, raíces, semillas y fruto .

La planta de Guanábana tiene una historia rica y larga de uso en la medicina herbaria. En el Ande Peruano, las infusiones de hojas se usan para el catarro y las semillas molidas son usadas para matar los parásitos ; en la Amazonia las raíces , corteza y hojas son usadas para la diabetes y como sedante.

En la Amazonia \_Brasileña se utilizan infusiones de hojas para los problemas del hígado , y el aceite de la fruta aun verde es mezclado con aceite de oliva y usado externamente para la neuralgia , reumatismo y el dolor de artritis .

En Jamaica , Haití , Oeste de la India , el zumo de la fruta es utilizada para la fiebre , los parásitos , diarrea y para aumentar la producción de leche materna , la corteza y las hojas se utilizan como antibacteriano , sedativo y calmante nervioso , etc .

Muchos compuestos y fitoquímicos activos se han encontrado en la guanábana, pues los científicos han estudiado sus características desde 1940 .

Estos demostraron que la corteza así como las hojas tienen efecto hipotensivo, antimicrobiano, relajante muscular y actividades cardiodepresivos en animales .Se verificaron las propiedades hipotensivas de las hojas en ratas en 1991 , varios

estudios han demostrado que los extractos de hoja , corteza , raíz y semillas de la Guanábana tienen poder insecticida .

En 1976 un programa de selección de la planta realizado por el Instituto Nacional de Cáncer en Brasil , demostró que las hojas y el tallo tienen actividad citotóxica contra las células de cáncer .

#### **2.1.4.- Producción de la Guanábana en el Perú .**

La Guanábana en el Perú es conocida desde la antigüedad y se encuentra representada en muchos ceramios exhumados de tumbas pre-colombianas en nuestra costa .

En el Perú se encuentra en la costa , sierra y selva , según el cuadro N° 1 .

Según el Instituto de Investigación Agraria (INIA)<sup>18</sup> las condiciones necesarias para un buen cultivo de la planta de guanábana son :

**Clima.-** En el territorio peruano el guanábano crece y produce en variadas condiciones climáticas : en Selva Alta , con niveles altitudinales de entre 450 y 1400 m.s.n.m. y con precipitaciones pluviales de trópico húmedo ; en Selva Baja , con niveles altitudinales de entre 250 a 450 m.s.n.m. y con precipitaciones pluviales de trópico húmedo y muy húmedo ; y , en la Costa Norte y Centro , con niveles altitudinales hasta cercanas al correspondiente a la superficie del mar y con climas propios de trópico seco , dependientes del agua de riego .

Altitudes de entre 500 y 1250 m.s.n.m. concentran la mayor producción , ofrecen la fruta de mejor calidad y se obtienen dos cosechas al año .

Las temperaturas apropiadas para el crecimiento están dentro del rango de 24°C a 30°C . Esta planta no prospera satisfactoriamente en climas con estaciones con temperaturas por debajo de los 12°C . En este ultimo caso ocurren perdidas de follaje , deterioro de la floración y fructificación , así como la muerte de los ápices de crecimiento .

Las zonas de producción de guanábanas , en condiciones de selva , tienen una precipitación pluvial de entre 1,000 y 2,500 mm , con una distribución lo mas uniforme durante el año . En áreas con lluvias anuales por debajo de los 800 mm, ocurre en la Costa , deben complementarse con el riego , con mayores requerimientos durante la primavera y el verano .

La humedad relativa de entre 60 y 80% es apropiadas para esta especie frutal . Lugares con humedad relativa por encima del 85% , resultan adversos por aumentar la incidencia de enfermedades fungosas y otros agentes .

Cuando mas se expongan a la luz las plantas de guanábano , tendrán mas estimulo a la formación de flores y con ellas una mayor productividad .

**Suelo.-** Para una plantación de guanábanos son preferibles suelos profundos y de buen drenaje . Descartar aquellos suelos con capas endurecidas o que tengan niveles de agua freática a la proximidad de la superficie del suelo . Debe haber un perfil con una profundidad no menor de 1,20 m libre de estas limitantes . Utilizar

preferentemente suelos de textura media , franco o limo arcilloso arenosos , con los que se logra un adecuado desarrollo de la planta en su conjunto .

La reacción de los suelos debe estar entre ph 5,5 y 7,5 .Este ultimo es el que caracteriza a los suelos de la costa .

La guanábana es un frutal sensible al exceso de sales , por lo que los suelos con valores superiores a 2,5 mm mhos/cm a 25°C de conductividad eléctrica , deben separarse por ser no aptos para este frutal .

En cuanto a la topografía , se deben seleccionar aquellos suelos planos , ligeramente inclinados hasta con un 30% de pendientes ; cuidando , en todo caso , un buen drenaje .

**Terreno.-** Un aspecto importante es la profundidad de la capa agrícola ; de por lo menos 1,2 m y libre de áreas endurecidas . asimismo , debe haber ausencia de niveles de agua freática alta que interfieran con el desarrollo de las raíces .

De disponerse de un suelo de topografía plana o ligeramente inclinada , de textura franca , profunda y con drenaje de materia orgánica , previa a la perforación de los hoyos de plantada se procederá a la limpieza de toda la vegetación , dejándose el terreno a completa exposición .

En terrenos de ladera , el manejo del terreno se hará con labranza mínima para evitar daños por erosión . en estos casos , cabe la posibilidad de utilizar terrazas continuas o individuales .

En uno y otro caso se sugiere la aplicación de una dosis de materia orgánica descompuesta y de un fertilizante que contenga fósforo , que puede ser fosbayovar

. Incorporar estos compuestos al hoyo , en mezcla uniforme con la tierra de reposición .

**Propagación.-** Tradicionalmente la propagación del guanábano se hacia por semilla . en los últimos tiempos , las plantas de semilla de anona y guanábano , especialmente de este ultimo , se utilizan como porta injerto para obtener plantas bicompuestas de guanábano , de clones seleccionados por su productividad y calidad de fruta .

**Plagas.-** Entre las plagas del guanábano de mayor significación económica están los comedores y minadores de hojas , insectos chupadores , ácaros , queresas , perforadores del fruto , entre otros .

Para el control de queresas se tiene el uso de controladores biológicos entre otros . En el uso de comedores y minadores de hojas , se recomienda una labor de limpieza , recoger y quemar las hojas infestadas . En donde se detectan focos de estas plagas aplicar compuestos químicos como Gusathion al 0.2 % .

En las plagas de follaje y las ramas están los áfidos o pulgones , queresas , ácaros y minador de la hoja entre otros .

Entre otras plagas , al tallo del guanábano le afectan las hormigas y comejenes . La larva de lepidóptero denominada polilla perforadora , el chinche hediondo y la abeja negra taladradora *Trigona* sp., le ocasionan al fruto pérdidas de significación económica .

El control integrado de estas y otras plagas del guanábano contempla , en primer lugar , visitas de observación minuciosa de la plantación con la mayor frecuencia posible . Esto permitirá no solo poblaciones de insectos dañinos , sino también de insectos benéficos .

Según La Comisión para la promoción de exportadores (PROMPEX) se registraron exportaciones de algunas partes del árbol de guanábana .En el cuadro N°2 podemos observar una estadística hasta el año 2004 de dichas exportaciones .



**TABLA N° 1**

**PRODUCCION DE GUANABANA EN EL PERU LAPSO**

**COMPRENDIDO 1970-1994.**

A OS	TONELADAS		HECTAREAS		Kg./ha	
	1970	1994	1970	1994	1970	1994
PIURA	27	39	3	5	9,000	7,800
LAMBAYEQUE	30	26	4	3	7,500	8,667
LA LIBERTAD	--	164	--	22	--	7,455
LIMA	228	107	14	9	16,286	11,889
ICA	--	92	--	7	--	13,143
AYACUCHO	13	22	3	5	4,333	4,400
UCAYALI	10	42	2	9	5,000	4,667
HUANUCO	7	153	2	18	3,250	8,500
JUNIN	24	18	5	5	4,800	3,600
LORETO	8	80	5	10	1,600	8,000
<b>TOTAL NACIONAL</b>	<b>347</b>	<b>743</b>	<b>38</b>	<b>93</b>	<b>9,118</b>	<b>7,989</b>

**Fuente:**

(18) Oficina de Información Agraria , OIA, Ministerio de Agricultura .

**TABLA N° 2**

**EXPORTACIONES DE GUANÁBANA Y SUS DERIVADOS SEGÚN TIPO**

**PRESENTACIÓN 1999 - MAYO 2004**

Presentación	1999		2000		2001		2002		2003		Ene-May 2004	
	Valor FOB US\$	Kgs Bruto	Valor FOB US\$	Kgs Bruto	Valor FOB US\$	Kgs Bruto	Valor FOB US\$	Kgs Bruto	Valor FOB US\$	Kgs Bruto	Valor FOB US\$	Kgs Bruto
Extracto	0	0	0	0	0	0	0	0	3,500	53	0	0
Harina	0	0	0	0	0	0	30	6	3,101	542	5,500	1,061
Hojas	0	0	0	0	6,914	2,100	50	7	2,884	738	273	60
Embarque mixto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,010	3,958
Fresca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	176	80
Jugo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62,967	64,848
Pulpa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	339	254
<b>TOTAL (**)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6,914</b>	<b>2,100</b>	<b>80</b>					

**Fuente:** SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA

Elaboración: BIOCOMERCIO PERU / PROMPEX

Nombre científico: Annona Muricata.

Otros nombres: Graviola. Guanábana .

Para el año 2003 se realizaron embarques mixtos de Hojas de Guanaba totalizando: US\$ 233; el cual no está incluido en el "TOTAL". El producto se exportó con Maracuyá, Cola de caballo, Chancapiedra, Hinojo, Muña y Achiote.

## **2.2.- Alcaloides .**

Las plantas verdes son esenciales en la vida del hombre , debido a que convierten la energía solar en compuestos de carbono que a su vez producen otros alimentos importantes ; a partir de moléculas de agua , dióxido de carbono y energía solar , elaboran carbohidratos , grasas y proteínas , considerados como metabolitos primarios . Las plantas no nada mas dan estas sustancias , también producen otros miles de compuestos a los que se les llama metabolitos secundarios , muchos de los cuales los utiliza el hombre para diversos propósitos .

Los metabolitos secundarios que producen las plantas se conocen como constituyentes químicos , y a los metabolitos responsables de efectos terapéuticos se conocen como constituyentes activos , que son diferentes a los constituyentes inertes que también se encuentran en las plantas .

Los constituyentes farmacológicamente activos son aquellos a los que se les atribuye la actividad terapéutica de la droga ; pueden ser una sustancia aislada o una mezcla de principios .

Los constituyentes aislados pueden ser alcaloides, glicósidos, enzimas, hormonas, vitaminas, etc, y las mezclas incluyen aceites fijos, grasas, ceras, aceites volátiles , resinas, oleorresinas, gomorresinas, bálsamos, etc .

Estas mezclas no solo tienen uso terapéutico, también son importantes porque se usan en la industria farmacéutica, de cosméticos, en perfumería y como lubricantes .

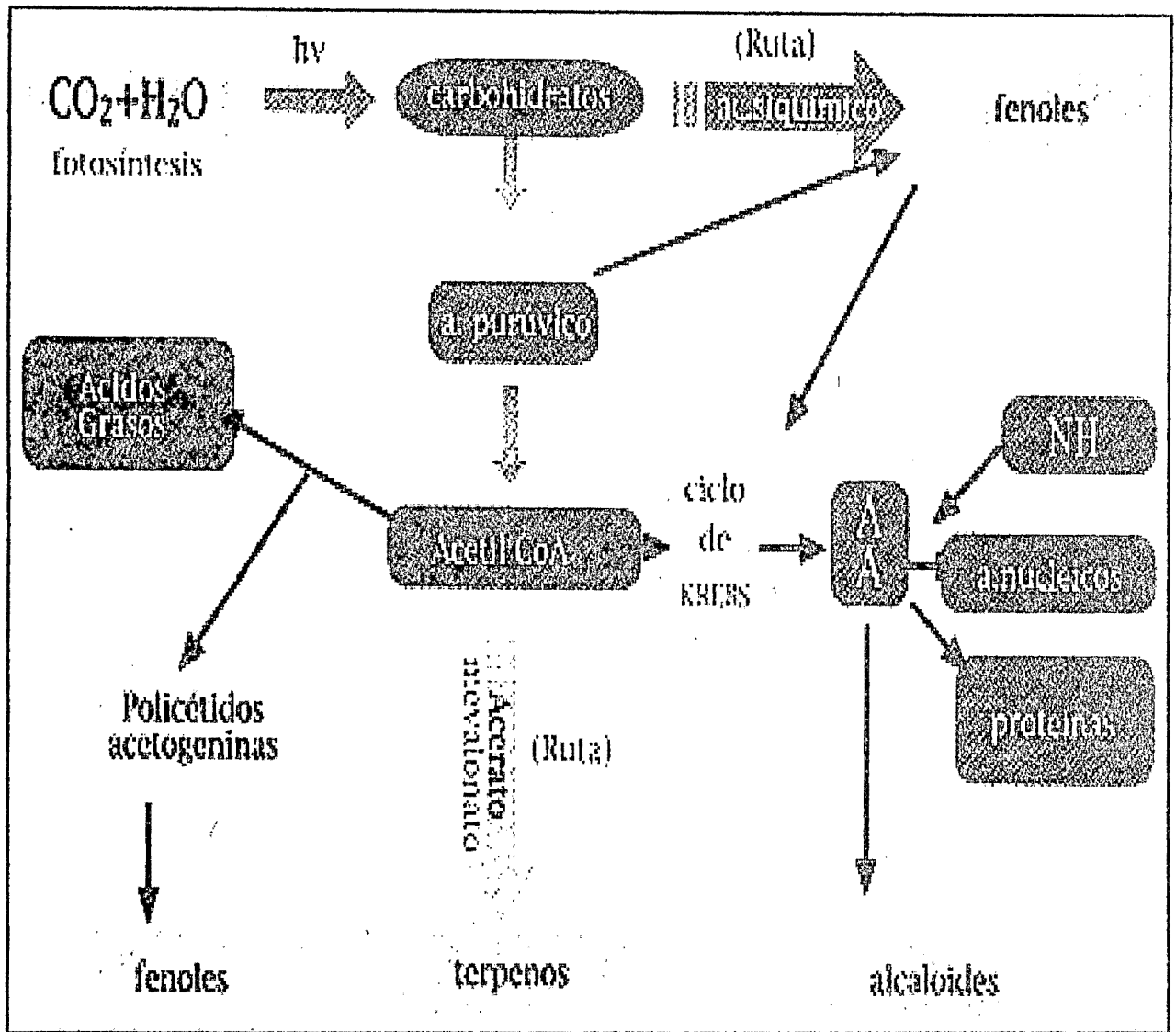


Figura N°3 . Ruta Metabólica de Compuestos Secundarios .

Fuente : ( 7) Introducción al Estudio de los Productos Naturales -1985



**Importancia de los constituyentes secundarios como drogas .-** Las drogas que se obtienen de fuentes naturales provienen de una serie de individuos que viven bajo diferentes condiciones , por lo que no es sorprendente que presenten variaciones en su contenido; por lo tanto , las drogas se deben obtener controlando las condiciones de producción , con lo que se tendrá cierta homogeneidad .

Las variaciones en contenido de las drogas , se pueden deber a dos causas básicas:

1. Intrínsecas o endógenas ; intervienen factores inherentes a la genética del organismo vegetal .
2. Extrínsecas o exógenos ; factores inherentes a las condiciones del medio ambiente en que la planta crece .en algunos casos se presentan factores intrínsecos que realmente son respuestas al medio ambiente externo .

De acuerdo con lo anterior , se considera que la alta calidad de una droga dependerá de la presencia del constituyente deseado en cantidad mayor que las sustancias no deseadas . Sin embargo , se deben tomar en cuenta otras variables comerciales , como la pureza de la semilla , el cultivo , la cosecha , el almacenamiento , etcétera , sobre todo cuando la droga se cultiva con fines comerciales .

Una droga vegetal esta constituida por material fisiológicamente activo e inactivo ; este ultimo incluye compuestos y estructuras celulares . En el caso mas simple , las plantas contienen un solo componente activo , lo que casi no se presenta , lo mas frecuente es que contenga una serie de compuestos de estructuras parecidas y con propiedades farmacológicas similares . También pueden estar presentes

compuestos sinérgicos o antagónicos , o sustancias que presentes otros efectos farmacológicos .

Hay compuestos puros que se han aislado de plantas que tienen menor valor terapéutico que cuando formaban parte del extracto total . Los compuestos aislados que son inactivos también son importantes , ya que pueden interferir , o bien , ser precursores de los principios activos .

Los compuestos inactivos pueden afectar la actividad de la droga por razones físicas ; así , los ácidos grasos presentes en muchos extractos alcohólicos actúan como codisolventes de los principios activos .

Las drogas crudas vegetales son productos naturales que únicamente han pasado por los procesos de recolección y secado . El término productos naturales se refiere a aquellos productos que se encuentran en la naturaleza , y comprenden tanto a las plantas superiores como inferiores , sus extractos y otros constituyentes que no han tenido cambios en su estructura molecular .

### **2.2.1.-Definición .**

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado alcaloides como pócimas mágicas , medicamentos y venenos . Solo recientemente se han obtenido conocimientos precisos acerca de las estructuras químicas de muchos de estos interesantes compuestos .

El término alcaloide ( de alcalino) fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819 y se aplica comúnmente a los compuestos de origen vegetal que tienen

propiedades alcalinas (Básicas) ; son sustancias básicas que contienen uno o mas átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico , que manifiestan significativa actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores ; compuestos que llenan estas características , se dice que son verdaderos alcaloides , para diferenciarlos de los protoalcaloides o aminas biológicas , como las alquilaminas , biosintetizadas también de aminoácidos , y de los pseudoalcaloides , aquellos que también poseen nitrógeno en un ciclo , pero no son originados por aminoácidos , por ejemplo : los derivados de purina y los esteroalcaloides .

### **2.2.2.-Estado Natural Y Distribución .**

Los alcaloides pocas veces se encuentran en las plantas en el estado de bases libres , es mas común encontrarlos en forma de sales tanto solubles como insolubles . Los ácidos orgánicos con los generalmente se encuentran combinados , son el málico , oxálico , succínico , cítrico , tartárico , tánico y los ácidos especiales, aconítico, mecónico, químico y cafeico . Los alcaloides del opio se encuentran en forma de meconatos, los de la quinina , unidos al ácido quínico , etc..Además , se han encontrado en las plantas sales de alcaloides de ácidos inorgánicos , la morfina se encuentra en el opio también en forma de sulfato . Algunas veces los alcaloides están unidos a moléculas de azúcares formando glicoalcaloides como la solanidina, que se encuentra en *Solanum tuberosum* (papa) en forma de glicósido solanina , y la tomatidina que se obtiene de

Licopersium seulentum ( tomate) . Otros alcaloides están en forma de amidas como la piperina , y también pueden estar en forma de esterés como la cocaína y la atropina , o bien , en forma de óxidos de nitrógeno .

Por lo general , los alcaloides pueden estar en todas las partes de la planta , pero son mas frecuentes en los órganos que están en una etapa de intenso desarrollo , como las yemas o los brotes de las ramas , las hojas y las raíces , y a veces en cortezas , tallos , semillas , etc . .

*Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas , unos 256 en los hongos , algas y otros vegetales inferiores .De las gimnospermas se han aislado unos ciento quince alcaloides , dentro de los angiospermas, las monocotiledóneas han aportado 488 alcaloides . En tanto de las dicotiledóneas se han obtenido unas 3600 . Se han encontrado también unos 50 alcaloides en órganos animales .En los cuadros 3 y 4 aparecen las familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas que han contribuido al aislamiento de alcaloides .*

*La cantidad de alcaloides que se encuentra en las diferentes partes de una planta puede variar , es común encontrar cantidades distintas en una misma especie ; esto se debe a las condiciones que hay en el medio en que crecen dichas especies , ya que intervienen el clima , la altitud , la composición del suelo , la estación del año , la etapa de crecimiento de la planta , etc., así, se ha observado un mayor contenido de alcaloides en el tabaco , té y café hasta la floración de las plantas , después , el contenido disminuye .<sup>11</sup>*



**TABLA N° 3**

**DISTRIBUCIÓN DE LOS ALCALOIDES EN FAMILIAS DE  
MONOCOTILEDÓNEAS.**

<b>Nombre de la familia</b>	<b>Núm. de alcaloide aislado</b>
Ciperácea	4
Gramínea	34
Palmae	13
Aráceas	9
Bromeliaceas	1
Estemonaceas	17
Amarilidaceas	178
Liliáceas	201
Dioscoreaceas	4
Iridáceas	2
Musaceas	6
Orchidaceas	19

**Fuente :**

(11) Kuklinski , Farmacógnosia –2000.

**TABLA N° 4**

**DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES EN FAMILIAS DE  
DICOTILEDÓNEAS.**

<b>Nombre de familia</b>	<b>Núm. alcaloides</b>	<b>Géneros con alcaloides</b>	<b>Géneros conocidos</b>	<b>Especies conocidas</b>
Ranunculácea	267	21	40	700
Berberidácea	52	8	12	200
Menispermácea	172	25	65	350
Magnoliácea	63	4	9	70
Himantandrácea	15	1	1	2
Anonácea	35	8	80	820
Monimiácea	47	7	30	200
Laurácea	91	17	40	1000
Hernandiácea	25	3	4	25
Papaverácea	383	27	28	600
Leguminosa	304	80	600	1200
Rutácea	254	43	100	800
Euforbiácea	104	22	220	4000
Buxácea	131	3	6	30
Rhamnácea	25	8	40	500
Cactácea	33	19	25	1500
Litrácea	21	4	26	500
Alangiácea	31	1	1	22
Loganiácea	148	7	35	650
Apocinácea	765	46	180	1400
Boraginácea	60	16	100	1800
Solanácea	151	28	72	1500
Rubiácea	156	39	450	5500
Compósita	122	29	900	1300

**Fuente :** (11) Kuklinski , Farmacognosia –2000.

### **2.2.3.- Función de los Alcaloides en las Plantas .**

Son variados los escritos sobre las funciones que desempeñan los alcaloides en las plantas , pero aún hay dudas acerca de esto . Existen varias teorías que se mencionan a continuación :

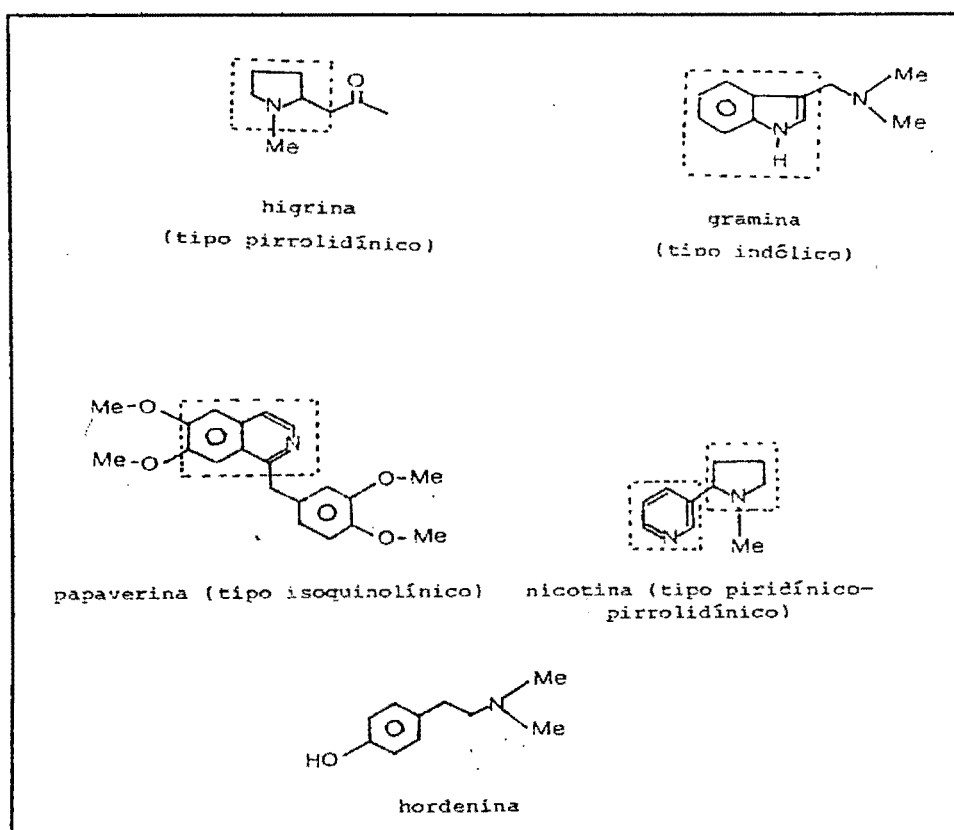
1. Son los productos finales del metabolismo vegetal y no tienen función alguna en la vida de la planta . Esta teoría se basa en que los alcaloides son mas abundantes en la corteza de los tallos o las raíces , las semillas y otras partes en las que se han depositado después de producirse , y por lo tanto , se considera que tales órganos no son mas que los receptáculos para los productos de desecho ( Guareschi , Einführung , Berlin , 1896).Este punto de vista se apoya en el trabajo de Ante en India , sobre la formación de los alcaloides en el opio .
2. Los alcaloides son reguladores del crecimiento de las plantas .
3. Los alcaloides sirven como repelentes o atrayentes de los insectos .
4. Es la forma en que la planta almacena nitrógeno y sustancia de reserva capaces de suministrar nitrógeno u otros elementos necesarios para la economía de la planta ( esta teoría es aceptada por muchos autores ).

Los alcaloides son agentes venenosos que sirven de protección contra los animales herbívoros , ya que debido a su sabor amargo , los animales no se atreven a comer la planta .

#### 2.2.4.- Clasificación de los Alcaloides .

Debido a su complejidad estructural que presentan los alcaloides , su nomenclatura no ha sido sistematizada . Los alcaloides suelen ser designados según el genero de la planta que los contiene y de la cual fueron aislados inicialmente . Son clasificados atendiendo a la similitud de las estructuras moleculares mas simples y comunes .

Por ejemplo , ciertos alcaloides son denominados de tipo indólico porque contienen en su molécula un grupo indol o una modificación del mismo , los alcaloides pirrolidínicos son así clasificados por contener un anillo pirrolidínico y lo propio se hace en varios otros casos como lo revelan las figuras siguientes :



**Figura N° 4 . Denominación de alcaloides por la presencia en sus respectivas moléculas de ciertas agrupaciones funcionales .**

**Fuente : (7) Introducción a los Productos Naturales – 1985.**

A muchos alcaloides importantes se les aplica directamente el nombre de la planta de la que fueron aislados por primera vez . Así , nicotina de la *Nicotiana tabacum* , hordenina de *Hordeum vulgare* , berberina de *Berberis vulgaris* , y muchos otros .

A continuación se presentan ejemplos de los alcaloides mas comunes en cada uno de los grupos siguientes :

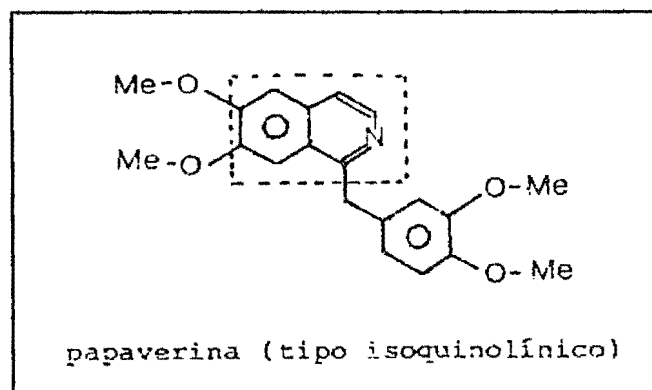
- Alcaloides pirrolidínicos .
- Alcaloides piridínicos y piperidínicos .
- Alcaloides isoquinolínicos.
- Alcaloides morfínicos .
- Alcaloides quinolínicos .
- Alcaloides indólicos .
- Alcaloides imidazólicos .
- Alcaloides quinazolínicos .
- Alcaloides quinolizidínicos .
- Alcaloides pirrolizidínicos .
- Alcaloides de la erythrina .
- Alcaloides amaryllidacea .
- Alcaloides de lycopodio .
- Alcaloides esteroidales .
- Alcaloides diterpenicos .

Según Meyer ,TM (1941 ) , la corteza y hojas de la guanábana contienen alcaloides Isoquinolínicos . a continuación describiremos a este grupo de alcaloides .

#### a.-Alcaloides Isoquinolínicos .

La estructura de la isoquinolina se representa en un numero considerable de alcaloides que existen en familias de plantas muy diferentes .

Aunque los alcaloides mas comunes son el opio (morfina, codeína, tebaína) tienen un núcleo fenamtrénico , la mayoría de ellos poseen la estructura del anillo isoquinolínico .



**Figura N° 5 . Estructura de la Isoquinolina .**  
**Fuente : (7) Introducción a los Productos Naturales – 1985.**

En el Apéndice- figura 6 , se muestran las clases mas importantes de alcaloides y pueden apreciar la gran diversidad estructural de estos productos naturales .

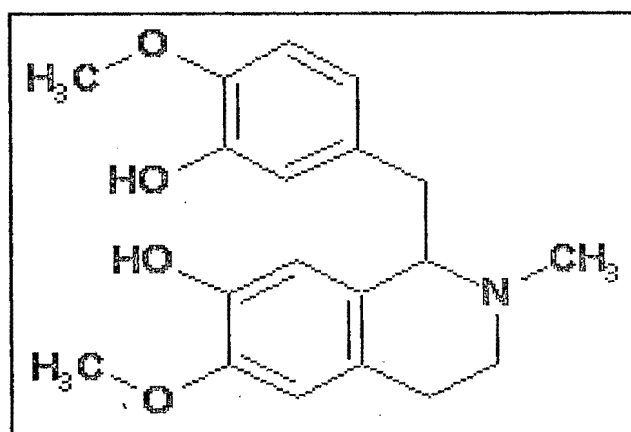
### 2.2.5.-Alcaloides presentes en la Guanábana .

La guanábana presenta alcaloides en las raíces , corteza y hojas , tales como :  
reticulina , coclairina , aterospermina , anomurina y anomuricina ,tiramina .<sup>24</sup>

**Reticulina** , tiene efecto analgésico y antibacteriano ; también estimula el sistema nervioso central , otro alcaloide encontrado es el muricina, muricinina estos son considerados idénticos a la reticulina .

Muricina ,  $C_{19}H_{21}O_4N$  (possibly des-N-methylisocorydine or des-N-methylcorydine) ;

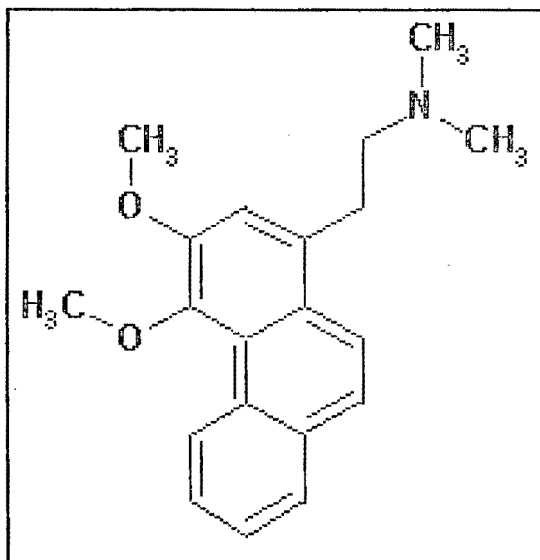
Muricinina ,  $C_{18}H_{19}O_4N$ (possibly des-N-methylcorytuberine).



**Figura N°7. Estructura química de la Reticulina .**  
Fuente: (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

Reticuline hydrochloride,(+,-)-isomer  
reticuline perchlorate  
reticuline, (+,-)-isomer  
reticuline, (R)-isomer  
reticuline, 14C-labeled, (+,-)-isomer

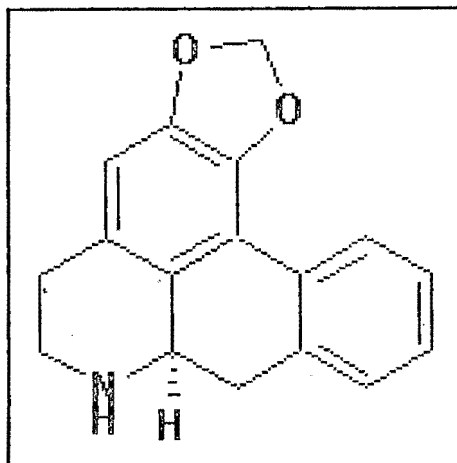
**Aterospermina** , tiene efecto sedante , anestésico , anti-convulsivo y antifungico .



**Figura N°8. Estructura química de la Aterospermina.**  
Fuente: (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

1-Phenanthreneethanamine, 3,4-dimethoxy-N,N-dimethyl-  
atherospermine hydrochloride  
atherosperminine

**Anonaine** ,

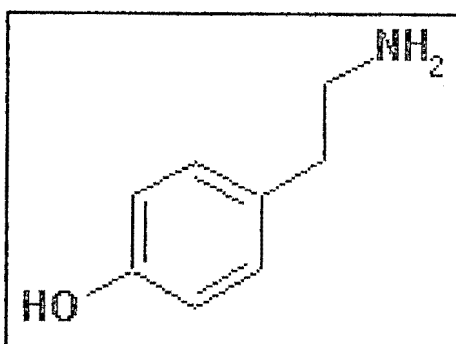


**Figura N°9. Estructura química de la Anonaine .**  
Fuente: (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

anonaine hydrochloride  
anonaine, (S)-isomer



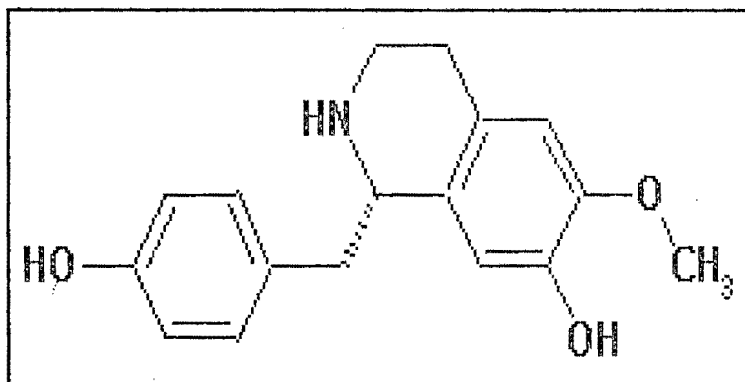
## Tiramina .



**Figura N°10. Estructura química de la Tiramina .**  
**Fuente:** (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

Tyramine , phenol, 4-(2-aminoethyl)-

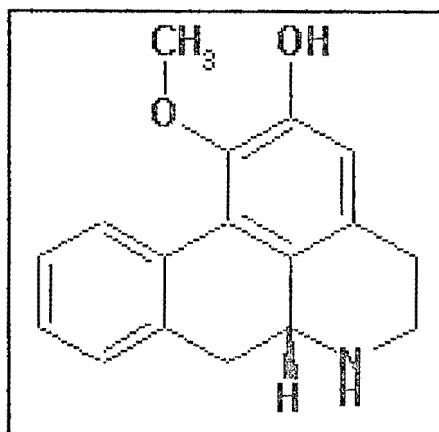
## Coclaurina



**Figura N°11. Estructura química de la Coclaurina .**  
**Fuente:** (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

1,2,3,4-tetrahydro-1-(p-hydroxybenzyl)-6-methoxy-7-isoquinolinol  
coclaurine, (+)-isomer  
coclaurine, (R)-isomer

## Asimilobina



**Figura N°12. Estructura química de la Asimilobina .**  
Fuente: (25) Comparative Toxicogenomics Database-2005.

asimilobine hydrochloride, (R-isomer)  
asimilobine perchlorate, (R)-isomer

A continuación presentamos una recopilación de los principales alcaloides encontrados en las diferentes partes del árbol de guanábana :

**TABLA N° 5**

**PRINCIPALES ALCALOIDES DE LA GUANÁBANA.**

<b>Componente</b>	<b>Clasificación Química</b>	<b>Parte de la planta</b>	<b>Originario de :</b>	<b>Cantidad</b>
Annonaine	Alcaloide isoquinolínico	Fruta	Surinam	No estimada
Anomuricine	Alcaloide isoquinolínico	Raíz Corteza Hojas	Guyana	No estimada
Anomurine	Alcaloide isoquinolínico	Raíz Corteza Hojas	Guyana	No estimada
Asimilobine	Alcaloide isoquinolínico	Fruta	Surinam	No estimada
Atherospermine	Alcaloide isoquinolínico	Corteza	Philippines	No estimada
Atherosperminine	Alcaloide isoquinolínico	Raíz Corteza	Guyana	No estimada
Coclaurine,(+):	Alcaloide isoquinolínico	Raíz Corteza Hojas	Guyana	No estimada
Coreximine, (+):	Alcaloide isoquinolínico	Raíz	Guyana	No estimada
Coreximine, (-):	Alcaloide isoquinolínico	Corteza Hojas	Guyana	No estimada
Reticuline	Alcaloide isoquinolínico	Corteza	Philippines	No estimada
Reticuline, (+)	Alcaloide isoquinolínico	Raíz Corteza Hojas	Guyana	No estimada
Tyramine	Alcaloide isoquinolínico	Hojas	Indonesia	No estimada

Fuente : (24) RAIN TREE –2005.

También debemos mencionar que investigaciones publicadas en la *Journal of Natural Products* <sup>10</sup>, se refieren con gran importancia a un metabolito secundario llamado Acetogeninas ; estas provienen de la condensación de varias unidades de acetato , forman compuestos de cadena de cadena abierta .Desde el punto de vista bioquímico , la unidad acetato es en realidad un “ ácido acético activado “ o rico en energía ,  $\text{CH}_3\text{Co}\sim\text{ScoA}$  ( acetil- coenzima A) , es decir , el resto acetilo se encuentra unido a la enzima formando un tioéster .

Tiene actividades citotóxicas , son miembros de una clase de derivado del poliketido caracterizados por la presencia de uno o dos tetrahidrofuranicos (THF) y los anillos en el centro de la cadena larga de alkyl con un terminal  $\gamma$ -Lactone .

Las acetogeninas clásicas pueden ser divididas en tres grupos :

Mono –tetrahidrofuranicos (THF).

Adyacentes bis –THF

No adyacentes Bis – THF .

A continuación comentaremos el mecanismo de acción como antitumoral de las acetogeninas como principio activo aislado de las anonáceas .

**Mecanismo de Acción de las Acetogeninas.-** Uno de los mayores obstáculos a la aplicación de quimioterapia en algunos tipos de tumores es la resistencia de estos a los fármacos antineoplásticos utilizados , que puede ser intrínseca o adquirirse durante el tratamiento . Uno de los mecanismos mediante el cual se llega a esta resistencia es el de la “multirresistencia a fármacos” (MDR o “multidrug resistance”) . Una de las principales características de la MDR es que , en algunos casos , las células seleccionadas en función de su resistencia a un agente

citostático son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, pues unos actúan como inhibidores de la síntesis de DNA o RNA, otros intervienen en la formación de la tubulina, otros en el potencial de membrana. Lo único que tienen en común estos compuestos es que son anfipáticos y que poseen anillos planos hidrofóbicos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los alcaloides de la vinca, las antraciclinas o podofilotoxinas. Otra característica de la MDR es la superproducción ya sea por amplificación genética y / o aumento de la expresión de una glicoproteína de membrana de 170 Kda que se denomina glicoproteína P o Pgp (de *p-glycoprotein*). Esta proteína parece ser la responsable de una disminución en los niveles de fármaco en el interior de las células tumorales mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP (de ahí proviene el nombre de glicoproteína P porque esta directamente implicada en la permeabilidad celular) y es el motivo de que algunos cánceres no respondan al tratamiento con fármacos antitumorales. La comprensión de los mecanismos mediante los cuales se adquiere este tipo de resistencia podría llevar al diseño de una estrategia para revertirla que podría utilizarse en el tratamiento de los enfermos de cáncer.

Aunque en otras especies pueden encontrarse hasta seis genes pertenecientes a la familia *mdr*, en humanos solo aparecen dos: el *mdr 1* que parece ser el responsable del fenotipo MDR, y el *mdr 2* que ha sido implicado en el transporte de fosfatidil colina. La Pgp está formada por 1.280 aminoácidos con dos dominios de unión a ATP citoplasmáticos y dos dominios hidrofóbicos, formados cada uno de ellos por seis fragmentos transmembranales que determinan la

especificidad de sustrato , al formar la vía por la que este atraviesa la membrana . Esta estructura se asemeja a la de la súper familia de proteínas transportadora tipo ABC ( de ATP binding cassette) que cuenta con mas de cuarenta miembros en bacterias y en eucariotas .

Un modelo postulado para el mecanismo de acción de esta proteína , es el de “aspirador hidrofóbico” según el cual el fármaco no solo es bombeado fuera de la célula tumoral sino que también se disminuye su entrada en esta . Los compuestos entran por difusión pasiva y son detectados nada mas al entrar en la membrana y expulsados al exterior de modo que no puedan alcanzar la concentración necesaria para ejercer su efecto citotóxico . Basándose en este mecanismo se ha desarrollado una estrategia en donde el agente antitumoral es suministrado mediante liposomas , facilitando así su entrada al citoplasma sin ser “ aspirado” por la GLICOPROTEINA p . Se ha detectado RNAm de glicoproteína P en muchos tejidos y tipos celulares , lo que sugiere que la proteína es constituyente normal de la célula . Su expresión suele localizarse en células de la corteza adrenal , en la superficie laminal de las células de tubulo proximal renal y en el páncreas , lo que lleva a pensar que el papel fisiológico normal de esta proteína es el de desintoxicante en dichas células . Hay que tener esto en cuenta a la hora de utilizar estrategias de bloqueo de esta proteína demasiado drásticas , por los posibles efectos secundarios que puedan provocar .

Existen varias estrategias para abordar el problema de la MDR , por ejemplo disminuyendo la expresión del gen *mdrL* , pero el que aquí se propone es el uso de inhibidores de la glicoproteína -P . Si la acción de esta proteína pudiera ser

modulada , se podría llegar a una concentración intracelular de fármaco suficiente para ejercer su efecto . Existen unos compuestos capaces de revertir la multirresistencia a fármacos en células MDR y que se denominan quimiosensibilizadores . No son tóxicos por si mismos y , en general , compiten con los fármacos antitumorales por la unión a la Pgp bloqueando así su actividad transportadora y aumentando la concentración intracelular de fármaco que ahora si alcanza niveles toxico . A veces , es necesario utilizar mezclas de quimiosensibilizadores para evitar la aparición de efectos secundarios . De este modo se han utilizado conjuntamente verapamil y quinina , o verapamil y ciclosporina A , con resultados positivos . Las acetogeninas de Anonáceas son agentes antitumorales y pesticidas , nuevos prometedores . Químicamente , son derivados de los ácidos grasos de cadena larga . Ellos exhiben sus bioactivos potentes para el vaciamiento de niveles de ATP , inhiben el compuesto I del mitocondrias , inhibiendo así la oxidación de NADH de membranas de plasma de células tumorigenas , así , ellos frustran los mecanismos de defensa y resistencia ATP .

### **III.-METODOLOGIA A EMPLEAR .**

#### **3.1.-Descripción de la metodología empleada para la Extracción de Alcaloides .**

La extracción de alcaloides en la presente investigación se inicia con la recolección y una serie de operaciones de acondicionamiento de la droga vegetal <sup>(1)</sup> como : lavado ,secado , molienda ; luego se procede a la obtención del extracto bruto alcaloidal mediante tres diferentes procesos de extracción :

- Extracción con solventes no miscibles con el agua .
- Extracción con solventes miscibles con el agua .
- Extracción con agua acidulada .

##### **a.- Recolección y acondicionamiento de la Droga vegetal .**

Toda planta medicinal tiene un momento adecuado para realizar su recolección .La determinación de los principios activos permite establecer con exactitud el tiempo y la etapa vegetativa correcta de recolección . Sin embargo para las plantas cuyos principios activos todavía no se conocen pueden aplicarse algunas reglas generales <sup>19</sup> .

Las cortezas deben ser recogidas en la primavera , en el inicio del verano o en el otoño . La atmósfera húmeda facilita la separación de la corteza .Las cortezas deben ser retiradas cuidadosamente y deben ser cortadas en segmentos verticales ,



tener cuidado de no hacer cortes horizontales en la corteza alrededor del tronco , ya que este procedimiento impide la circulación de la savia y produce la muerte de la planta .

Los órganos subterráneos; las raíces, los tubérculos deben ser recogidos durante el invierno, en el periodo de reposo vegetativo, cuando el principio vegetativo alcanza su grado máximo en estos órganos .

Las plantas herbáceas y las hojas deben recolectarse cuando se inicia la floración. Algunas plantas permiten más de un corte. A veces, cuando hay periodos secos y lluviosos muy definidos, la recolección de hojas se hace durante el periodo seco, lo que permite que la planta se regenere durante el periodo de lluvia . Los periodos de sequía y de lluvia influyen en el contenido de los principios activos .

#### **1.- Etapa vegetativa de recolección de la muestra vegetal.**

La concentración y la composición de los principios activos varían de acuerdo con la edad y el nivel de desarrollo de la planta .

Para determinar la etapa vegetativa más adecuada de recolección de la muestra vegetal de la planta de Guanábana se procede de la siguiente manera :

Mediante el análisis cualitativo con reactivos de precipitación de alcaloides ( Dragendorff, Mayer , Wagner) , se evalúa el contenido de alcaloides en hojas y cortezas de la *Annona muricata* en dos tiempos vegetativos de la planta .

Planta joven (antes de la primera floración).

Planta madura ( después de varias floraciones ) .

La muestra vegetal antes de la primera floración es recolectada de una planta de aproximadamente 1 año y medio de edad, aun sin presencia de florecimiento siendo la planta joven , ya que el árbol de Guanábana comienza su producción a partir de los dos años cultivados (planta nativa no injerto) , siendo el tiempo de floración de tres meses aprox . ( INIA-Perú 1998).

La muestra vegetal después de varias floraciones es recolectada de una planta de aprox . 3 años de edad después de dos floraciones .

Las hojas y cortezas fueron lavadas , secadas a estufa y molidas , luego se procedió a obtener el extracto vegetal mediante Soxhlet con metanol de 20 gr de muestra ( hojas y cortezas por separado ) ; estos extractos fueron secados en estufa y luego son disueltos en una solución de HCl al 5 % , obteniéndose así una solución de clorhidrato alcaloidal por cada muestra en los dos diferentes tiempos vegetativos .

En un tubo de ensayo se vierte 10 ml de la solución de clorhidrato alcaloidal obtenido respectivamente de cada muestra a analizar ; posteriormente se agrega 4 gotas de los reactivos de precipitación , observándose la formación de precipitado en cada uno de los tubos , de esta manera se puede seleccionar la muestra que presenta mayor cantidad de precipitado , siendo esta la que contiene mayor cantidad de alcaloides .

Estos precipitados formados son complejos metálicos alcaloidales los cuales son centrifugados , filtrados y posteriormente secados en estufa; de esta manera se puede dar una **cuantificación preliminar** mediante gravimetría sobre la cantidad de alcaloides en forma de complejo metálico .

Estos resultados nos permitirán determinar el tiempo de recolección de la muestra vegetal de la planta de Guanábana que se usara en adelante para los diferentes análisis presentados en la investigación .

## **2.- Acondicionamiento de la muestra vegetal.**

Una vez realizada la recolección de la droga vegetal en nuestro caso corteza y hojas de Guanábana se continua con el procesamiento pos-cosecha el cual tiene como objetivo la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la droga vegetal .

El procesamiento pos- cosecha adecuado consta de una limpieza y lavado e inmediato secado , un inadecuado procesamiento post-cosecha da como resultado una droga vegetal de baja calidad , con perdida de principios activos, así como un aumento de la carga microbiana y una pésima presentación comercial.

Las pérdidas de los principios activos involucran :

- Degradación por procesos metabólicos .
- Hidrólisis de los compuestos .
- Descomposición por la luz .
- Descomposición enzimática .
- Degradación de las sustancias termolábiles debido al calor .

- Volatilización de los aceites esenciales y
- Contaminación por hongos y bacterias .

La limpieza consta de la separación manual de las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataque por insectos y/o hongos.

El lavado de la droga vegetal consta de un enjuague con agua potable y un posterior enjuague con solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. El lavado con hipoclorito reduce la carga bacteriana ; sin embargo no se recomienda dejar mucho tiempo en contacto con la droga vegetal , ya que el poder oxidante del hipoclorito de sodio puede oxidar a los principios activos de la droga vegetal .

La etapa mas importante es el secado , el cual permite la conservación de la droga vegetal por tiempos prolongados .El contenido de humedad en las plantas frescas varía de 60% a 80% :El secado reduce este contenido a 0.5%-12%. Según el órgano de la planta, las pérdidas de peso durante el secado son :

Hojas            20% a 75%

Corteza        40% a 65%

El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación y de hidrólisis. Sin embargo, como este proceso involucra calor, pueden presentarse perdidas de algunas sustancias volátiles que pueda contener la droga vegetal . El secado puede ser realizado al sol o a la sombra , extendiendo la droga vegetal en capas finas, en una superficie limpia, pero este método no permite un control exacto de la temperatura de secado y debiéndose interrumpirse cuando empieza a anochecer ,es por ello que en la presente investigación se opta por el

secado en estufa con aire caliente a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 48 horas .

Una vez obtenida la droga vegetal seca se procede a la molienda la cual tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a etapa siguiente :extracción .

La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos seria incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, y seria igualmente muy lenta, ya que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción . En el caso específico de la droga previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo .

En la presente investigación, las hojas de guanábana son molidas en un molino de cuchillos y las cortezas por su dureza son molidas en un molino de martillo y luego pasados a un molino de cuchillas .

Tanto hojas como corteza de guanábana son molidas por separado hasta obtener una clasificación de polvo semi- fino pasando en su totalidad por un tamiz de abertura nominal de 495  $\mu\text{m}$ .

#### **b.- Extracción de alcaloides .**

Una vez teniendo suficiente muestra vegetal seca y molida ( hojas, corteza de Guanábana ), se procede a la de extracción de los alcaloides en cada una de las partes de la planta en estudio .

Es necesario saber que antes de empezar un proceso extractivo se debe definir el solvente a ser usado en el proceso según aspectos relacionados con la selectividad de los constituyentes químicos de interés , en nuestro caso alcaloides , la fácil manipulación , precio y los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental .

El solvente penetrará en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio al proceso extractivo .

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos : la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas y la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras la lixiviación de las células rotas es demasiado rápida , la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso comprende tres etapas : la penetración del solvente en la célula , la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal .

Las variables que interfieren en el proceso extractivo ya sean de alcaloides u otros componentes químicos vegetales son : el estado de división de la droga vegetal , la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción .

La eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. Por otro lado , la penetración del solvente en fragmentos mayores de la droga es

lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil , por esta razón, se recomienda la utilización de polvos moderadamente finos .

La eficiencia del proceso extractivo también es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado, es por ello necesario la recirculación del solvente para desplazar el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente , aumentando la eficiencia del proceso .

Teóricamente un aumento de temperatura facilita la disolución de las sustancias extraíbles, pero muchos principios activos son termoabiles y pueden ser destruidos es por ello que trabajar con temperaturas bajas es lo mas recomendable .

El pH influye en la solubilidad de los compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales, este es el caso de los alcaloides .

Dependiendo de la finalidad deseada , el solvente a utilizar extrae selectivamente o no, cierta clase de compuestos de interés .

Y por ultimo el tiempo de extracción el cual es resultante de todos los factores mencionados .

En la presente investigación se mantiene constante estas variables del proceso de extracción ya que se trabajara con varios métodos de extracción, pero es recomendable futuras investigaciones tomando en cuenta estas variables.

También es necesario saber la importancia que representa el proceso de extracción propiamente dicho , estos se pueden dividir en dos grupos :

- Procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración entre el soluto y el residuo .
- Procesos que agotan completamente la droga vegetal .

Los procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración son la maceración y los procesos que agotan completamente la droga vegetal son : la precolación y la extracción continua .

A continuación describiremos brevemente cada uno de estos procesos :

#### **Maceración.**

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días .Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente y depende de factores que están unidos a la droga vegetal como su tamaño de partícula, su contenido de humedad y factores que estén relacionados con el solvente, como la selectividad y la cantidad.

#### **Percolación.**

La precolación consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa .

Se trata de un proceso de paso, si bien hay una maceración previa el disolvente se renueva de modo continuo y debido a ello mantiene el gradiente de concentración lo mas alto posible, el disolvente corre de arriba a abajo a través de la capa de droga, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión.



La calidad del extracto depende al igual que la maceración del grado de finura de la droga, la velocidad de difusión de las sustancias activas desde la droga al disolvente y en la velocidad de pasaje del disolvente.

#### **Extracción continua.**

En este proceso el solvente fluye constantemente en contacto con la droga , solamente el solvente esta en movimiento , mientras que la droga vegetal permanece estática .El equipo usado para este tipo de extracción es el SOXHLET .

En la presente investigación solo se usara el SOXHLET como equipo de extracción .En el anexo N° (1) se presenta la descripción del funcionamiento de los equipos SOXHLET y Rotavapor los cuales serán mencionados posteriormente .

La extracción de alcaloides (extracto bruto alcaloidal) abarca :

- La obtención del extracto vegetal el cual contiene además de la totalidad de los alcaloides presentes en la droga vegetal , impurezas, entre las cuales podemos citar : grasas, ceras vegetales, resinas, colorantes, taninos y otros; seguido por :
- La purificación del extracto vegetal con el uso de solventes orgánicos y variación de PH , obteniendo así el extracto bruto alcaloidal .

En la presente investigación se plantea tres métodos de extracción :

- 1.- Extracción con solventes no miscibles con el agua .
- 2.- Extracción con solventes miscibles con el agua .
- 3.- Extracción con agua acidulada .

## **1.- Extracción con solventes no miscibles con el agua .**

En este proceso se pueden emplear solventes de baja polaridad ( no polares) como : tolueno, diclorometano , cloroformo, etc. En la presente investigación se selecciona el diclorometano como solvente en este proceso; basándose la selección en la baja polaridad que presenta este solvente y el bajo punto de ebullición , tabla N° 6 (Apéndice).

Los solventes no miscibles con el agua disuelven a los alcaloides en su forma de bases libres , pero no disuelven las respectivas sales . Como los alcaloides están presentes en la droga vegetal , tanto en su forma libre como en su forma de sales, junto con ácidos orgánicos de la propia planta, la droga vegetal debe ser sometida a un pretratamiento con soluciones alcalinas para liberar los alcaloides de sus sales .

La muestra seca y molida debe ser humedecida con una solución de carbonato de sodio al 5 % , teniendo la precaución de no dejarla completamente empapada . Esta mezcla debe realizarse por un periodo de 30 minutos , este tiempo es suficiente para liberar los alcaloides de sus sales . La muestra humedecida en la solución acuosa se hincha y aumenta su volumen causando su compactación y formando falsas vías durante el proceso de extracción , es por ello que debe secarse a estufa para recién iniciar la extracción .

La extracción se realiza en un equipo SOXHLET con una relación muestra seca y molida / solvente de 1:5 , el solvente circula por un periodo de 120 horas aprox. Hasta observar agotamiento en los cartuchos .

El extracto obtenido es filtrado a vacío para eliminar algunas impurezas , luego es concentrado en un Rotavapor , recuperando así las  $\frac{3}{4}$  partes del solvente usado .

El cartucho conteniendo la droga vegetal una vez agotado es eliminado .

Al extracto vegetal concentrado (  $\frac{1}{4}$  ) se le adiciona una solución de HCl al 5% , esta operación de extracción liquido-liquido es efectuada en una pera de bromo para facilitar la separación de las fases . La agitación debe ser lenta y en forma de círculos para evitar la formación de emulsiones inestables las cuales pueden obstaculizar la separación de las fases .

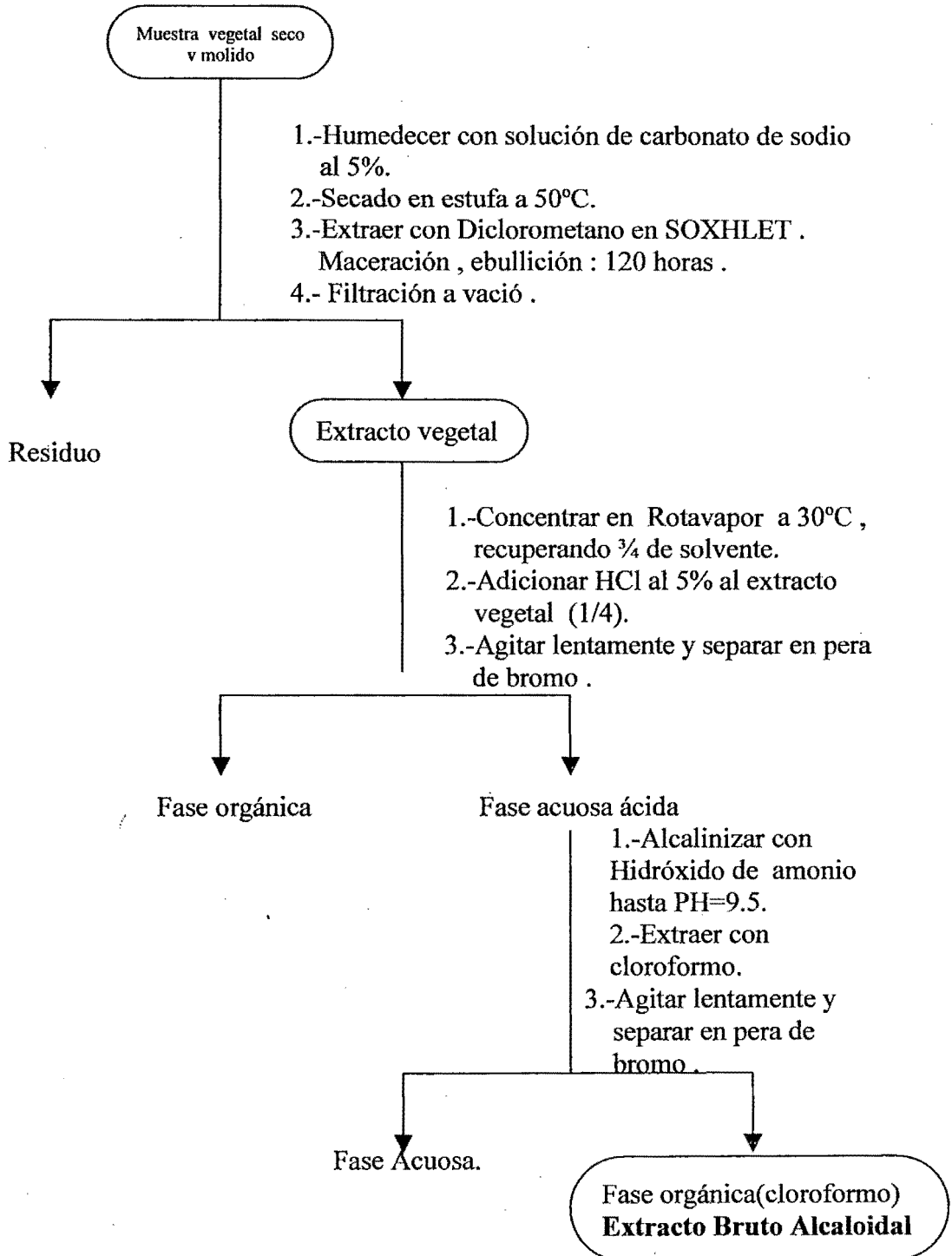
Una vez separado las fases se trabajará con la fase acuosa ácida , la cual debe ser alcalinizada utilizando hidróxido de amonio hasta un PH de 9.5 , luego se procede a la extracción liquido -liquido empleando cloroformo .Se utilizara el mismo equipo de separación de fases de la etapa anterior .La fase orgánica obtenida en la separación (cloroformo) es denominada extracto bruto alcaloidal .

Este extracto bruto alcaloidal obtenido debe ser posteriormente analizado para verificar la presencia de alcaloides , esta se realizara mediante las pruebas cualitativas posteriormente mencionadas .

A continuación se presenta un diagrama que permitirá el mejor entendimiento del método expuesto :

**DIAGRAMA N° 1 .**

**EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES CON SOLVENTES NO MISCIBLES  
CON EL AGUA .**



**Fuente :** (19) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos –2000.

## **2.- Extracción con solventes miscibles con el agua .**

En este proceso se emplean como solventes el metanol y etanol . Estos solventes son de alta polaridad y permiten extraer los alcaloides presentes en la droga vegetal , tanto en la forma libre como en la forma de sus sales . Por este motivo no es necesario el tratamiento previo con una solución alcalina .

En la presente investigación se selecciona el Metanol como solvente en este proceso; basándose la selección en la alta polaridad que presenta este solvente y el bajo punto de ebullición , tabla N° 6.

Con este proceso se agota rápidamente la muestra vegetal seca y molida , extrayendo además de los alcaloides, otras sustancias de naturaleza básica , ácida y neutra, así como pigmentos, taninos y otras impurezas .

La extracción se realiza en un equipo SOXHLET con una relación muestra vegetal seca y molida / solvente de 1:5 , el solvente circula por un periodo de 120 horas aprox. Hasta observar agotamiento en los cartuchos .

El extracto obtenido es filtrado a vacío para eliminar algunas impurezas , luego es concentrado en un Rotavapor , recuperando la mayor parte del solvente usado .

El extracto vegetal luego es secado en estufa a 30 °C hasta haberse evaporado todo el solvente residual .

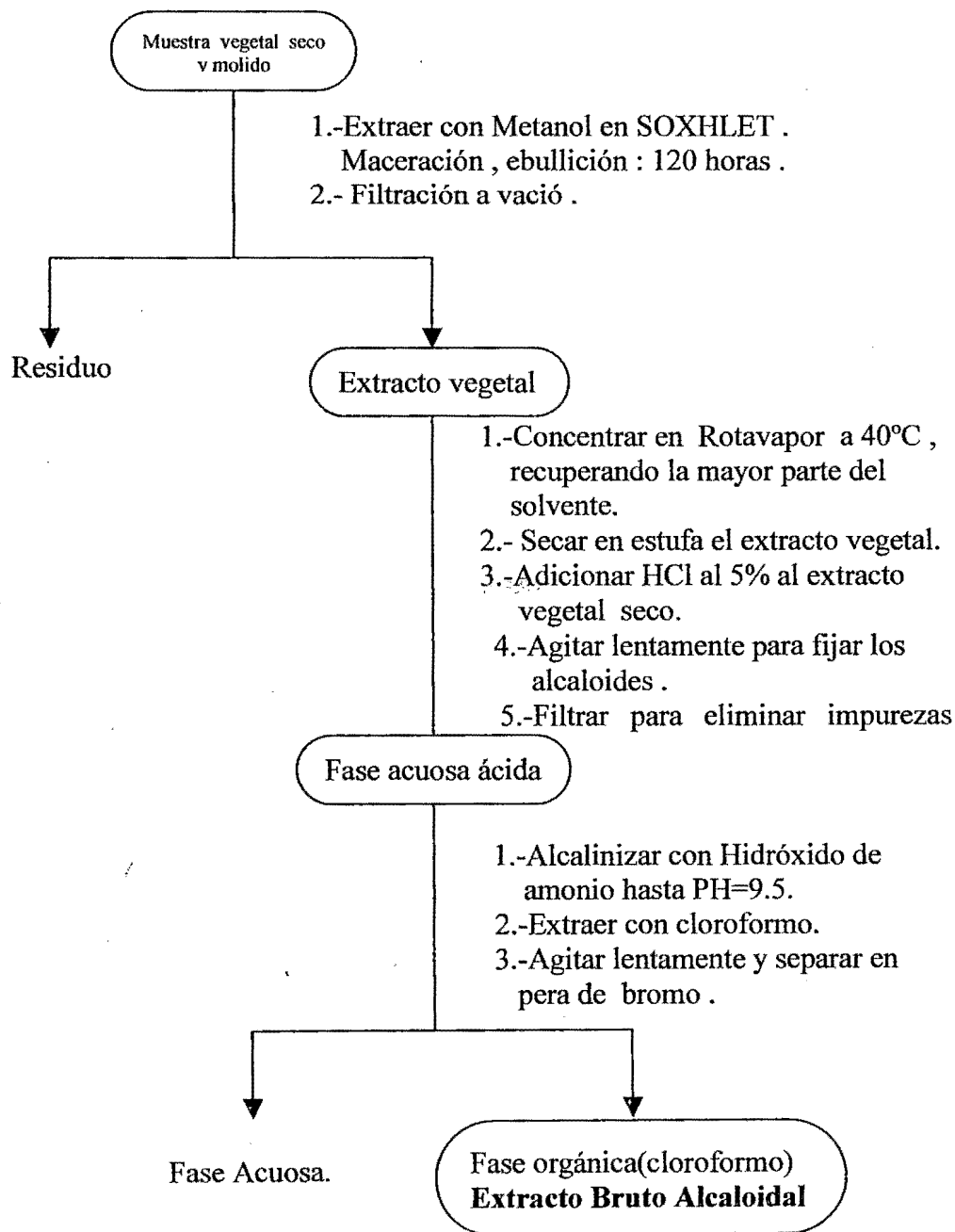
Al extracto vegetal seco se le adiciona una solución de HCl al 5% , se agita para poder fijar los alcaloides en la fase acuosa, en la forma de sales . Luego se procede a filtrar para eliminar impurezas oleosas y otros .

La fase acuosa ácida debe ser alcalinizada con hidróxido de amonio hasta un PH de 9.5 , luego se procede a la extracción liquido –liquido empleando cloroformo utilizando una pera de bromo para la separación de fases . La fase orgánica obtenida en la separación (cloroformo) es denominada extracto bruto alcaloidal . Este extracto bruto alcaloidal obtenido debe ser posteriormente analizado para verificar la presencia de alcaloides , esta se realizara mediante las pruebas cualitativas posteriormente mencionadas .

A continuación se presenta un diagrama que permitirá el mejor entendimiento del método expuesto :

## DIAGRAMA N° 2 .

### EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES CON SOLVENTES MISCIBLES CON EL AGUA .



Fuente : (19) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos –2000.

### **3.- Extracción con agua acidulada .**

En este proceso se usan como solventes soluciones acuosas de ácidos inorgánicos , tales como el sulfúrico ,el fosfórico , clorhídrico .

Al emplear soluciones acuosas de ácidos inorgánicos en la extracción , estas extraen de la planta todas las sustancias solubles en agua , tales como : almidón, saponinas y proteínas.

En la presente investigación se selecciona la solución de ácido clorhídrico al 1% como solvente en este proceso , debido a que este ácido es mas accesible de adquirir que los otros ácidos mencionados .

La muestra vegetal seca y molida es macerada en la solución acuosa ácida y posteriormente llevada a ebullición por corto tiempo , luego se procede a filtrar usando un filtro lento obteniéndose así el extracto vegetal .

Este extracto vegetal obtenido es luego alcalinizado con hidróxido de amonio hasta un PH de 9.5 , luego se procede a la extracción liquido –liquido empleando cloroformo utilizando una pera de bromo para la separación de fases . La fase orgánica obtenida en la separación (cloroformo) es denominada extracto bruto alcaloidal .

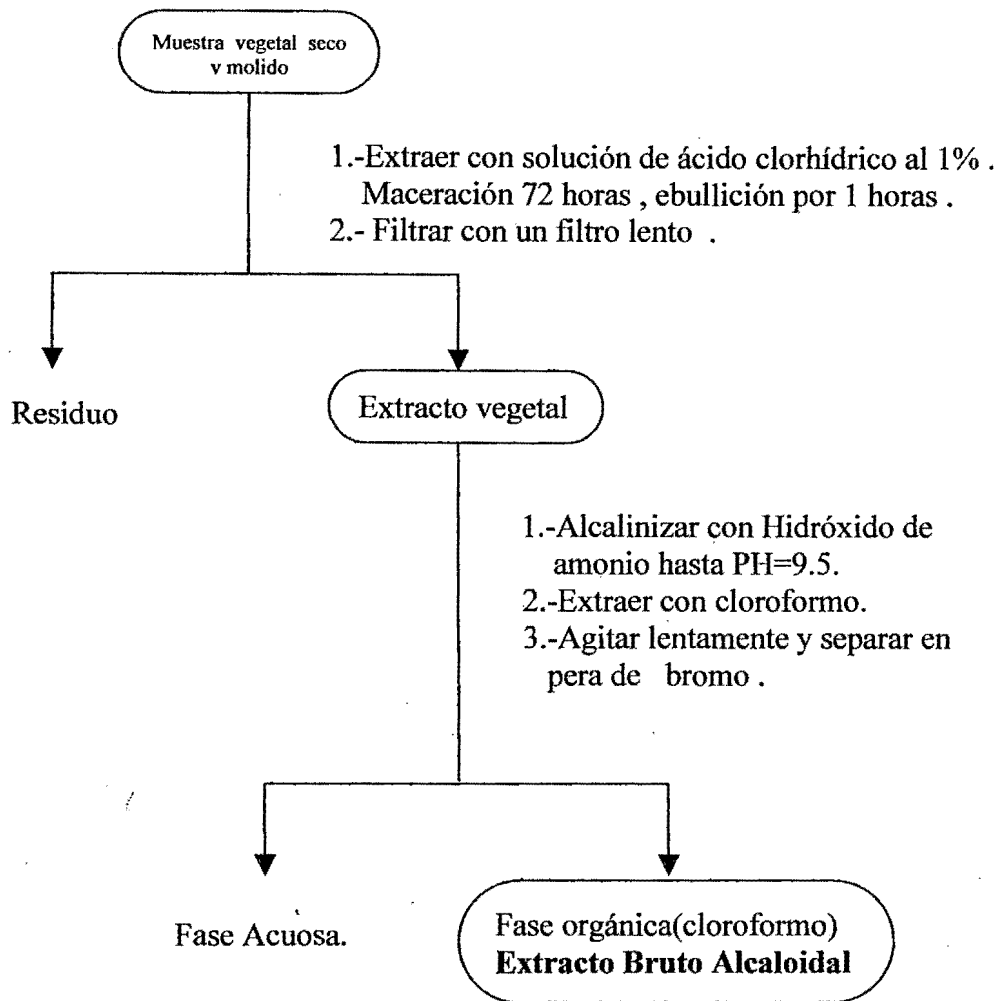
Este extracto bruto alcaloidal obtenido debe ser posteriormente analizado para verificar la presencia de alcaloides , esta se realizara mediante las pruebas cualitativas posteriormente mencionadas .

A continuación se presenta un diagrama que permitirá el mejor entendimiento del método expuesto :



**DIAGRAMA N° 3 .**

**EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES CON AGUA ACIDULADA .**



**Fuente :** (19) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos –2000.

### **3.2.-Descripción de la metodología empleada para los análisis químicos cualitativos .**

Mediante los análisis químicos cualitativos es posible la detección de los diferentes constituyentes químicos en el extracto vegetal de la planta en estudio .

Los alcaloides producen precipitados con un gran numero de reactivos, especialmente con los que contienen metales pesados . Los tres precipitantes de mayor uso los cuales fueron usados en esta investigación son : reactivo de Wagner, Mayer y Dragendorff , su preparación se presenta en el anexo (2).

Los reactivos de precipitación debe agregarse a soluciones de alcaloides un poco aciduladas con Ácido Clorhídrico, sulfúrico .

Cada extracto bruto alcaloidal obtenido por los tres diferentes métodos de extracción, fue concentrado y posteriormente se elimino el solvente residual y el extracto bruto alcaloidal seco ( base libre de alcaloides) fue tratado con una solución de Ácido clorhídrico al 1 % obteniendo de esta manera clorhidratos alcaloidales, a esta solución acuosa ácida se le realiza el análisis cualitativo para la detección de alcaloides de esta manera se pudo seleccionar el método de extracción de alcaloides más adecuado para nuestra droga vegetal en estudio.

Cuanto mas alcaloide presente una muestra mayor será la cantidad de precipitado que se obtenga con estos reactivos de precipitación .

En la presente investigación los análisis cualitativos definen el mejor método de extracción de alcaloides a partir de hojas , corteza de guanábana.

Los resultados se indican de acuerdo a la siguiente convención :

- (+) si se produce solo una ligera turbidez.
- (++) si se observa una turbidez definida .
- (+++) si se observa la formación de precipitado .
- ( - ) no se observa ningún cambio .

En la presente investigación se pretende también conocer los constituyentes químicos que puedan contener las hojas y corteza de la Guanábana a parte de los alcaloides, esto se puede realizar mediante análisis cualitativos llamadas marchas fitoquímicas .

#### **a.-MARCHA FITOQUÍMICA.**

La marcha fitoquímica consiste en la extracción de la planta con solventes adecuados y la aplicación de reacciones de precipitación . Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles.

Según los métodos descritos de extracción, se obtienen los extractos vegetales: extracto vegetal con solvente no miscible con el agua ( diclorometano ) pero sin tratar el material previamente con Carbonato de Sodio , extracto vegetal con solvente miscible con el agua ( metanol) y también es necesario contar con un extracto acuoso ( infusión ) .

Estos extractos son sometidos a una serie de reacciones de identificación las cuales permitirán la detección de diferentes compuestos tales como :

Quinonas , Hidroxilos fenólicas en general , Flavonoides , Saponinas .

A continuación se presenta una tabla indicando los compuestos que se pueden analizar en cada uno de los extractos obtenidos .

**TABLA N° 7**

**PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGANICOS EN EXTRACTOS VEGETALES .**

<b>Extracto vegetal</b>	<b>Compuesto a analizar</b>	<b>Prueba de identificación</b>
Diclorometano ( no polar)	Quinonas .	Borntrager
Metanol ( polar)	Hidroxilos fenólicos , flavonoides .	Cloruro férrico , Shinoda , respectivamente .
Acuoso	Hidroxilos fenólicos , flavonoides , saponinas.	Cloruro férrico , Shinoda , Espuma , respectivamente .

Elaboración propia .

## Reacciones de coloración y precipitación .

1. **Prueba de la espuma** : poner 1 ml del extracto en el tubo de ensayo y lleve a 5 ml con agua destilada . Agite vigorosamente por 30 segundos, espere 15 minutos ; la persistencia de la espuma nos indica la presencia de saponinas .
2. **Cloruro Férrico** : Tome 0.5 ml de extracto y añada 1 gota de solución férrica al 5%.Se debe observar una coloración azul o verde , que nos indica la presencia de OH fenólicos.
3. **Shinoda** : Tome 0.5 ml de extracto , agregue unos trocitos de magnesio metálicos y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado .  
La coloración rojiza nos indica la presencia de flavonoides .
4. **Borntrager** : Tome 0.5 ml de extracto y llevar a sequedad en estufa ; agregar 1 ml de tolueno y 1 ml de NaOH al 5% .  
La aparición de una coloración roja en la fase acuosa , nos indica la presencia de antraquinonas y naftoquinonas .

Una vez termina los ensayos de identificación se procede a realizar un cuadro de resultados , para el cual se usa la convención antes descrita .

Otro análisis cualitativo de importancia es la cromatografía de capa fina con la cual es posible determinar cuantos alcaloides pueden estar presentes en el extracto bruto alcaloidal . A continuación describiremos el Análisis de cromatografía en Capa fina y su metodología :

#### **b.-Cromatografía de Capa Fina .**

Los principios de la cromatografía de capa fina (CCF) tuvieron aplicación universal a partir de 1958, año en que Egon Stall generalizo el procedimiento , considerándola como un método de análisis de la Cromatografía de absorción .

La cromatografía de papel también puede ser utilizada para análisis cualitativo , siendo la CCF mas ventajosa que esta por las siguientes razones :

- Requiere de menor tiempo para efectuar la separación, generalmente de 30 – 60 minutos .
- El consumo de solventes es menor .
- La separación es mas precisa .

Este análisis cualitativo consta de una fase estacionaria (adsorbente) que se encuentra depositada formando una capa fina de espesor uniforme, sobre una placa de vidrio ,o una lamina metálica. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación . Cuando el disolvente se encuentra próximo al

extremo superior de la placa , ésta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas .

La cromatografía de capa fina es cualitativo y cuantitativo si se cuenta con patrones de los compuestos a identificar , de no contar con estos patrones como es nuestro caso , solo servirá para determinar el numero de componentes que contiene el extracto bruto alcaloidal .

A continuación se describe cada paso a seguir :

#### **a.- Preparación de las placas (Adsorbentes).**

Se utiliza una cantidad adecuada de polvo seco (sílica gel) agregándose agua destilada lentamente y con agitación, hasta que se obtenga una crema espesa , en una proporción de 25 gr. de Sílica Gel con 50 ml de agua destilada, aunque hay casos que en vez de agua se emplean ácidos, bases, tampones o reactivos acomplejantes y en lugar de sílica gel , se puede utilizar aluminio o celulosa .

Luego de efectuar la mezcla, homogenizar bien la papilla para eliminar cualquier grumo.

Posteriormente se extiende la mezcla sobre placas de vidrio. Este extendido se puede realizar por varios métodos : aplicación directa, mediante la ayuda de una bageta, de un extensor comercial , etc .

Para evitar la molestia de preparar placas existen dos posibilidades : placas preparadas (Merck) y los cromatofolios .

En la presente investigación se usaron las placas preparadas de Merck .

### **b.- Aplicación de las muestras sobre las placas .**

Para efectuar una adecuada cromatografía de capa fina se debe proceder a efectuar la activación de las placas, que consiste en secar las placas ya preparadas, calentándolas en una estufa a una temperatura de 100 a 105 °C durante 30 minutos a 1 hora .

Luego , con la ayuda de un capilar , microgeringa o micropiteta, se aplica la muestra sobre la línea base y entre cada aplicación se deja evaporar el disolvente, y como generalmente la evaporación es tan rápido, no necesita la ayuda de un secador de cabello u otro aparato similar .

### **c.- Desarrollo de las placas .**

El desarrollo se lleva acabo en cubetas de vidrio, que se cierran herméticamente.

Si se desea desarrollar mas de una placa a la vez, se introducen en una cubeta mayor, con gradilla especial .

En el interior de la cubeta, se coloca un papel filtro empapado del disolvente ( **eluyente** ) , que cubra las paredes interiores de las mismas , para conseguir que la atmósfera este saturada de vapor de disolvente .

El fondo de la cubeta se cubre con disolvente hasta una altura de 0.5-1 cm y después de un periodo de tiempo apropiado, se introduce la placa . La elección del disolvente dependerá de la naturaleza del compuesto que se va a separar y del



material en que la separación va a llevarse a efecto , la comparación de la polaridad del mismo y la de la sustancia que se desea separar .

Los eluyentes utilizados para la identificación de alcaloides por cromatografía son los siguientes :

- nButanol – Ácido Acético –Agua (4:1:1)
- nButanol – Ácido Acético –Agua (4:2:1)
- Acetato de Etilo – Metanol – NH<sub>3</sub> (ac) 25 % (45:35:20)
- Cloroformo – Metanol – NH<sub>3</sub> 10 % (88:20:15)
- Cloroformo –Metanol –NH<sub>3</sub> (gotas) (80:20 ) Según DININCRI.

En la presente investigación se trabajo con el quinto sistema de eluyente por ser los reactivos mas comunes .

Durante el desarrollo, no se puede mover la cubeta .Por lo general cuando se esta desarrollando una placa, se deja que ascienda el disolvente unos 10 cm . por encima del origen y se saca la placa. El frente del disolvente se marca cuidadosamente con un lápiz y se deja evaporar el mismo, operación que dura unos pocos minutos .

Si se desea se puede visualizar los alcaloides, después de haber sacado las placa de la cuba libre de todo olor . Si es necesario se calienta la palca antes de llevarla a una lámpara con luz UV.

#### **d.- Revelado de la placa .**

La mayoría de alcaloides presentan fluorescencia típica y pueden ser observadas a la luz UV (365 nm).

La presencia de un compuesto activo en el ultravioleta evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado se traduce en la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto .

Otra forma de visualizar los componentes separados es mediante un agente revelador , este tiene que reaccionar con los productos absorbidos proporcionando compuestos colorados .

En el caso de los alcaloides el revelador usado es el reactivo de Dragendorff el cual fue aplicado en esta investigación por medio de una asperización a toda la placa , después es secado al ambiente o a la estufa y se observa las manchas de color naranja .

Esta placa se puede fotografiar o dibujar la posición de las manchas después del revelado .

Una vez revelado el cromatograma se puede determinar los  $R_f$  para cada componente separado en el cromatófolio , este valor  $R_f$  ( o factor de Retención ) constituye la proporción de la distancia de la línea de partida y del centro de la mancha ( $D_a$ ) y la altura de la zona húmeda de la línea de partida ( $D_z$ ).

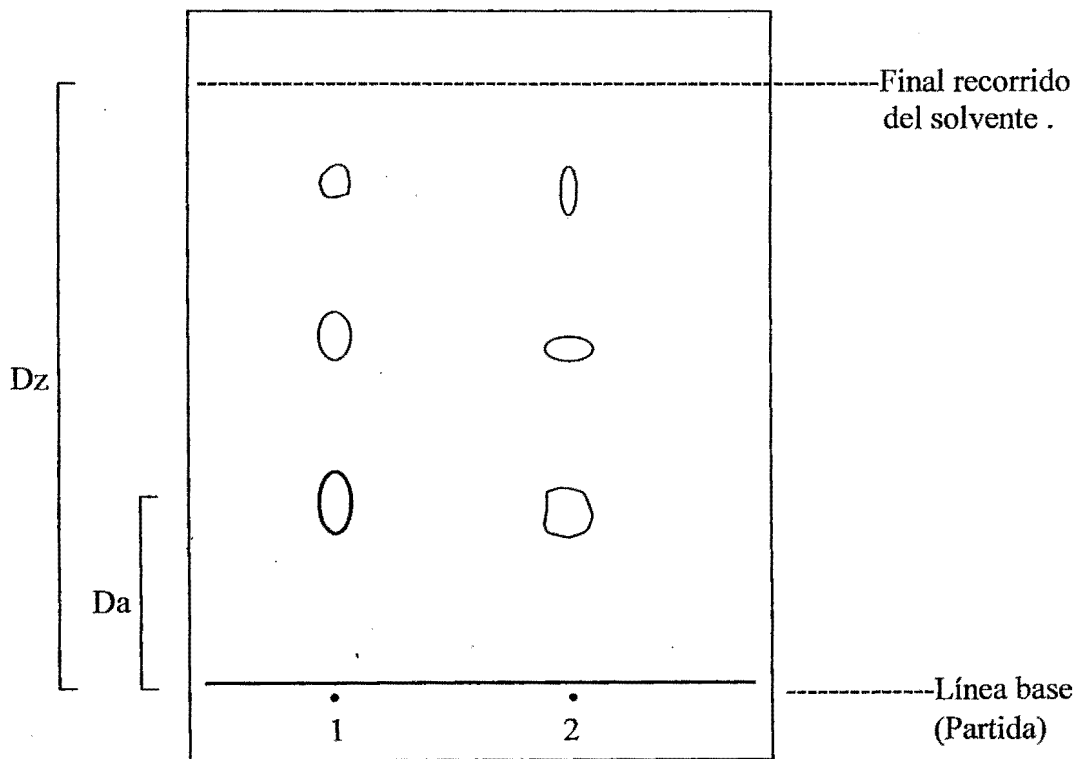
$$R_f = \frac{D_a}{D_z}$$

Donde :

$D_a$  : Distancia de la línea de partida ( punto de siembra ) al centro de la mancha .

$D_z$  : Distancia de la línea de partida al frente del solvente .

El  $R_f$  es un valor característico y constante para cada sustancia , reproducible bajo las mismas condiciones ( sistema de solvente , temperatura , etc ) .



**Figura 13 . Cromatograma Unidimensional .**

**Fuente:** Elaboración Propia .

### **3.3.-Descripción de la metodología empleada para los análisis químicos cuantitativos .**

Para poder realizar una correcta determinación del contenido alcaloidal , se debe tener cuidado en la extracción tanto en el proceso mismo, como de los factores que pudieran producir artefactos .

A continuación se describen los principales métodos de determinación de alcaloides según farmacopea Española (MGA 0051).

**a.- Gravimetría.-** Los ensayos gravimétricos, son generalmente utilizados para el análisis de compuestos esencialmente neutros o sales de bases que son demasiado débiles para ser titulados en sistemas acuosos . Los principales procedimientos de este tipo son : peso directo de la base aislada y precipitación cuantitativa de compuestos insolubles .

**b.- Volumetría .-** Si los alcaloides van a ser analizados por volumetría , el extracto bruto alcaloidal debe ser acondicionado según la clase de titulación ácido-base que se utilice . Antes de titular se añadirá una cantidad exactamente medida de ácido .El exceso de ácido que va a reaccionar con los alcaloides va a ser determinada por la titulación con un álcali de normalidad conocida .

Como regla se puede decir que la determinación cuantitativa por métodos volumétricos es mas exacta que los gravimétricos , ya que en estos métodos existen muchas impurezas que no pueden ser removidas y que están presentes en el residuo alcaloidal y que son computados como alcaloides al pesar el residuo .

En cambio , en métodos volumétricos , estas impurezas no afectan el resultado , a menos que se trate de impurezas ácidas o básicas .

En esta investigación , primero se selecciona el método de extracción que haya dado mejores resultados en el análisis cualitativo de identificación de alcaloides , luego este método es cuantificado por lo antes descrito .

El extracto bruto alcaloidal (solución clorofórmica ) también puede ser titulado directamente , pero los reactivos para este tipo de titulación son poco comerciales.

Para la determinación cuantitativa de alcaloides de las hojas y cortezas de Guanábana se siguió la metodología planteada para la cuantificación de alcaloides por volumetría en medio acuosos , del Centro de Control de Productos Biológicos y Medicamentos del Instituto Nacional de Salud-Perú.

Por referencia esta metodología fue empleada para la determinación de Lupanina y esparteína , para el cual contaron con estándares los cuales permitían cuantificar un alcaloide específico por comparación en el gasto de álcali ; pero en nuestro caso no se cuenta con estándares por lo cual la determinación solo es de alcaloides totales .

A continuación se describe la metodología para la cuantificación de alcaloides por volumetría del Centro de Control de Productos Biológicos y Medicamentos del Instituto Nacional de Salud-Perú.

**a.-Método de Titulación Ácido – base en medio acuoso.**

1. Secar el extracto bruto alcaloidal , agregar un volumen definido de cloroformo, pesar y calcular la densidad del extracto bruto alcaloidal .
2. Agregar 5 ml de HCl 0.01 N ( exactamente medidos).
3. Calentar hasta evaporar el cloroformo .
4. Añadir 20 ml de agua destilada .
5. Adicionar 4-5 gotas de indicador rojo de metilo .
6. Titular con Hidróxido de sodio 0.01 N con la ayuda de una bureta .
7. El punto final de la titulación esta dado por el viraje de color rojo a amarillo .

**b.-Método de Titulación Ácido – base en medio no acuoso.**

1. Secar el extracto bruto alcaloidal , agregar un volumen definido de cloroformo, pesar y calcular la densidad del extracto bruto alcaloidal .
2. Adicionar 4-5 gotas de indicador Tetra bromofenolftaléin ester .
3. Titular con Ácido Paratoluensulfónico 0.01 N (disuelto en cloroformo) .
4. El punto final de la titulación es el viraje de violeta a amarillo .

A continuación se presentan los cálculos para la cuantificación de los alcaloides :

**Titulación Ácido – base en medio acuoso.**

$$\% \text{ Alcaloides Totales} = \frac{(A \times \text{factorA} - B \times \text{factorB})}{\text{gr de muestra en 1 ml}} \times 0.24836$$

Donde :

A = ml de ácido clorhídrico 0.01 n utilizado .

B = ml de hidróxido de sodio 0.01 N gastado.

Factor A : factor de corrección del ácido .

Factor B : factor de corrección del álcali .

**Titulación Ácido – base en medio no acuoso.**

$$\% \text{ Alcaloides Totales} = \frac{A \times \text{factorA}}{\text{gr de muestra en 1 ml}} \times 0.24836$$

Donde :

A = ml de ácido paratoluensulfónico 0.01 n utilizado .

Factor A : factor de corrección del ácido .

0.24836 = factor utilizado para soluciones 0.01 N .

En el anexo (“) se presenta una descripción de la preparación de los indicadores y las soluciones usadas .

### **3.4.-Descripción de la metodología empleada para los análisis microbiológicos .**

La actividad microbiológica de un principio activo vegetal se determina encontrando la dosis a la cual inhibe el crecimiento de un microorganismo adecuado .

Una reducción en la actividad microbiana puede revelar cambios no demostrables por métodos químicos .

Para determinar la actividad microbiológica de los principios activos se emplean dos métodos generales :

El cilindro o de “placa” y el turbidimétrico o de “tubo”. El primero se basa en la difusión del extracto con el principio activo contenido en un cilindro vegetal o disco de papel filtro, a través de una capa de agar solidificado en una caja Petri o placa , en una extensión tal , que el crecimiento del microorganismo agregado se detenga en un área circular o “zona” alrededor del cilindro que contiene el extracto con el principio activo .

El método turbidimétrico o dilución en tubo es aquel en el cual se utilizan una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril y varias concentraciones del extracto bruto alcaloidal . A todos los tubos se inocula el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo.

Posteriormente se examinan los tubos para determinar en cuáles de ellos se ha inhibido el crecimiento del microorganismo. También se calcula la concentración



mínima inhibitoria (CMI) que es la concentración más baja capaz de prevenir el crecimiento del microorganismo.

El microorganismo que se usará en la presente investigación será los *Enterococcus Faecalis*.

Los enterococcus son cocos Gram + que se agrupan en pares o cadenas cortas, son anaerobios facultativos, capaces de desarrollar en condiciones extremas tales como NaCl 6.5%, pH 9.6 y a temperaturas que oscilan entre 10-45°C. Pueden sobrevivir 30 min a 60°C y desarrollan en presencia de 40% de sales biliares, la resistencia de los enterococcus a múltiples agentes antimicrobianos le permite sobrevivir y proliferar en pacientes que reciben tratamiento antimicrobiano. Esto da cuenta de la habilidad de los enterococcus para sobre infectar pacientes que están recibiendo antimicrobianos de amplio espectro. Los enterococcus pueden adherirse a las válvulas cardíacas y a las células epiteliales renales, propiedades que sin duda contribuyen a su habilidad para causar endocarditis e infecciones del tracto urinario.

Por formar parte de la flora intestinal los enterococcus son capaces de producir infecciones en pacientes ambulatorios u hospital. Debido a peligrosidad de este microorganismo para producir infecciones es seleccionado para poder analizar su inhibición con el extracto en estudio de la presente investigación y ya que los antecedentes remarcan a los alcaloides de esta planta (*Anona muricata*) como antimicrobianos.

Según los resultados que se obtengan de los análisis cuantitativos , se elige el extracto bruto alcaloidal que contenga mayor cantidad de alcaloides y este será sometido al análisis microbiológico .

En la presente investigación se utilizara el Método Turbidimétrico para el análisis microbiológico , debido a que este método proporciona un resultado cuantitativo de la concentración de agente antimicrobiano necesaria para inhibir el desarrollo de un microorganismo dado.

#### **Método Turbidimétrico .**

Según Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos -1988 , MGA 0100- Potencia Microbiológica de Antibióticos .

El extracto bruto alcaloidal (clorofórmico), de debe transformar a extracto acuoso de Clorhidrato alcaloidal , esto se logra :

Secando el extracto bruto alcaloidal (clorofórmico) en la estufa a 30°C y agregando 10 ml de HCl 0.01 N agitando y filtrando para eliminar alguna impureza .

El extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal es analizado mediante el método Turbidimétrico .

### **Paso # 1**

En 6 tubos de ensayo previamente esterilizados se procede a la preparación de las diluciones del extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal .

En el 1<sup>er</sup> tubo se agrega 8 ml de extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal + 2 ml de Agua destilada (8/10 ) y se agita , de este tubo se saca 5 ml de solución y se vierte en el 2<sup>do</sup> tubo al cual se le agrega 5 ml de Agua destilada obteniendo así la dilución (4/10); este procedimiento se repite hasta el 6<sup>to</sup> tubo obteniéndose la dilución ( 0.25/10), de este ultimo tubo se desecha 1 ml para mantener volúmenes iguales en los tubos .

### **Paso # 2**

Se prepara el caldo nutritivo : 0.8gr Caldo (polvo) en 100 ml de Agua .

El microorganismo en este caso Enterococcus se aísla a un tubo con caldo nutritivo y se agita , a esto se le llamará en adelante “Cepa”.

Se preparan 7 tubos de ensayo con 9 ml de caldo nutritivo c/u al cual se le agrega 1 ml de dilución de extracto de los tubos del paso #1 respectivamente ,el 7<sup>mo</sup> tubo se deja solo con el caldo nutritivo .

A los 7 tubos se le adiciona 0.1 ml de Cepa , el 7<sup>mo</sup> tubo el cual contiene solo caldo y Cepa será llamado “Control”.

Estos tubos son llevados a encubar por 24 horas a 37 °C .

### **Paso # 3**

Se preparan 2 juegos de 7 tubos de ensayo con 9 ml de Agar Nutritivo c/u.

Inmediatamente después de inoculado la Cepa se toma una alícuota de 1 ml de cada uno de los tubos anteriores y se vierte cada uno respectivamente en el 1<sup>er</sup> juego de tubos que contiene 9 ml de Agar nutritivo , de estos tubos se saca 1 ml y se agrega al 2<sup>do</sup> juego de tubos respectivamente ,de estos tubos se desecha 1 ml para mantener volúmenes iguales en todos los tubos .

Solo el 2<sup>do</sup> juego de tubos es plaqueado en placa petri e incubado por 24 horas a 37 °C , luego se realiza el conteo de placa para conocer el número de microorganismos al comienzo de la prueba .

Resultados a las 24 horas :

Se compara el grado de turbidez de los 6 tubos de concentración decreciente con respecto al tubo control .

Se plaquea la dilución como lo vimos anteriormente para poder proceder el conteo de cada concentración decreciente .

Así se obtienen resultados cada 24 horas mas .

Luego se procede a realizar tablas del conteo de colonias de los microorganismos en el tiempo por cada concentración analizada y el control .

Con estos datos se procede a hallar el porcentaje de eficiencia con la siguiente formula:

$$\% = \frac{(C - F)}{(C - I)} \times 100$$

Donde :

Llamemos "C" al último número del crecimiento del control .

Llamemos "I" al número inicial de las bacterias .

Llamemos "F" al último número de crecimiento de la máxima concentración .

La CMI existe si el conteo en el tiempo alcanza el 0.1 % del conteo inicial .

Con los datos de la tabla se procede a determinar los **log (UFC)/ml** y se grafica

Vs. El tiempo .

## **IV.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .**

### **4.1.- Equipos y materiales .**

A continuación presentaremos los equipos , materiales , reactivos y solventes usados en la investigación .

#### **Reactivos y Solventes .**

- Diclorometano G. R. .
- Metanol G. R..
- Cloroformo .
- Acetona.
- Tolueno.
- Hipoclorito de sodio al 5 %
- Carbonato de Sodio al 5%
- Hidróxido de sodio en perlas .
- Ácido clorhídrico conc.
- Hidróxido de Amonio .
- Amoniaco.
- Nitrato Básico de Bismuto .
- Ácido Tartárico.
- Yoduro de Potasio.

- Cloruro de Mercurio II.
- Yodo Bisublimado .
- Cloruro Férrico al 5%.
- Rojo de Metilo .

### **Materiales .**

- Pipetas .
- Mechero Bunsen.
- Aza de siembra .
- Placas petri .
- Gradillas.
- Tubo de ensayo.
- Balones de 250 ml .
- Pera de separación .
- Matraces .
- Vaso Beacker .
- Bagetas.
- Bureta .
- Viales de 20 ml.
- Frascos ámbar de 100 ml .
- Embudo de vidrio .
- Soporte universal .

- Microgeringa de 25  $\mu$ L ( 0.025 ml).
- Papel filtro #42 (125 mm  $\varnothing$ ).
- Papel indicado de PH.

### **Equipos.**

- Balanza analítica .
- Molino de martillo.
- Calentador tipo plancha de Laboratorio .

Marca : ESZTERCOM  
 Tipo : UE 801

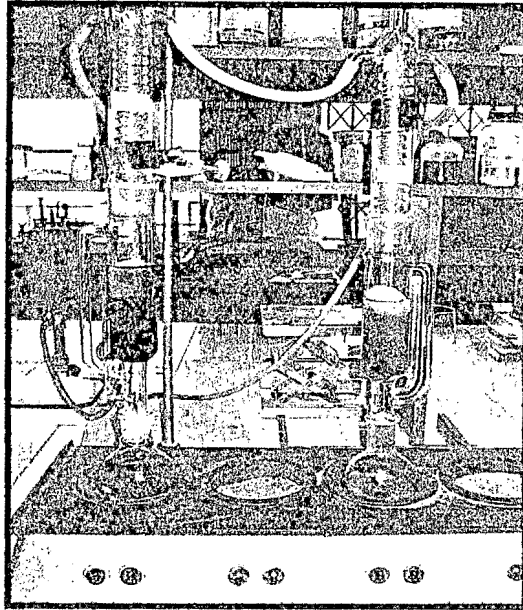
- Campana extractora eléctrica.
- Mufla eléctrica.
- Desecador de Sílica
- Autoclave .
- Incubadora eléctrica .
- Estufa eléctrica .

Marca : Karl Kolb  
 Tipo : U 50  
 D- 6072 Dreieich – West Germany .

- Molino de cuchillas .
- Tipo : DC FH 48
- Rop-Tap –Manual .



- Equipo Soxhlet de 250 ml de capacidad .



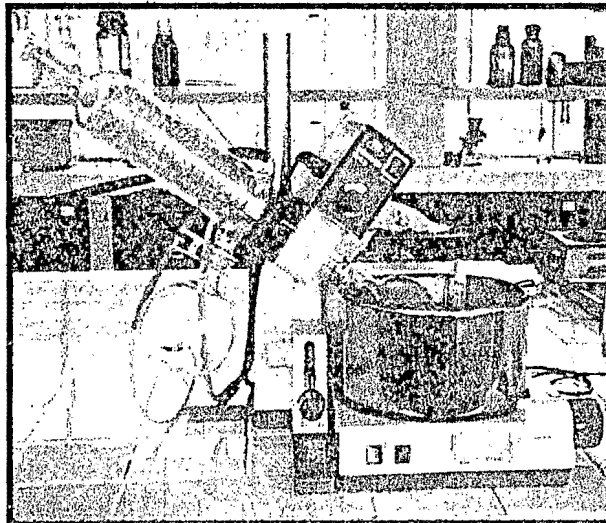
**Figura N°14 . Equipo SOXHLET**

**Fuente : Centro Experimental Tecnológico ,UNAC –2005**

- Rotavapor

Marca : Flavil /SCHWEIZ  
Laboratoriums -Technik

Tipo : RE-120



**Figura N°15 .Rotavapor.**

**Fuente : Centro Experimental Tecnológico ,UNAC –2005.**

- Bomba de vacío.

Marca : Newberger  
78 Freiburg  
Tipo : MW63/4

- Cuba de vidrio para cromatografía .
- Equipo de vidrio de aspersion (100ml).
- Lámpara ultravioleta –Infrarrojo (365 nm )

Marca : Heraeus Germany  
Tipo : 5340

## 4.2.- Preparación de la muestra .

### 4.2.1.- Etapa vegetativa de recolección de la muestra vegetal .

Se presenta a continuación los resultados obtenidos en el análisis cualitativo realizado para las muestras ( hojas y corteza ) en las dos diferentes etapas vegetativas de la Guanábana (*Anona muricata*) y la cuantificación del complejo alcaloidal formado por los reactivos de identificación .

**TABLA 8.**

#### **ANÁLISIS CUALITATIVOS EN DOS ETAPAS VEGETATIVAS DE LA GUANÁBANA .**

REACTIVO DE IDENTIFICACION	PLANTA JOVEN		PLANTA MADURA	
	HOJAS	CORTEZA	HOJAS	CORTEZA
<b>DRAGENDORFF</b>	++	+	+	-
<b>MAYER</b>	++	+	+	-
<b>WAGNER</b>	++	+	+	-

++ : formación de precipitado .

+ : Turbidez definida .

- : no se observa cambios

**TABLA 9.****CUANTIFICACION DE LOS COMPLEJOS METALICOS  
ALCALOIDALES EN DOS ETAPAS VEGETATIVAS DE LA  
GUANÁBANA.**

<b>Reactivo de identificación</b>	<b>Gr de Complejo Alcaloidal</b>				
	<b>Corrida Experim.</b>	<b>Planta Joven</b>		<b>Planta Madura</b>	
		<b>Hojas</b>	<b>Corteza</b>	<b>Hojas</b>	<b>Corteza</b>
<b>Dragendorff</b>	C1	1.01	0.52	0.27	0
	C2	0.97	0.54	0.26	0
<b>Wagner</b>	C1	0.99	0.43	0.29	0
	C2	1	0.43	0.28	0
<b>Mayer</b>	C1	0.82	0.38	0.18	0
	C2	0.85	0.31	0.15	0

C1, C2: corridas experimentales .

De los resultados presentados se determina que la en la etapa vegetativa antes de la primera floración se presenta mayor cantidad de alcaloides; por lo tanto todos los análisis presentados en la tesis se referirán a una muestra recolectada antes de la primera floración ( 1 1/2 de edad aprox. de la planta ).

Las hojas, corteza de Guanábana fueron recolectadas el 15 de Febrero del 2005 a las 2 de la tarde de un árbol de aprox. 1 ½ de edad sin presencia de florecimiento en Pachacamac – Casablanca, zona de plantación de Guanábana.

Una muestra fue llevada para su reconocimiento al Museo de Historia Nacional de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se recolectaron aprox. 3 Kilos de hojas, 2 Kilos de corteza de Guanábana.

Se debe tener presente que antes de empezar cualquier operación se debe tener completamente limpio cualquier utensilio, equipo a usar.

#### **4.2.2.- Limpieza .**

Las hojas fueron separadas de sus ramas manualmente, se eliminaron las hojas deterioradas o manchadas con señales de ataque de insectos.

Luego se dio un enjuague con agua potable, posteriormente un enjuague con solución de Hipoclorito de sodio al 0.5 % y por último un enjuague con agua destilada. Posteriormente fueron llevadas a un ambiente abierto pero no expuesto al sol hasta que pierda un poco su humedad, luego son secadas en estufa.

La corteza fue separada del tallo de la planta en forma vertical, inmediatamente fueron lavadas con la solución de Hipoclorito de sodio al 0.5% y posteriormente un enjuague con agua destilada y son llevadas a un ambiente abierto pero no expuesto al sol hasta que pierda un poco su humedad, luego son secadas en estufa.

El lavado de la corteza debe ser muy rápido para evitar la oxidación de la parte interna .

W hojas frescas = 2.6 KG.

W corteza fresca = 1.7 KG.

#### **4.2.3.- Secado .**

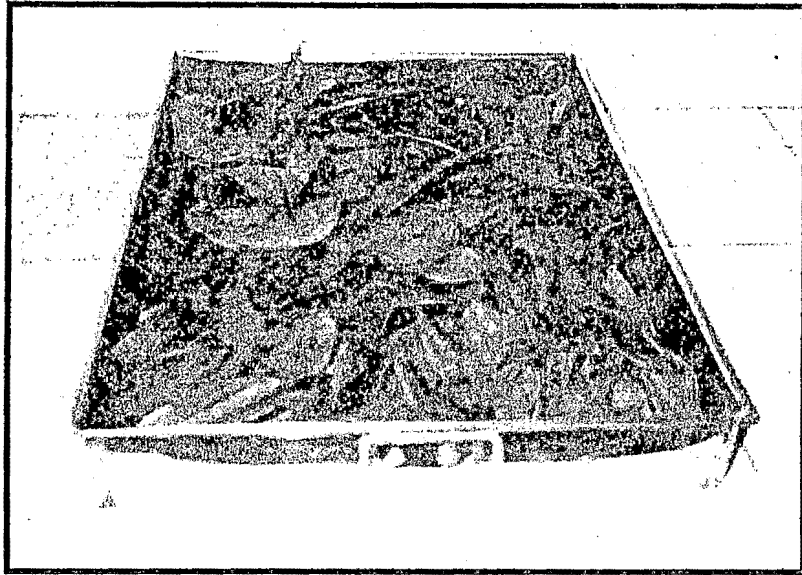
Las hojas fueron colocadas en la estufa completamente esparcidas en planchas con orificios abiertos esto es para evitar la acumulación de agua , son llevadas a 60 °C por un tiempo de 48 horas hasta observar que estén completamente secas y con fácil trituración manual.

Las cortezas fueron colocadas en la estufa en las mismas condiciones que las hojas pero permanecen en ella por un tiempo de 72 horas ya que estas son mas duras , necesitan mayor tiempo para su secado .

Una vez secas fueron guardadas en bolsas de polietileno completamente selladas hasta pasar a molienda .

W hojas secas = 702 gr.

W corteza seca = 850 gr.



**Figura N° 16: Hojas secas de Guanábana (*Anona muricata*).**



**Figura N° 17. Cortezas secas de Guanábana (*Anona muricata*)**

**Fuente : Elaboración Propia.**

#### 4.2.4.- Molienda .

Las hojas secas fueron trituradas manualmente para reducir su tamaño antes de entrar al molino de cuchillas , se recogió en un envase completamente seco de acero y tapado para evitar demasiada perdida de polvo al ambiente .

Las cortezas secas pasaron por un molino de martillo y fueron recogidos en bolsa de polietileno , como no son reducidos completamente , se pasaron posteriormente por un molino de cuchillas y recogido en un envase completamente seco de acero y tapado para evitar demasiada perdida de polvo al ambiente .

Una vez terminada la molienda tanto en hojas como corteza , se procedió al tamizaje hasta obtener polvo semi – fino que pase completamente la malla # 32 de abertura nominal según Serie Tyler 495  $\mu\text{m}$  , el Rop-Tap es encendido por un tiempo de 15-20 min.

Una vez termina la molienda fueron pesados y vaciados a un envase de vidrio completamente sellado para evitar que coja la humedad del ambiente .

W hojas secas molidas = 480 gr.  
malla # 32

W corteza seca molida = 620 gr.  
malla # 32





**Figura N° 18. Droga Vegetal seca y molida (*Annona muricata*)**  
**Fuente :** Elaboración Propia.

#### **4.3.- Análisis Físico – Químicos de la muestra .**

Las pruebas realizadas a la muestra ( hojas , corteza de guanábana ) , según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos –1988 , MGA 0301 –Pruebas para drogas vegetales fueron :

- % de Humedad .
- Cenizas Totales.
- Cenizas insolubles en Ácido .

**a.- % de Humedad .**

Aprovechando los datos obtenidos de secado y teniendo los valores iniciales de hojas y corteza frescos se procedió a calcular el % de humedad en cada una de ellos con la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_{\text{muestra vegetal fresca}} - W_{\text{muestra vegetal seca}}}{W_{\text{muestra vegetal fresca}}} \times 100$$

Aplicando esta formula y con los datos anterior expuestos se obtuvo la siguiente tabla:

<b>Muestra vegetal</b>	<b>% Humedad</b>
Hojas de Guanábana	73
Corteza de Guanábana	50

**b.- Cenizas Totales .**

El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la muestra vegetal .

### Procedimiento .

1. Pesa 10 gr. de muestra vegetal seca y molida , ponerlo en un crisol de porcelana previamente pesado.
2. Llevar a la mufla a una temperatura constante de 600 °C por 24 horas . Sacar y llevar a un desecador hasta que se enfríe .
3. Pesar y descontar el peso del crisol .

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_{\text{residuo calcinado}}}{W_{\text{de muestra}}} \times 100$$

En el siguiente cuadro se presenta los resultados obtenidos :

Muestra vegetal analizada	W de muestra (gr.)	W crisol (gr.)	W residuo calcinado(gr.)	% Cenizas Totales
Hojas	10	23.6	1.9	19
Corteza	10	22.8	1.2	12

Esta prueba se hace por duplicado (anexo A-5 ) para poder tener material para las siguientes pruebas .

### **c.- Cenizas insolubles en Ácido .**

Las cenizas insolubles en ácido están, constituidas por el residuo obtenido después de hervir el residuo calcinado en la determinación de cenizas totales con ácido clorhídrico diluido .

Este procedimiento permite determinar el contenido de sílica , principalmente la arena y la tierra silíceas presente en la muestra vegetal .

#### **Procedimiento .**

1. Al residuo obtenido en la prueba de Cenizas Totales adicionar 25 ml de solución de Ácido clorhídrico 3 N .
2. Calentar a ebullición por 5 minutos , filtrar sobre papel de filtro lento previamente pesado y lavar el residuo con agua destilada caliente .
3. Secar a 80 °C .
4. Pesar y descontar el peso del papel filtro .

$$\% \text{ Cenizas insolubles en ácido} = \frac{W_{\text{de residuo}}}{W_{\text{muestra de residuo calcinado}}} \times 100$$

En el siguiente cuadro se presenta los resultados obtenidos :

Esta prueba se hace por duplicado (anexo A-5).

Muestra vegetal analizada	W muestra residuo calcinado (gr.)	W papel filtro (gr.)	W residuo (gr.)	% Cenizas insolubles en ácido.
Hojas	1	1.5	0.4	40
Corteza	1	1.5	0.166	16.6

#### 4.4.- Métodos de extracción de alcaloides .

Según la metodología descrita se procedió a realizar los tres métodos de extracción :

1. Extracción con solventes no miscibles con el agua .
2. Extracción con solventes miscibles con el agua .
3. Extracción con agua acidulada .

A continuación se presenta :

##### 1. Extracción con solventes no miscibles con el agua .

Muestra vegetal seca y molida : Hojas de Guanábana (*Anona muricata* )  
Corteza de Guanábana (*Anona muricata* )

Peso de muestra vegetal : 50 gr.  
seca y molida

El procedimiento fue realizado por separado tanto para Hojas como Corteza, de manera que se puedan comparar resultados .

En envases de vidrio se humedeció la muestra con 30 ml de solución de Carbonato de Sodio al 5% se agitó con una bageta hasta obtener una pasta , se dejó 30 minutos y se llevo a estufa a 40 °C por 4 horas aprox . Luego se procedió a la extracción .

Solvente de extracción : Diclorometano

Volumen de solvente : 250 ml .

Temperatura de extracción : 35 - 40°C

Tiempo de extracción : 120 horas .

Equipo de extracción : SOXHLET

Una vez obtenido el extracto vegetal se filtró a vacío a – 600 mbar para evitar la evaporación del solvente y eliminar trazas de impureza, luego se concentró :

Temperatura de concentración : T. Ambiente

Equipo de concentración : Rotavapor

Presión : - 600 mbar .

Presentamos el % de extracto vegetal seco obtenido por el método SOXHLET .

Para los cálculos del cuadro presentado a continuación , se trató de concentrar el extracto vegetal lo mayor posible en el Rotavapor y se llevó el extracto vegetal concentrado a una estufa a 30 °C para terminar de eliminar completamente el solvente de manera de obtener el extracto vegetal seco .

<b>Muestra vegetal Seco y molido</b>	<b>W (gr.) de muestra</b>	<b>W (gr.) extracto vegetal seco .</b>	<b>% extracto vegetal extraído .</b>
Hojas	50	2.97	5.94
Corteza	50	0.92	1.84

En el presente método se trabajó con ¼ del extracto vegetal como se describió en (3.1-b -1), a este se le agregó 20 ml de HCl al 5% en una pera de bromo de 100 ml , agitación lenta , reposo hasta separación total de las dos fases .

V HCl recuperado : 18 ml

Se agregó gotas de NH<sub>4</sub> (OH) hasta Ph =9,5 con el papel de indicador Panpeha (0-14);

Se observa :

<b>Muestra vegetal Seco y molido</b>	<b>Aspecto en Ph 9,5</b>
Hojas	Solución amarillenta
Corteza	Solución rojiza .

Se extrajó Hojas y corteza respectivamente con 50 ml de Cloroformo en una pera de bromo de 100 ml .

## 2. Extracción con solventes miscibles con el agua .

Muestra vegetal seca y molida : Hojas de Guanábana (*Anona muricata* )  
Corteza de Guanábana (*Anona muricata* )

Peso de muestra vegetal : 50 gr.  
seca y molida

El procedimiento se realizó por separado tanto para Hojas como Corteza, de manera que se puedan comparar resultados .

La muestra vegetal seca y molida se colocó en cartuchos de filtro lento y luego en el equipo SOXHLET y se procedió a la extracción .

Solvente de extracción : Metanol .

Volumen de solvente : 250 ml .

Temperatura de extracción : 60-65°C

Tiempo de extracción : 120 horas .

Equipo de extracción : SOXHLET

Una vez obtenido el extracto vegetal se procedió a la filtración a vacío a - 600 mbar para evitar la evaporación del solvente y eliminar trazas de impureza, luego se concentró :

Temperatura de concentración : 40 °C

Equipo de concentración : Rotavapor

Presión : - 600 mbar .



Como en este método se requiere trabajar con el extracto vegetal seco; en el Rotavapor se trató de concentrar lo mayor posible y se llevó el extracto vegetal concentrado a una estufa a 30 °C para terminar de eliminar completamente el solvente de manera de obtener el extracto vegetal seco .

Presentamos el % de extracto vegetal extraído obtenido por el método SOXHLET.

<b>Muestra vegetal Seco y molido</b>	<b>W (gr.) de muestra</b>	<b>W (gr.) extracto vegetal seco .</b>	<b>% extracto vegetal extraído .</b>
Hojas	50	15.3	30.6
Corteza	50	13.4	26.8

En este método se trabajó con el extracto vegetal seco como se describió en (3.1-b -2), a este se le agregó 20 ml de HCl al 5%, agitación lenta , se filtró para eliminar trazas oleosas .

HCl recuperado : 16 ml

Se agregó gotas de NH<sub>4</sub> (OH) hasta Ph =9,5 con el papel de indicador Panpeha (0-14);

Se observa :

<b>Muestra vegetal Seco y molido</b>	<b>Aspecto en Ph 9,5</b>
Hojas	Solución amarillenta
Corteza	Solución ligeramente rojiza

Se extrajo Hojas y corteza respectivamente con 50 ml de Cloroformo en una pera de bromo de 100 ml .

### 3.- Extracción con Agua acidulada .

Muestra vegetal seca y molida : Hojas de Guanábana (*Anona muricata* )  
Corteza de Guanábana (*Anona muricata* )

Peso de muestra vegetal : 50 gr.  
seca y molida

El procedimiento se realizó por separado tanto para Hojas como Corteza, de manera que se puedan comparar resultados .

La muestra vegetal seca y molida se maceró en el solvente de extracción y luego a ebullición , se mantuvo cerrado el recipiente de trabajo para evitar perdida y teniendo en cuenta que la droga vegetal tiende a hincharse a medida que aumenta la temperatura .

Solvente de extracción : Solución de ácido clorhídrico al 1% .

Volumen de solvente : 250 ml .

Temperatura de extracción : 90-100 °C

Tiempo de extracción : 1 hora .

<b>Muestra vegetal Seco y molido</b>	<b>V extracto vegetal (ml)</b>
Hojas	175
Corteza	100

Se filtró en un filtro lento , el extracto vegetal obtenido se alcalinizó con gotas de  $\text{NH}_4(\text{OH})$  hasta un Ph 9.5 , luego se extrajo con 50 ml de Cloroformo en una pera de bromo de 100 ml .

#### **4.5.-Análisis químico cualitativo de alcaloides .**

Cada extracto bruto alcaloidal (clorofórmico) obtenido por los tres diferentes métodos de extracción, se concentraron en el Rotavapor y el extracto vegetal concentrado fue vaciado a tubos de ensayo y luego llevado a la estufa a 30 °C para la eliminación total del solvente (cloroformo) .

El extracto bruto alcaloidal seco ( base libre de alcaloides) fue tratado con 10 ml de una solución de Ácido clorhídrico al 1 % , obteniendo de esta manera clorhidratos alcaloidales , a esta solución de clorhidratos alcaloidales se le realizó el análisis cualitativo para la detección de alcaloides.

En el siguiente cuadro presentamos los resultado obtenidos del análisis cualitativo para la detección de alcaloides:

Método de extracción	Muestra vegetal Seco y molido	Reactivos de precipitación		
		Dragendorff	Mayer	Wagner
Extracción con solventes no miscibles con el agua	Hojas	(+)	(+)	(+)
	Corteza	(+)	(+)	(+)
Extracción con solventes miscibles con el agua	Hojas	(+++)	(+++)	(+++)
	Corteza	(++)	(++)	(++)
Extracción con agua acidulada	Hojas	(+)	(+)	(+)
	Corteza	(+)	(+)	(+)

**TABLA N° 10. Resultados del análisis cualitativo para la detección de alcaloides.**

Dragendorff : precipitado naranja .

Mayer : precipitado blanco.

Wagner : precipitado marrón .

De lo expuesto se selecciona el Método de extracción con solventes miscibles con el agua para su continuación en los siguientes análisis .

También es interés de esta investigación conocer los otros constituyentes químicos contenidos en las drogas vegetales de la Guanábana (*Anona muricata*) .

En el siguiente cuadro presentamos los resultados obtenidos de las marchas fitoquímicas realizadas .

Pruebas	Extracto vegetal					
	Diclorometanico		Metanólico		Acuoso	
	Hojas	Corteza	Hojas	Corteza	Hojas	Corteza
Espuma	----	----	----	----	(-)	(-)
Cloruro Férrico	----	----	(+++)	(+++)	(++)	(++)
Shinoda	----	----	(+++)	(+++)	(-)	(-)
Borntrager	(-)	(-)	(-)	(+)	----	----

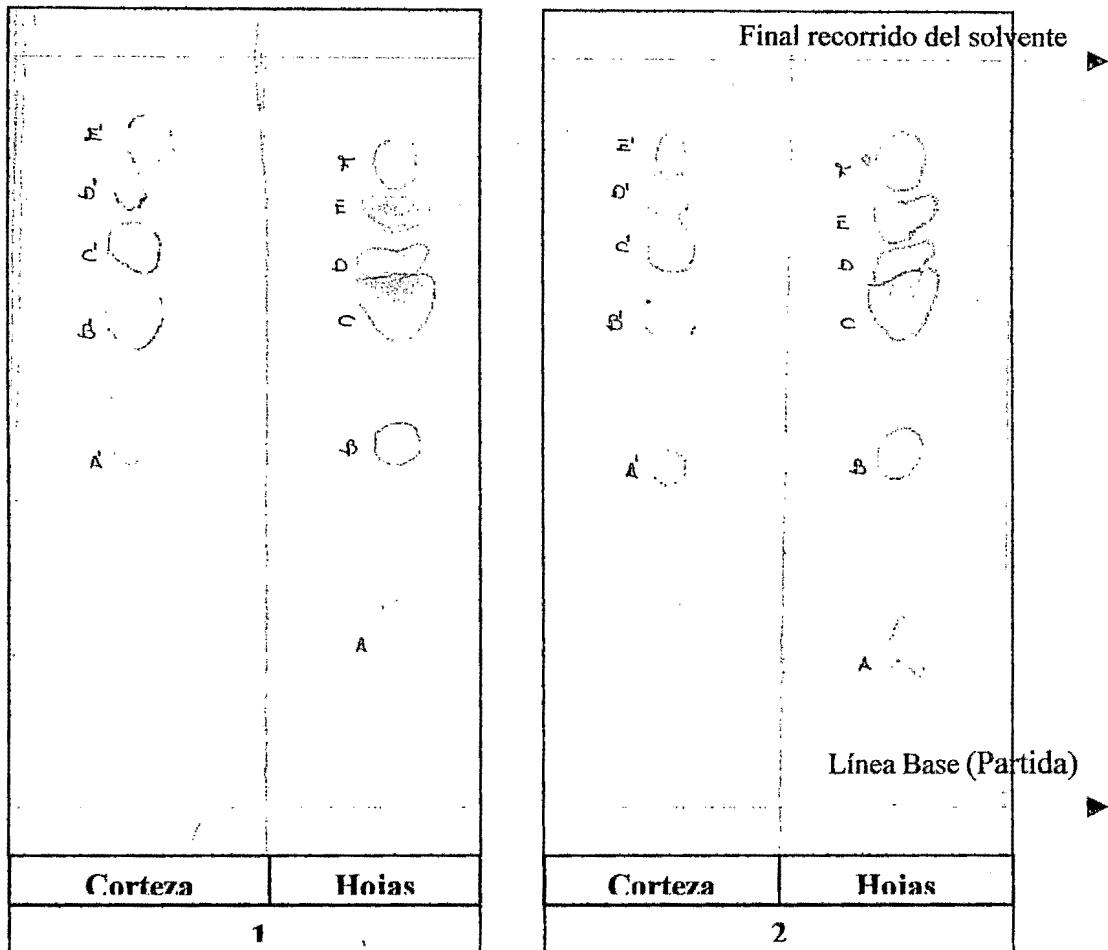
**TABLA N° 11. Resultados de la Marcha Fitoquímica de Hojas ,Corteza de Guanábana.**

A continuación se presentan los resultados del análisis de Cromatografía de Capa Fina realizado al extracto bruto alcaloidal del Método de extracción con solventes miscibles con el agua .

Placa cromatograficas	: Cromatofolios de Sílica Gel 60 -MERCK
Espesor de placa	: 0.2 mm
Dimensiones de placa	: (5 x 10 )cm
Activación de Placa	: 100 °C x 1 hora
Volumen de muestra aplicada	: 15 µml
Eluyente	: Cloroformo –Metanol –NH <sub>3</sub> (gotas) (80:20 )
Volumen de Eluyente	: 30 ml
Dimensiones de la Cuba	: (15 x 10x 5) cm
Revelado	: Luz UV (365 nm). Reactivo de Dragendorff
Secado	: Estufa – 40 °C x 15 minutos .

En el revelado de las placas ante la luz UV a 365 nm. , muestra fluorescencia , presentando marcadamente 5 manchas en forma vertical del arrastre para la corteza y 6 manchas para las hojas de Guanábana , con la aspersion del reactivo de Dragendorff se puede visualizar mejor las manchas ya que obtienen una coloración rojiza .

La prueba fue realizado por duplicado obteniéndose el mismo numero de manchas en el segundo cromatógrama , se procedió a determinar los Rf para cada uno de los cromatogramas , en la siguiente tabla presentamos los resultados obtenidos .



**Figura N° 19. Revelado de la Cromatografía de Capa Fina de Hojas y Corteza de Guanábana (*Anona muricata*).**

Extracto Alcaloidal analizado	Manchas Reveladas	Da (cm)		Rf	
		Cromatograma N°1	Cromatograma N°2	Cromatograma N°1	Cromatograma N°2
HOJAS	A	1.1	1.6	0.16	0.23
	B	3.1	3.1	0.44	0.44
	C	5.1	5.1	0.73	0.73
	D	5.6	5.6	0.8	0.8
	E	6.1	6	0.87	0.86
	F	6.6	6.6	0.94	0.94
CORTEZA	A'	3.1	3.4	0.44	0.49
	B'	4.9	4.9	0.7	0.7
	C'	5.2	5.1	0.74	0.73
	D'	6.3	6.2	0.9	0.89
	E'	6.8	6.5	0.97	0.93

Dz =7cm. Constante en ambas cromatografías .

TABLA N°12 . Valores de Rf obtenidos en la prueba de Cromatografía .

#### 4.6.-Análisis químico cuantitativo de alcaloides .

La cuantificación de los alcaloides totales solo se realizó en el extracto bruto alcaloidal seleccionado según los análisis cualitativos ya descritos , debido a que la cantidad de los alcaloides en los métodos no seleccionados es muy mínimo .

El extracto bruto alcaloidal ( clorofórmico) del método de extracción con solventes miscibles con el agua ( Metanol) , fue secado en estufa a 30 ° C .



Para la cuantificación se usó el Método de Titulación Ácido – base en medio acuoso debido a la facilidad del método y la fácil adquisición de los reactivos usados .

V Cloroformo usado : 5 ml  
 Titulante : Hidroxido de Sodio 0.01 N.  
 Factor de correccion : 0.999  
 Valorante : Acido clorhídrico 0.01 N.  
 Factor de correccion : 0.999  
 Volumen de valorante : 5 ml  
 Indicador : Rojo de Metilo .  
 Equipo : Bureta graduada de 25 ml .

En la siguiente tabla se presentan los resultados del presente análisis :

	<b>Muestra vegetal seca y molido de la Guanábana</b>	
	<b>Hojas</b>	<b>Corteza</b>
Densidad del extracto bruto alcaloidal (gr./ml)	1.7	1.7
Volumen gastado de Na(OH) (ml)	2.3	4.1
<b>% Alcaloides Totales</b>	<b>0.394</b>	<b>0.131</b>

**TABLA N°13. Resultados de la Cuantificación de Alcaloides de Hojas y Corteza de Guanábana (*Anona muricata*).**

Se realizó esta prueba de cuantificación por duplicado , obteniéndose volúmenes parecidos de Hidróxido de sodio gastado y de la densidad del extracto bruto alcaloidal .

#### **4.7.-Análisis microbiológico del extracto alcaloidal .**

Para este análisis se seleccionó el extracto bruto alcaloidal de **Hojas de Guanábana (*Anona muricata*)** , por contener tanto cualitativa como cuantitativamente mayor cantidad de alcaloides , pero también presentaremos un análisis con el extracto bruto alcaloidal de Corteza de Guanábana (*Anona muricata*).

El microorganismo usado es el *Enterococcus Faecalis* . Se debe recalcar que todas las pruebas microbiológicas deben realizarse en extrema esterilidad de los instrumentos a usar , así como el manipuleo de estos .

El extracto bruto alcaloidal (clorofórmico) de Hojas de Guanábana fue transformado a extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal según lo que describe la metodología presentada .

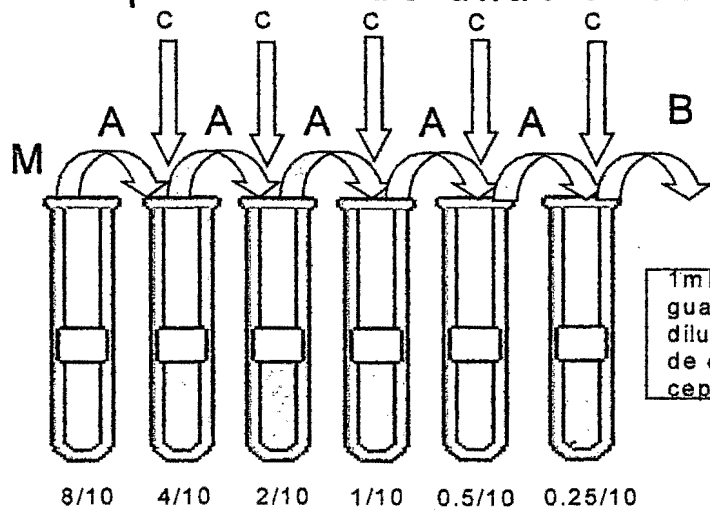
Este extracto acuoso fue diluido haciendo uso de pipetas esterilizadas de 2 ml , el transporte de estos se realizó en presencia de un mechero encendido para evitar

contaminación alguna . Se siguieron todos los pasos descritos en la metodología presentada .

A continuación se presentan los pasos realizados en el análisis microbiológico y también los resultados obtenidos en dicho análisis .

# CMI

## PASO 1 Preparación de diluciones



M = 8 ml extracto (hoja de Guanábana) + 2 ml H<sub>2</sub>O  
 A = 5 ml de la solución anterior  
 B = 5 ml se desecha  
 C = 5 ml H<sub>2</sub>O destilada

Repetir el paso tres CON INTERVALO DE 24 HR durante dos días mas para formar las curvas

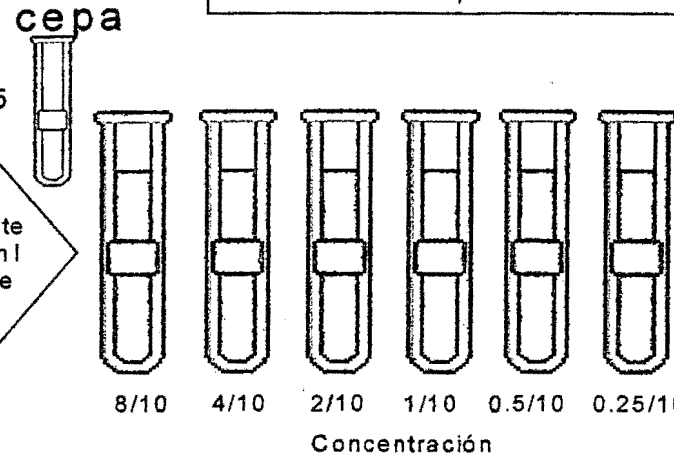
1 ml de aceite (hoja de guanábana) respectivamente diluido en cada tubo con 9 ml de caldo nutritivo + 0.1 ml de cepa

## PASO 3

24 hr mas se leen las placas.

## PASO 2

se procede a plaquear solo el control Tiempo = 0



24 Hr se plaquean todos los tubos y se lee la placa control

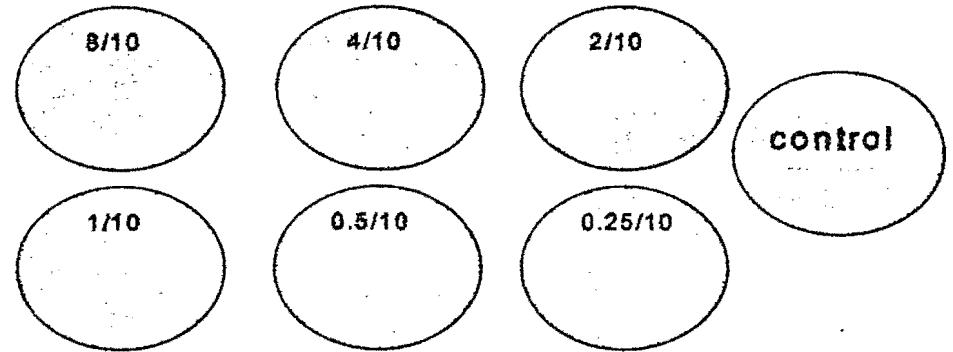


Figura N° 20. Pasos del análisis Microbiológico .

Fuente: Laboratorio de Microbiología ,CET-UNAC.

$\frac{X_{ml} Extr}{ml Sol}$	Tiempo en horas			
	0	24	48	96
<b>Control</b>	$2,48.10^5$	$168.10^5$	$164.10^5$	$151.10^5$
$\frac{0.25}{10}$	$2,48.10^5$	$125.10^5$	$41.10^5$	$52.10^5$
$\frac{0.5}{10}$	$2,48.10^5$	$87.10^5$	$54.10^5$	$45.10^5$
$\frac{1}{10}$	$2,48.10^5$	$82.10^5$	$47.10^5$	$44.10^5$
$\frac{2}{10}$	$2,48.10^5$	$72.10^5$	$45.10^5$	$34.10^5$
$\frac{4}{10}$	$2,48.10^5$	$34.10^5$	$31.10^5$	$29.10^5$
$\frac{8}{10}$	$2,48.10^5$	$13.10^5$	$20.10^5$	$15.10^5$

**TABLA N°14. Conteo del crecimiento de *Enterococcus* en acción del extracto alcaloidal de Hojas de Guanábana (*Anona muricata*).**

$$C = 151.10^5$$

$$I = 2.48.10^5$$

$$F = 15.10^5$$

$$\% = \frac{(C - F)}{(C - I)} \times 100 = \frac{(151.10^5 - 15.10^5)}{(151.10^5 - 2.48.10^5)} \times 100 = 91.57\%$$

Ahora para graficar pasamos los conteos a **log(UFC)/ml** como muestra la siguiente tabla:

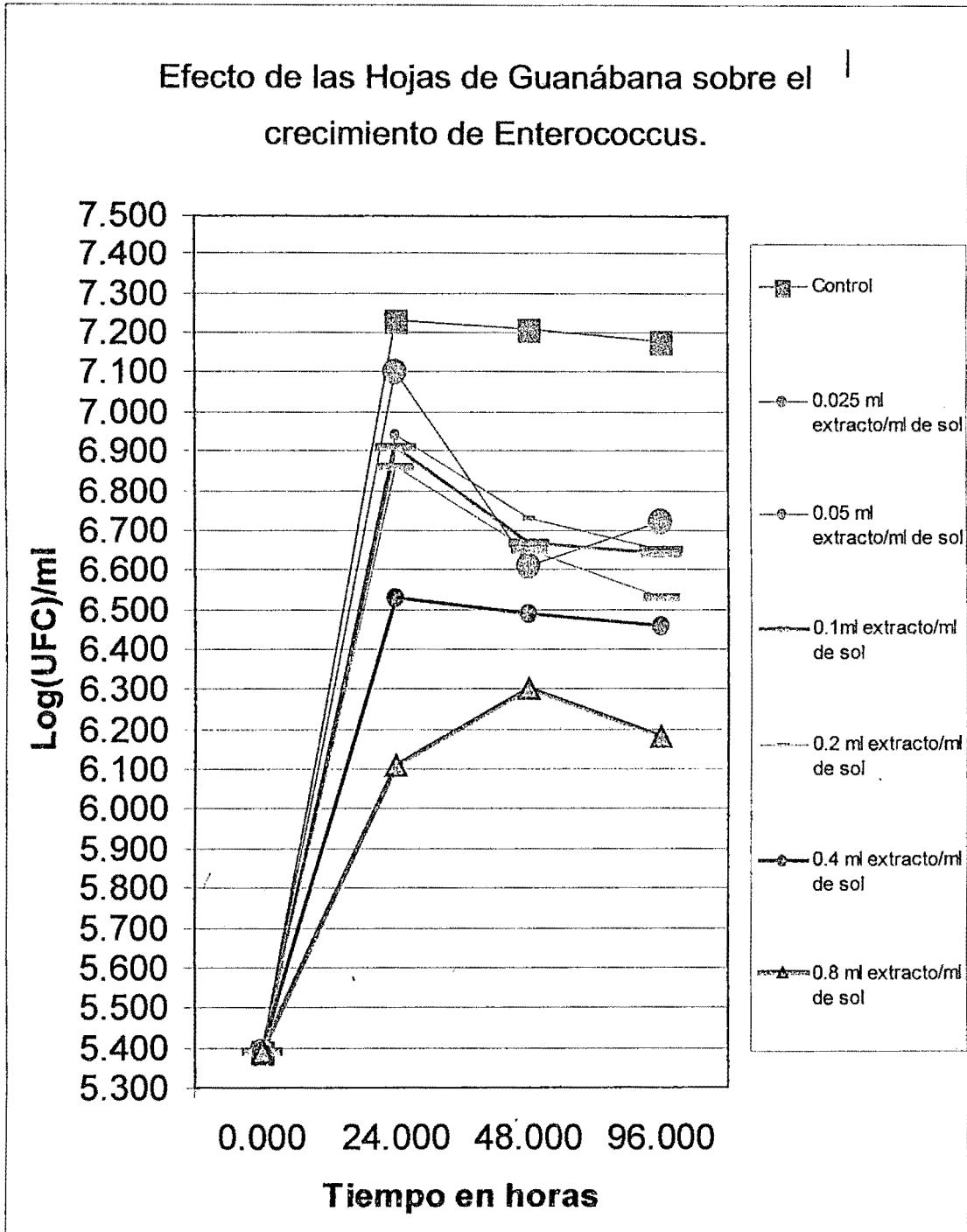
		<b>Concentración (ml de extracto / ml de solución)</b>						
<b>Horas</b>	<b>control</b>	<b>0.025</b>	<b>0.050</b>	<b>0.100</b>	<b>0.200</b>	<b>0.400</b>	<b>0.800</b>	
<b>0</b>	5.390	5.390	5.390	5.390	5.390	5.390	5.390	<b>log(UFC)/ml</b>
<b>24</b>	7.230	7.100	6.940	6.910	6.860	6.530	6.110	
<b>48</b>	7.210	6.610	6.730	6.670	6.650	6.490	6.300	
<b>96</b>	7.180	6.720	6.650	6.640	6.530	6.460	6.180	

Con el mismo procedimiento usado para el análisis microbiológico del extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal de Hojas de Guanábana se realizó también un análisis al extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal de Corteza de Guanábana con un microorganismo diferente llamado Porfiromonas Gingivalis.

Este microorganismo es muy parecido a los Enterococcus por producir infecciones en pacientes ambulatorios u hospital pero su acción microbiana reside en el ambiente bucal, son microorganismos periodontopáticos .

A continuación se presentan resultados obtenidos en este análisis .

Grafico N°1.

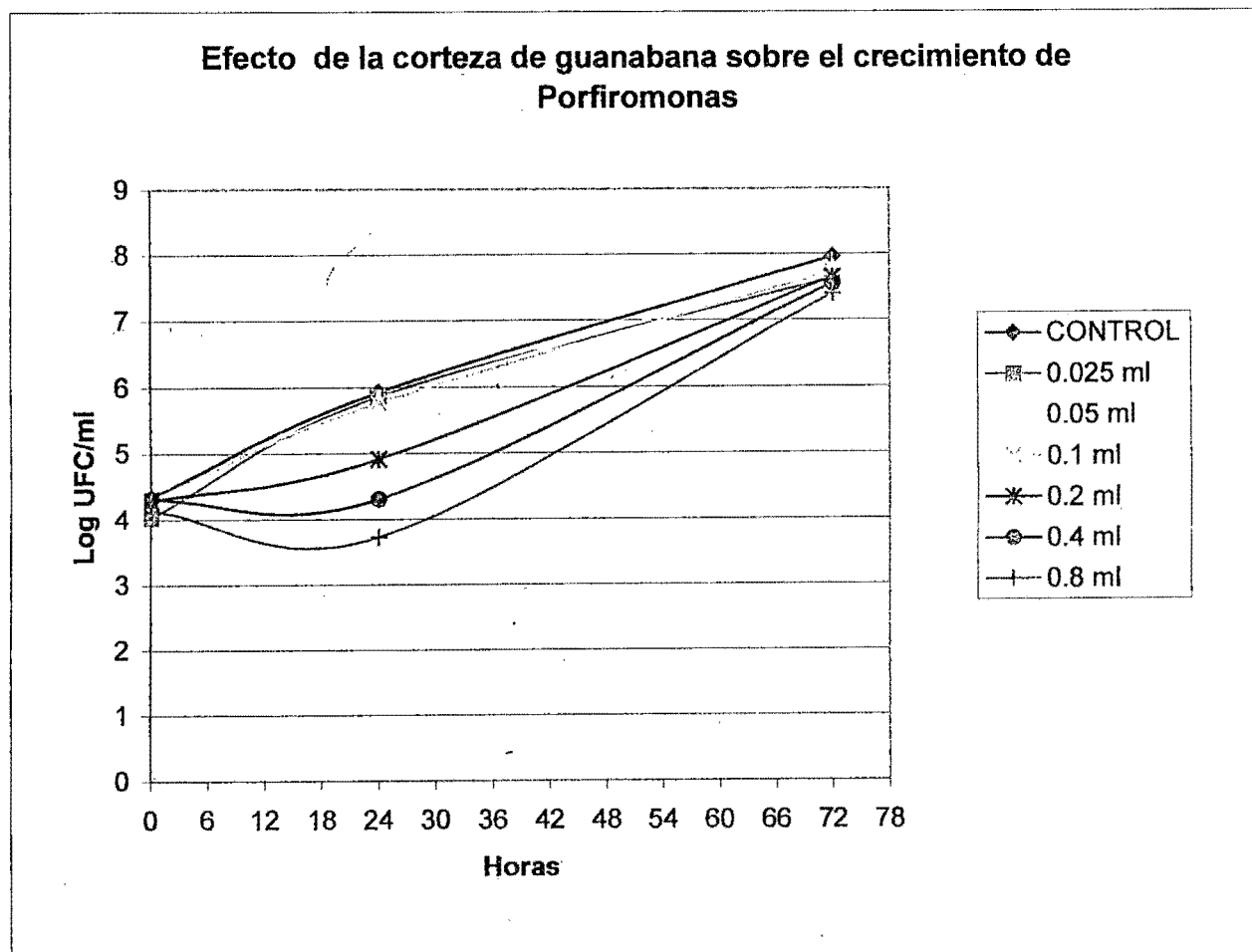


**EXTRACTO ACUOSO DE CLORHIDRATO ALCALOIDAL DE  
CORTEZA**

HORAS	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA / ml (UFC/ml)						
	CONTROL	0.025 ml	0.05 ml	0.1 ml	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml
0	4,34	4,03	4,26	4,32	4,29	4,31	4,14
24	5,92	5,86	5,81	5,76	4,91	4,3	3,73
72	7,96	7,63	7,79	7,72	7,65	7,55	7,4

**TABLA N°15. Conteo del crecimiento de Porfiromonas en acción del extracto alcaloidal de Corteza de Guanábana (*Anona muricata*).**

**Grafico N°2.**





## V.-ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .

Los resultados obtenidos en la presente investigación marcan su importancia desde la recolección de la planta analizada ya que se determinó cualitativamente que la etapa vegetativa en la que se presenta mayor cantidad de alcaloides es antes de la primera floración de una planta joven (aprox. 1 ½ de edad ) ; las primeras operaciones de preparación de la muestra , siendo la temperatura de secado apropiado para evitar pérdidas de alguno de los componentes químicos analizados y el tamaño de partícula de la muestra para tener mayor área de contacto en la extracción sólido-líquido ; de variar alguno de estos procedimientos usados se obtendrán resultados diferentes , es por ello que se trata de mantener constantes en lo mayor posible algunos parámetros definidos en la investigación .

En el proceso de extracción se mantuvo constante algunos parámetros :

- Muestra de droga vegetal seca y molida.
- Tiempo de extracción .
- Volumen de solvente .
- Proceso de extracción (Extracción continua ) .

Los resultados obtenidos en los tres diferentes métodos de extracción y en los análisis cualitativos de identificación muestran :

<b>Muestra Vegetal seca y molido</b>	<b>Método de Extracción</b>	<b>% de extracto vegetal extraído</b>	<b>Identificación de los alcaloides con reactivos de identificación .</b>
<b>Hojas</b>	Extracción con Diclorometano	5.94	(+)
	Extracción con Metanol	30.6	(+++)
	Extracción con Agua acidulada	----	(+)
<b>Corteza</b>	Extracción con Diclorometano	1.84	(+)
	Extracción con Metanol	26.8	(++)
	Extracción con Agua acidulada	----	(+)

En la extracción de alcaloides con solventes miscibles con el agua (Metanol) , se obtiene mayor cantidad de extracto vegetal , esto se debe a que este tipo de solvente extrae de la droga vegetal los alcaloides tanto en la forma libre como en la forma de sus sales , así como también otras sustancias de naturaleza básica , ácida y neutra, es por esta razón que tanto en las Hojas como Corteza de guanábana se obtienen mayores valores de % de extracto .

Además de obtener mayores cantidades de extracto vegetal seco lo cual nos asegura un completo agotamiento de la droga vegetal , en este proceso se obvia el pre-tratamiento de la droga vegetal con álcali , de esta manera se evitan posibles alteraciones en el proceso de extracción .

El % de extracto vegetal seco no define una mayor extracción de alcaloides ya que todavía este necesita ser purificado para poder recién obtener datos específicos de la presencia de los alcaloides .

Con los extractos brutos alcaloidales ( clorofórmicos ) previamente transformados para los análisis cualitativos , se realiza los ensayos con los tres reactivos de identificación y para obtener datos certeros la prueba debe dar positivo con los tres reactivos esto cerciora independiente de la cantidad hallada la presencia o no de los alcaloides .

En la presente investigación el extracto bruto alcaloidal obtenido de la extracción de alcaloides a partir de hojas con solventes miscibles con el agua mostró mayor cantidad de precipitado con los tres reactivos lo cual permitió que seleccionemos este método de extracción como el mas aconsejable para la obtención de alcaloides a partir de la *Anona muricata* .

Con el mismo método de extracción las Cortezas también muestran la presencia de alcaloides .

Una vez definido el método de extracción se procedió a los análisis cuantitativos , los cuales cuantifican los resultados anteriormente presentados .

En la cuantificación de alcaloides por el método volumétrico :

<b>Muestra vegetal seco y molido de la Guanábana</b>		
	<b>Hojas</b>	<b>Corteza</b>
<b>% Alcaloides Totales</b>	0.394	0.131

Estos resultados confirman que las pruebas cualitativas no solo predicen la presencia sino también la cantidad de alcaloide en la droga vegetal .

En la cromatografía de capa fina se observa que el revelado de las hojas de Guanábana presenta 6 manchas coloreadas mientras que el revelado de las cortezas de guanábana presentan 5 manchas coloreadas , el diámetro de las manchas de las hojas es mayor al de la corteza lo cual también nos predice que en las hojas hay mayor cantidad de alcaloides que en las cortezas .

De contar con algún alcaloide estándar de las Hojas de Guanábana se puede comparar la forma y área de las manchas así como también el  $R_f$  , caracterizando de esta manera los alcaloides presentes en nuestro extracto bruto alcaloidal .

Otra manera de caracterizarlos sería mediante un espectro IR y espectro de masa ,estos espectros caracterizan cualquier compuesto desconocido.

Como en la presente investigación no se cuenta con algún alcaloide estándar queda en incertidumbre la identificación estructural de cada alcaloide revelado en la cromatografía de capa fina , para mermar esta incertidumbre se presenta en el Anexo (3) los espectros IR de los Extractos Alcaloidales de Hojas y Corteza de Guanábana ,en estos espectros se registra la longitud de onda o frecuencias de los grupos funcionales presentes en los extractos analizados , la presencia de un grupos funcionales nitrogenados , anillos aromáticos pueden avalar instrumentalmente la presencia de alcaloides en los extractos analizados .

Estos datos serán indispensables para las investigaciones futuras de caracterización de los alcaloides que se aíslen de los extractos alcaloidales .

El extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal de las Hojas de guanábana fueron ensayadas microbiológicamente para poder conocer la acción que pueda tener frente a un microorganismo , en esta investigación *Enterococcus* ; los valores obtenidos en el conteo de bacterias *Enterococcus* en el tiempo, en las diferentes diluciones presentan una descendencia excepto en la concentración 0.25/10 que a un tiempo de 96 horas aumentó el conteo de bacteria, esto se puede deber a la mínima concentración del extracto que inhibe por un lapso necesitando una nueva dosificación de extracto para mantener la descendencia ,a si mismo en la concentración 8/10 se observa que a un tiempo de 48 horas el conteo de bacterias aumenta y a 96 horas disminuye mostrando inestabilidad de la bacteria ; no se obtuvo un CMI debido a que no se llega al 99.99 % , debido a esto se halla un % de eficiencia resultando este valor 91,57 lo cual indica que el extracto analizado a su máxima concentración inhibe el crecimiento de las bacterias con respecto al control en un 91,57% .

Si se quisiera dar aplicación en base a estos resultados se usarían concentraciones que presenten una inhibición estable , del grafico la concentración que presenta estabilidad e inhibición es 4/10 .

Los resultados obtenidos en el extracto bruto alcaloidal (clorofórmico) de las Corteza de guanábana no muestran la presencia de actividad microbiológica frente a las *Porfiromonas* , esto se debe también a la mínima cantidad de alcaloides presentes en esta droga vegetal .

En el anexo (4) se presenta algunos análisis microbiológicos realizados al extracto vegetal de Hojas de Guanábana.

## VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 6.1.-Conclusiones .

- Se determinó que la metodología para la extracción de alcaloides a partir de Hojas y Corteza de Guanábana (*Anona muricata*) es : La extracción con solventes miscibles con el agua , seleccionando el Metanol como el mejor solvente de extracción debido a su alta polaridad y bajo punto de ebullición .
- La etapa vegetativa para la recolección de la droga vegetal es de 1 ½ aprox. de edad de la planta de guanábana , antes de la primera floración .
- Las operaciones previas de acondicionamiento de la droga vegetal para obtener mayor rendimiento en la extracción de los alcaloides son el secado a 60 °C y la molienda hasta un polvo semi- fino .
- Las Hojas de Guanábana presentan 0.394 % de alcaloides totales siendo este mayor a la Corteza que presenta 0.131% de alcaloides totales .
- La Cromatografía de Capa Fina muestra que las Hojas de Guanábana contienen 6 alcaloides y las cortezas contienen 5 alcaloides .

- El extracto acuoso de Clorhidrato Alcaloidal de las Hojas de guanábana de guanábana presentan inhibición frente a los Enterococcus en una concentración de 0.4 .
- Las Cortezas de Guanábana no presentan actividad microbiológica frente a las Porfiromonas .

## **6.2.- Recomendaciones .**

- Continuar en lo futuro con los análisis instrumentales ( espectros UV, Masa, etc) que permitan obtener información estructural de cada uno de los alcaloides presentes en los extractos analizados en la investigación , ya que de esta manera se podría identificar el alcaloide activo que da lugar a la acción microbiológica encontrada en el extracto alcaloidal de las Hojas de Guanábana .
- Además de las pruebas de actividad microbiológica es necesario realizar estudios farmacológicos o screening , ( DL50 , DE50) ; pruebas realizadas en ratones , con lo cual se podrá determinar los diferentes efectos biológicos atribuidos a esta planta (antidepresivo , antiparasitarias, astringente, citotóxica, hipotenso, insecticida ,etc.), cuyos resultados serán probabilidades de la acción que pueda tener el extracto en un ser humano .
- Con los datos obtenidos de la extracción seleccionada en la investigación (extracción con solventes miscibles con el agua ) , se recomienda realizar ensayos a nivel piloto para hacer posible un estudio de Pre-factibilidad para la instalación de una planta de Extractos Vegetales en el Perú .



- Siendo los resultados de los análisis microbiológicos del Extracto Alcaloidal de las Hojas de Guanábana positivos a la acción antimicrobiana , se recomienda desarrollar productos fitoterapéuticos cuya formulación contenga el extracto mencionado en la dosis determinada tanto por análisis microbiológicos y biológicos.

## **VII.- FUENTES DE INFORMACION CONSULTADAS .**

- 1.- Alvarez Bautista,Jenny, ALCALOIDES Informe de Practicas , U.N.M.S.M. Esc. Prof. Química. 1996 -Perú .
- 2.- Arias Lescano Maria, ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES DEL TARHUI. Tesis- U.Agraria.-1985 Perú.
- 3.- Brack EGG Antonio , DICCIONARIO ENCICLOPÉDICO DE PLANTAS UTILES EN EL PERU. Cuzco – 1999 C.E. Bartolomé de las Casas .
- 4.- Corre Q. J.E. y H.Y. Bernal , ESPECIES VEGETALES PROMISORIAS DE LOS PAISES DEL CONVENIO ANDRES BELLO .Tomo I Convenio Andres Bello Bogota -Colombia
- 5.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicano, Quinta Edición –Mexico 1988.
- 6.- Glenn I. Jenkins, QUANTITATIVE PHARMACEUTICAL CHEMISTRY , Editorial Mc Graw Hill , Cuarta Edicion –1953.
- 7.- G.Gros Eduardo,B.Palomino Alicia , INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES. Secretaria General de los Estados Unidos -1985

- 8.- Huamani Hureta Rosa, MANUAL DE FARMACÓGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES TERAPÉUTICOS. U.N.M.S.M. 1985 –Perú.
- 9.- Huapaya Manco Maria, CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO BROMATOLÓGICO DE LA GUANÁBANA (*Anona muricata* Linn.) Fac. Farmacia y Bioquímica , U.N.M.S.M. 1995- Perú.
- 10.- Journal of Natural Products ,MURISOLIN : A new Cytotoxic MonoTetrahydrofuran  $\gamma$ -Lactone- from *Annona muricata*. Vol.31- 1990.  
 $\gamma$ -Lactone Funtionalized Antitumoral Acetogenins are the Most Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. Vol.60-61- 2001.  
 New Method for the Determination of the Absolute Stereochemistry in Anttumoral Acetogenins . Vol.54 – 1998
- 11.- Kuklinski Claudia, FARMACÓGNOSIA Ediciones Omega Barcelona -2000.
- 12.- Lock Ugaz Olga, MÉTODOS EN EL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES, Segunda Edición –Pontificia Universidad Católica del Perú – 1994.
- 13.- Lock Ugaz Olga , QUÍMICA Y FARMACOLOGÍA DE *Annona muricata* Linn.”Graviola”. Revista Química -Vol. 1,2 -2003 ,UPCP -Perú.

- 14.- Martínez Ángeles Grau, TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN SÍNTESIS ORGANICA Editorial Síntesis -1998 España .
- 15.- Manske R.H.F., THE ALKALOIDS (CHEMISTRY AND PHYSIOLOGY) Academic Press Inc. Publishers .Volumen 1 –1950.
- 16.- Mendo Rubio M. ,LECCIONES DE MICROBIOLOGÍA Y MEDIOS DE CULTIVO, Perú –1195.
- 17.- Meyer, TH ., THE ALKALOIDS OF ANNONA MURICATA -Thesis Ing. Ned. Indie 1941.
- 18.- Ministerio de Agricultura-Peru CULTIVO DEL GUANABANO, Boletín Técnico N° 15 Junio-1998.
- 19.- Nikolai Sharapin, FUNDAMENTOS DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS, Convenio Andrés Bello – Colombia 2000.

- 20.- Philipov, S. Machev, ESTUDIO QUÍMICO EN ESPECIES CUBANAS DEL GÉNERO *ANNONA* II. *ANNONA SCLEROPHYLLA* SAFFORD., Revista Cubana de Farmacia, Vol 30- 2002.
- 21.- Rincón de la Torre Miguel, ELABORACIÓN DE PULPA Y NÉCTAR DE GUANÁBANA, Tesis -- U.Agraria .1978 --Perú.
- 22.- Torpoco Carmen Virginia, CONSTITUYENTES QUÍMICOS (ALCALOIDES) DE LA "CHACRUNA" Tesis en Ciencias-Química . U.N.I. --1993.
- 23.- Valencia Ortiz Ciria, FUNDAMENTOS DE FITOQUÍMICA, México --1995.

#### **CITAS CIBERNÉTICAS .**

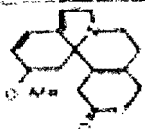


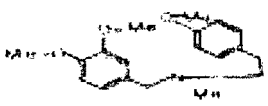
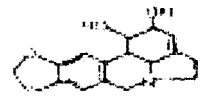
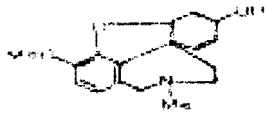

24.- <http://www.rain-tree.com>  
Junio-2005

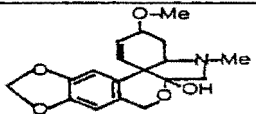
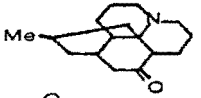
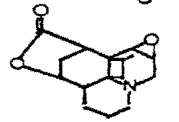
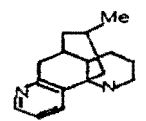
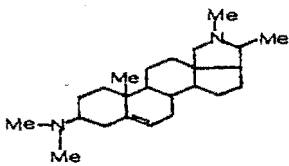
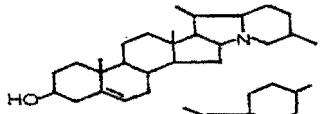
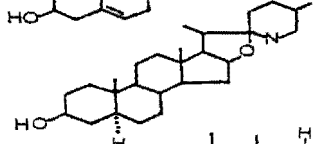
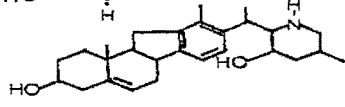
25.- <http://ctd.mdibl.org/voc.go?>  
Junio -2005

## APENDICE

- 1.- Figura N° 6 : Clases de Alcaloides y su estructura química .
- 2.- Tabla N° 6 : Disolventes orgánicos y algunas constantes físicas mas características .

Figura N° 6: Clases de Alcaloides y su estructura química .

Grupo	Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
Ergolíneos	meseroligina		<i>Lycopersicon</i>
	acetylsericina		
	sericina		<i>Solanum</i>
Amorfinos	bulbosina		<i>Lycopersicon</i>
	clorofina		<i>Lycopersicon</i>
	deltonamina		
	veratrina		<i>Veratrum</i>

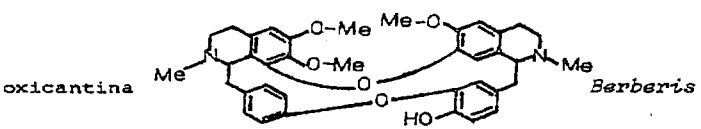
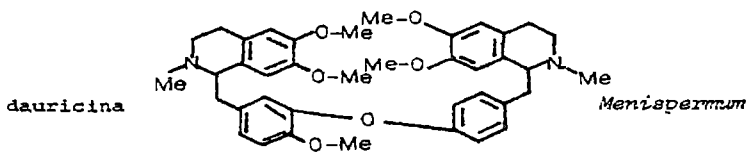
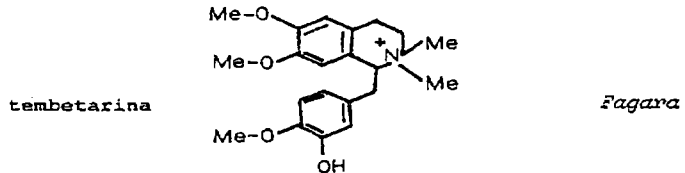
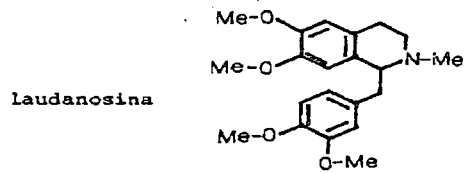
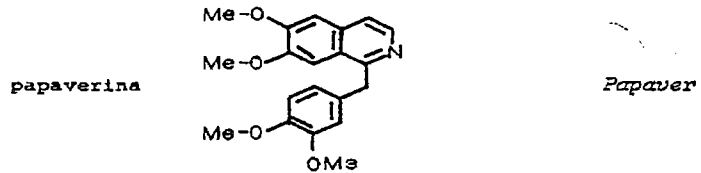
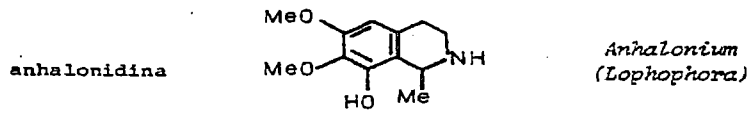
Grupo	Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
<i>Lycopodium</i>	taxetina		<i>Narcissus</i>
	licopodina		<i>Lycopodium</i>
	anotinina		
	licodina		
Esteroidales	conesina		<i>Lycopersicon</i>
	solanidina		<i>Solanum</i>
	tomatidina		<i>Lycopersicon</i>
	veratramina		<i>Veratrum</i>



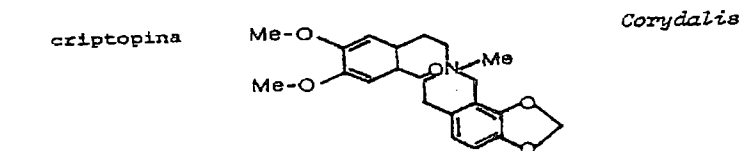
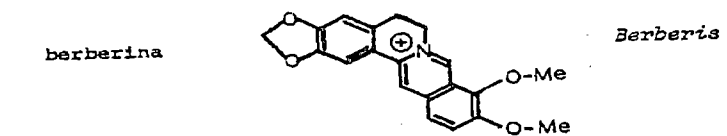
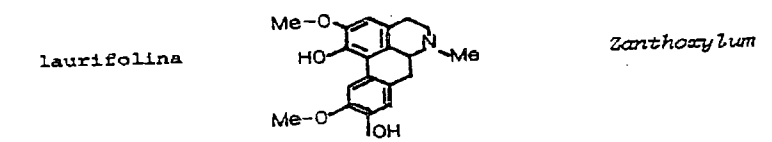
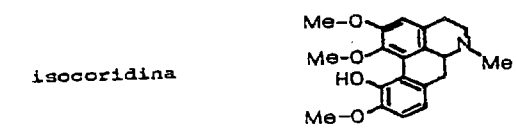
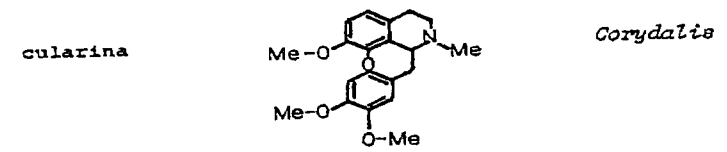
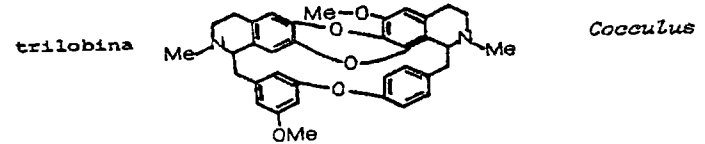


Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
--------	------------	---------------------------

corineina  $R_1 = R_2 = OH$  *Stetsonia*



Grupo	Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
-------	--------	------------	---------------------------



Grupo	Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
Quinolínicos	dictamnina		<i>Dictamnina</i>
Quinolínicos	galipina		<i>Galipea</i>
Quinolínicos	cinconina		<i>Cinchona</i>
Quinolínicos	quinina		<i>Cinchona</i>
Indólicos	ácido lisérgico		(hongo) <i>Claviceps purpurea</i>
Indólicos	harmina		<i>Peganum</i>
Indólicos	yohimbina		<i>Corynanthe</i>

Grupo	Nombre	Estructura	Fuente de Origen (Género)
Quinolínicos	dictamnina		<i>Dictamnina</i>
Quinolínicos	galipina		<i>Galipea</i>
Quinolínicos	cinconina		<i>Cinchona</i>
Quinolínicos	quinina		<i>Cinchona</i>
Indólicos	ácido lisérgico		(hongo) <i>Claviceps purpurea</i>
Indólicos	harmina		<i>Peganum</i>
Indólicos	yohimbina		<i>Corynanthe</i>

**Tabla N° 6****DISOLVENTES ORGÁNICOS Y ALGUNAS CONSTANTES FÍSICAS MAS  
CARACTERÍSTICAS .**

<b>Disolvente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>p.e. (°C)</b>	<b>ε</b>
Acetato de etilo	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	76.577	6.02
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	56	20.7
Ácido Acético	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	116.17	6.2
Ácido Fórmico	HCO <sub>2</sub> H	100.10	58
Agua	H <sub>2</sub> O	100	78.5
Benceno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	80	2.28
Ciclohexano	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	81	2.02
Clorobenceno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CL	132	5.62
Cloroformo	CHCL <sub>3</sub>	61	4.7
Diclorometano	CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	40	8.9
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	78	24.3
Eter dietílico	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	35	4.34
n- Hexano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	69	3.89
Metanol	CH <sub>2</sub> OH	65	32.6
Nitrobenceno	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	210.21	35
Piridina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	115	12.3
n- Propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	97	20.1
Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	111	2.38
Tetracloruro de Carbono	CCL <sub>4</sub>	76.77	2.23

p.e. (punto de ebullición)

ε ( constante dieléctrica)

## ANEXOS

- A.1.- Descripción del equipo SOXHLET .
- A.2.- Preparación de Reactivos de precipitación de alcaloides .
- A.3.- Espectros IR de los Extractos Alcaloidales de Hojas y Corteza de Guanábana.
- A.4.- Análisis microbiológicos al extracto vegetal de Hojas de Guanábana (*Anona muricata*) en Hexano .
- A.5.- Resultados de Análisis Físico-químicos a las hojas y cortezas de la Guanábana.

## **ANEXO 1**

### **Descripción del equipo SOXHLET.**

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continua siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además de muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos.

En este procedimiento la muestra sólida finamente pulverizada se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor soxhlet (ver figura).

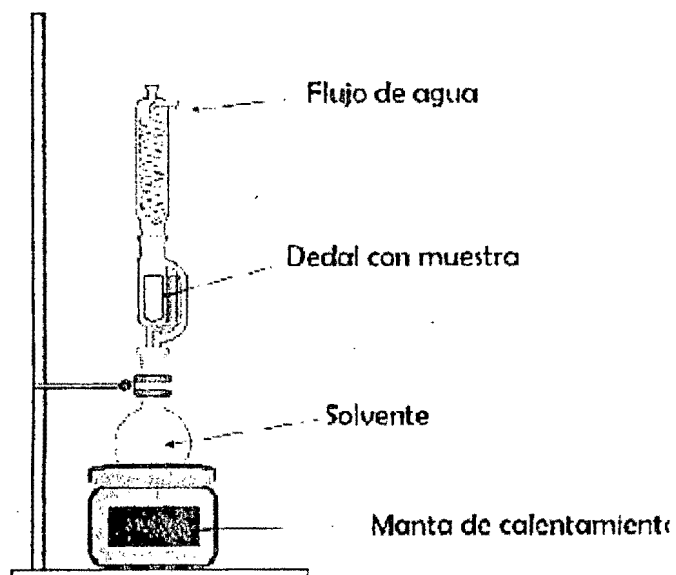
Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz , se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente.

La extracción con Soxhlet presenta las siguientes ventajas:

- La muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente.
- La extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los analitos.
- No es necesaria la filtración después de la extracción.
- La metodología empleada es muy simple .
- Es un método que no depende de la matriz.
- Se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet.

Por otra parte, las desventajas mas significativas de este método de extracción son:

- El tiempo requerido para la extracción normalmente está entre 6-24 horas.
- La cantidad de disolvente orgánico (50-300 ml)
- La descomposición térmica de los analitos termolábiles, ya que la temperatura del disolvente orgánico está próxima a su punto de ebullición.
- No es posible la agitación del sistema, la cual podría acelerar el proceso de extracción.
- Es necesaria una etapa final de evaporación del disolvente para la concentración de los analitos.
- Esta técnica no es fácilmente automatizable.



*Dispositivo de extracción soxhlet*

## **ANEXO 2**



## **Preparación de Reactivos de precipitación de alcaloides.**

**-Reactivo de Dragendorff modificado por Munier . ( Normas DININCRI-PERU)**

a.- Disolver 1.7 gr. de Nitrato básico de Bismuto y 20 gr. de Ácido Tartárico, en 80 ml de agua .

b.- Disolver 16 gr. de Yoduro de Potasio en 40 ml de agua .

Mezclar volúmenes iguales de las soluciones a y b = Solución de reserva .

Disolver 10 gr. de Ácido Tartárico en 50 ml de agua y agregar 5 ml de solución de reserva .

Usar gotas del reactivo y observar un precipitado rojo a naranja , lo cual indicará la presencia de alcaloides .

**-Reactivo de Mayer .**

a.- Disolver 1.36 gr. de Cloruro de mercurio II en 60 ml de agua .

b.- Disolver 5 gr. de Yoduro de Potasio en 10 ml de agua .

Mezclar a y b y diluir con agua hasta un volumen de 100 ml .

Usar gotas del reactivo y observar un precipitado blanco, lo cual indicará la presencia de alcaloides .

**-Reactivo de Wagner .**

Disolver 1 gr. de Yodo y 10 gr. de Yoduro de Potasio en 50 ml de agua .

Acidificar con 2 ml de ácido acético glacial , diluir con agua hasta un volumen de 100 ml .

Usar gotas del reactivo y observar un precipitado marrón , lo cual indicará la presencia de alcaloides .

## **ANEXO 3**

## **Espectros IR de los Extractos Alcaloidales de Hojas y Corteza de Guanábana.**

Los extractos alcaloidales clorofórmicos de Hojas y Corteza de Guanábana fueron analizados en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la U.N.M.S.M. , las especificaciones del equipo usado son las siguientes :

-Equipo empleado : Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier FT-IR.

-Marca : Nicolet

-Modelo : Impact 410

-Accesorio : Transmitancia Total ( Celda de KBr )

-Rango de lectura :  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$



Las muestras enviadas fueron identificadas de la siguiente manera :

Muestra M1 : Extracto Alcaloidal clorofórmico de Hojas de Guanábana .



Muestra M2 : Extracto Alcaloidal clorofórmico de Corteza de Guanábana .

El informe que a continuación se presenta solo interpreta a los grupos funcionales mas comunes ,con ayuda de tablas de correlación de numero de onda para los diferentes grupos funcionales se puede interpretar aun mas los picos de los espectros IR para las muestras analizadas .

PARA LA MUESTRA M1 .

<b>GRUPO FUNCIONAL</b>	<b>PICOS CARACTERÍSTICOS (cm<sup>-1</sup>)</b>
N-H(Aminas , amidas)	La muestra presenta picos a : 3376.82
C-N	La muestra presenta picos a : 1220.91 , 1272.82
 -NH-R ,  -NH <sub>2</sub>	La muestra presenta picos a : 1596.73 ,1658.62 , 1715.06 , 2854.51 , 2923,73

PARA LA MUESTRA M2 .

<b>GRUPO FUNCIONAL</b>	<b>PICOS CARACTERÍSTICOS (cm<sup>-1</sup>)</b>
N-H(Aminas , amidas)	La muestra presenta picos a : 3388.27
C-N	La muestra presenta picos a : 1240.72 , 1280.95
 -NH-R ,  -NH <sub>2</sub>	La muestra presenta picos a : 1653.13 , 1732.18 , 2855.21 , 2923.14

Se puede observar que los espectros de ambas muestras ( M1, M2) presentan picos muy similares de lo cual se deduce que en ambos extractos se encuentran los mismos grupos funcionales , esto puede deberse a que los alcaloides presentes en las Hojas sean los mismos que los de la Corteza de Guanábana .

Debido a los resultados obtenidos es recomendable en lo futuro aislar cada alcaloides y realizar nuevos ensayos de espectro IR y Masas .

**INFORME DE ENSAYO**  
**N° 015-06**

Atención : Srta. Verónica Rivas C.  
 Referencia USAQ : 013-01/02  
 Cotización : 016-2006/USAQ  
 Muestras : EXTRACTOS CLOROFORMICOS  
 Fecha de Recepción : 17/01/06  
 Fecha de Emisión : 20/01/06

**RESULTADO DE MUESTRA DE: EXTRACTOS CLOROFORMICOS**

**PARA LA MUESTRA 013-01 (M 1)**

GRUPO FUNCIONAL	PICOS CARACTERÍSTICOS ( $\text{cm}^{-1}$ )
-CH <sub>3</sub>	La muestra 013-01 presenta picos a: 2923.73, 2854.51, 1458.12 y 1363.01.
>CH <sub>2</sub>	La muestra presenta picos a: 2854.51, 1458.12 y 771.24.
>CH	La muestra presenta picos a: 2854.51 y 1363.01.
O-H	La muestra presenta picos a: 3376.82.
C-O	La muestra presenta picos a: 1116.78.
CO-OH Ácido Carboxílico	La muestra presenta picos a: 1715.06, 1458.12, 1363.01, 1272.82 y 1220.91.
AROMATICO	La muestra presenta picos a: 1658.62, 1596.73, 1116.78, 1029.52, 826.89 y 771.24.

Muestra proporcionada por el cliente

**PARA LA MUESTRA 013-02 (M 2)**

GRUPO FUNCIONAL	PICOS CARACTERÍSTICOS (cm <sup>-1</sup> )
-CH <sub>3</sub>	La muestra presenta picos a: 2923.14, 2855.21, 1458.82 Y 1374.79.
>CH <sub>2</sub>	La muestra presenta picos a: 2923.14, 2855.21, 1458.82 Y 757.90.
>CH	La muestra presenta picos a: 2855.21 y 1374.79.
O-H	La muestra presenta picos a: 3388.27
C-O	La muestra presenta picos a: 1130.07
CO-OH Ácido Carboxílico	La muestra presenta picos a: 1732.18, 1458.82, 1374.79, 1280.95 y 1240.72
AROMÁTICO	La muestra presenta picos a: 1653.13, 1592.77, 1130.07, 1039.54, 757.90 y 700.46

Muestra proporcionada por el cliente

**Método: USAQ-ME-10. Determinación de compuestos por FT-IR.**



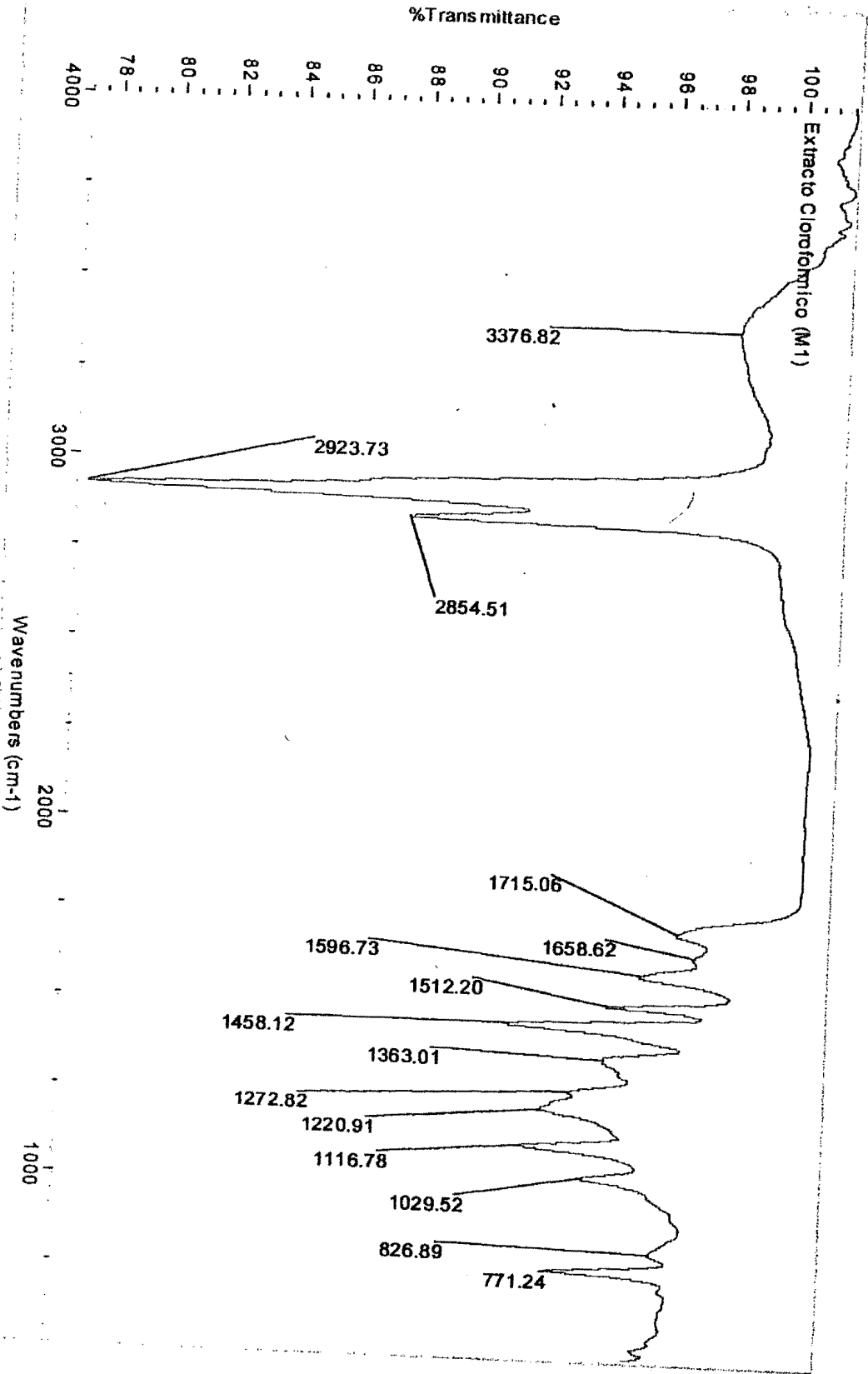
*[Signature]*  
**Quím. Ma. Angélica Rodríguez Best**  
**Directora de la USAQ**  
**CQP:597**

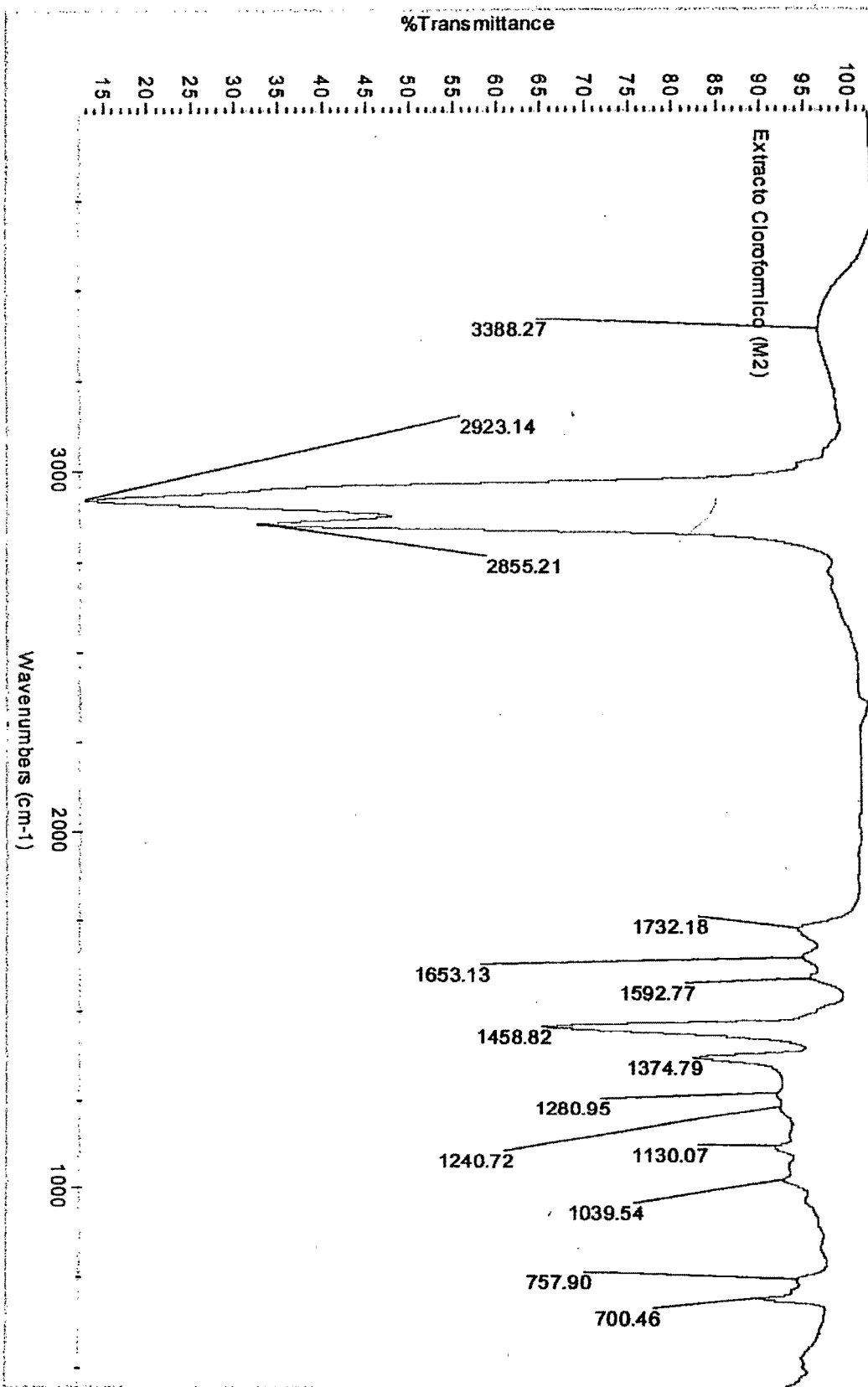
**Nota:**

El presente Informe solamente es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada cualquier corrección, o enmienda en el mismo lo anula automáticamente.

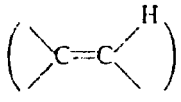
**Observ.:**

La muestra podrá ser devuelta dentro del plazo de 30 días calendarios de recepcionada. Sin embargo, cualquier consulta de resultados podrá ser absuelta dentro de los 15 días calendarios de emitido el Informe de Ensayo, dado el tiempo indicado no se aceptaran reclamos.







Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias, $\text{cm}^{-1}$	Intensidad
C—H	Alcanos	2.850-2.970 1.340-1.470	Fuerte Fuerte
C—H	Alquenos 	3.010-3.095 675-995	Media Fuerte
C—H	Alquinos (—C≡C—H)	330	Fuerte
C—H	Anillos aromáticos	3.010-3.100 690-900	Media Fuerte
O—H	Alcoholes y fenoles (monómeros)	3.590-3.650	Variable
	Alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3.200-3.600	Variable, a veces ancha
	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3.500-3.650	Media
	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2.500-2.700	Ancha
N—H	Aminas, amidas	3.300-3.500	Media
C=C	Alquenos	1.610-1.680	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1.500-1.600	Variable
C≡C	Alquinos	2.100-2.260	Variable
C—N	Aminas, amidas	1.180-1.360	Fuerte
C≡N	Nitrilos	2.210-2.280	Fuerte
C—O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1.050-1.300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1.690-1.760	Fuerte
NO <sub>2</sub>	Nitroderivados	1.500-1.570 1.300-1.370	Fuerte Fuerte

### Tabla Abreviada de las frecuencias de grupos funcionales orgánicos .

Fuente : Principio de análisis Instrumental , Holler Nieman –Quinta Edición .

## **ANEXO 4**

## **Análisis microbiológicos al extracto vegetal de Hojas de Guanábana en Hexano.**

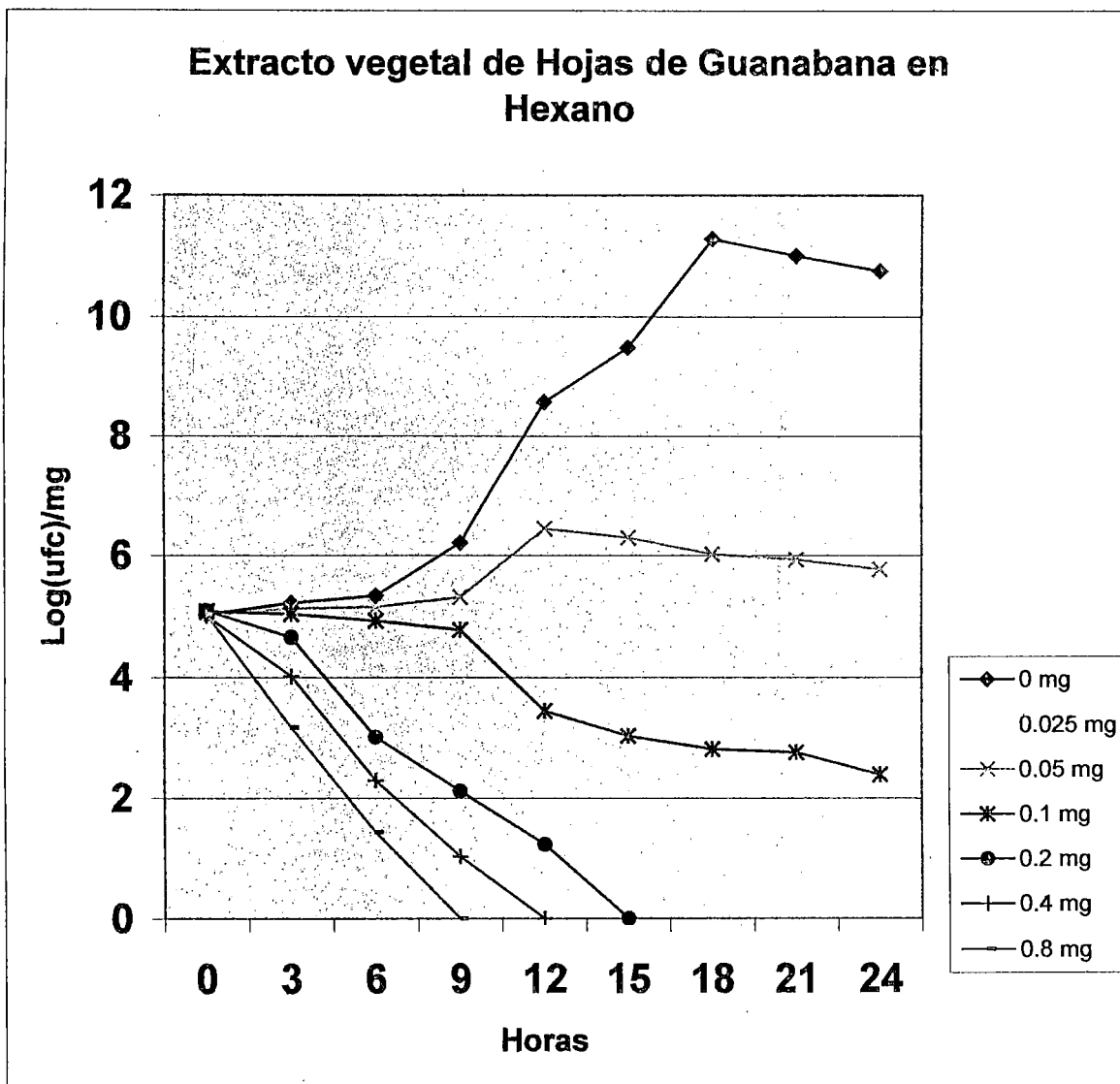
En la presente investigación se realizó también un análisis microbiológico al extracto vegetal hexánico de Hojas de Guanábana, este análisis se considera dentro de los anexos por no haber dado positivo en las pruebas de identificación de alcaloides, pero se obtuvo buenos resultados frente a la bacteria *Cándida*.

Habiendo analizado el extracto vegetal es muy difícil determinar que componente vegetal es el precursor de la actividad microbiológica presentada, dejando esta incógnita para investigaciones futuras.

A continuación se presentan los resultados:

<b>Horas</b>	<b>Control</b>	<b>0.025 mg</b>	<b>0.05 mg</b>	<b>0.1 mg</b>	<b>0.2 mg</b>	<b>0.4 mg</b>	<b>0.8 mg</b>
0	5.03	5.07	5.04	5.08	5.09	5.01	5.03
3	5.22	5.19	5.13	5.04	4.66	4.02	3.17
6	5.34	5.21	5.16	4.93	3.01	2.29	1.43
9	6.21	5.99	5.32	4.78	2.12	1.03	0
12	8.57	8.02	6.44	3.45	1.23	0	
15	9.49	9.11	6.29	3.03	0		
18	11.29	11.03	6.02	2.81			
21	11.01	10.56	5.93	2.76			
24	10.76	10.22	5.77	2.39			

## **ANEXO 5**



Del grafico se interpreta un C.M.I. a una dosificación de 0.4 mg , este valor es la Concentración mínima inhibitoria , la curva debajo de esta es la curva bactericida que se da a una concentración de 0.8 mg. , en la tabla se puede observar que la muerte de las bacteria se producen en un tiempo totalmente reducido de 15 horas , estos resultados son muy buenos e incentivan a seguir experimentando no solo con Alcaloides sino con otros tipos principios activos presentes en esta planta .