

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE TEOBROMINA
DE SEMILLAS DE *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), POR
MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS Y ESPECTROMÉTRICOS. IQUITOS,
2014”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Bach. AQUJE ELJARRATE, GHERARDO ANTHONY

Bach. VÁSQUEZ NAVARRO, LENCY

ASESORES:

Ing. CLETO JARA HERRERA

Ing. JULIO ARCE HIDALGO

IQUITOS – PERÚ

2014

RESUMEN

El presente proyecto de tesis fue realizado en el laboratorio de Fotoquímica, de la Facultad de Ingeniería Química de la UNAP, con un periodo de 4 meses y las Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizadas con la colaboración de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) fueron obtenidas de la recolección de mazorcas en el km 16 de la carretera Iquitos- Nauta en la comunidad de Varillal; en el distrito de San Juan del departamento de Loreto, luego de su traslado, fueron secadas a temperatura ambiente (25 a 30°C), molidas y luego se cogió 95 g de muestra, para realizar el desengrasado en un equipo de soxhlet; como solvente se utilizó al éter de petróleo a una temperatura de 45 °C por espacio de 120 horas, hasta que se agote el contenido de grasa de la muestra, el rendimiento de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) fue de 1.27 g de teobromina en forma cristalina, equivalente a 1.34%.

Utilizando el método de inclusión selectiva se adsorbió la teobromina con MgO y se desadsorbe con H₂SO₄ al 10%. Cristalizamos la teobromina con NaOH al 10%.

Para obtener la elucidación estructural de la sustancia aislada, se realizó empleando métodos de pruebas fisicoquímicas y espectrométricas. De las pruebas fisicoquímicas se comprobaron el Punto de fusión en el equipo Kisatom obteniendo el valor de 351.8 °C. De la Cromatografía de Capa Fina (TLC) en la corrida se obtiene el valor de $R_f \times 100 = 36$, para la determinación del peso molecular se realizó por el método de Rast obteniendo el valor de 180.45 g/mol, con un margen de error de 0.15% ya que la literatura nos muestra el peso molecular de teobromina es de 180.18 g/mol.

De la pruebas espectrométricas para la elucidación de la estructura química la espectrometría UV –Visible en el equipo de espectroscopia de UV – Visible Génesis VI registra un valor de λ máximo de 275 nm idéntica al que nos brinda la literatura.

La prueba de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono-13 nos muestran valores de desplazamiento que la sustancia aislada es teobromina.

ABSTRACT

This thesis project was conducted in the laboratory of Phytochemistry, Faculty of Chemistry UNAP Engineering, with a period of 4 months and Testing Magnetic Resonance Imaging were performed in collaboration with the Pontificia Universidad Catolica del Peru.

The seeds of *Theobroma subincanum* Mart. (Cocoa Varillal) were obtained from harvesting cobs at km 16 of the road Iquitos - NautaVarillal the community; in the district of San Juan department of Loreto, after transfer, were dried at room temperature (25- 30 °C), ground and then 95 g of sample was picked for degreasing in soxhlet equipment; was used as solvent to petroleum ether at a temperature of 45 °C for about 120 hours, until the fat content of the sample runs, the yield of *Theobroma subincanum* Mart. (Cocoa Varillal) was 1.27 g of theobromine in crystalline form, equivalent to 1.34%.

Using the method of selective inclusion theobromine adsorbed to MgO and des adsorbed 10% H₂SO₄. Crystallize theobromine with 10% NaOH.

For the structural elucidation of the isolated substance was performed using methods of physicochemical and spectrometric tests. Of physico the Melting Point Kisatom team checked in obtaining the value of 351.8 °C. From Thin Layer Chromatography (TLC) on the run value of $R_f \times 100 = 36$ is obtained for the molecular weight determination was performed by the method of Rast obtaining the value of 180.45 g/mol, with a margin of error 0.15% as the literature shows that the molecular weight of theobromine is 180.18g/mol.

From spectrometric evidence for the elucidation of the chemical structure -Visible UV spectrometry in the UV spectroscopy equipment - Visible Genesis VI registers a λ max value of 275 nm identical to that literature offers us.

Test Proton Nuclear Magnetic Resonance Carbon-13 and offset values show that the isolated substance is theobromine.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi mamá Herlinda y a mi abuelita Adelaida, por sus apoyos, consejos, comprensión, amor, en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar.

A la memoria de mi Abuelito Ramón, quien confió en mí en todo momento y desde el cielo me guio para terminar con éxito mi tesis.

A mis hermanos por estar siempre presentes, en especial a mi hermano Luis E. quien ha sido y es mi motivación, inspiración y felicidad, por estar siempre acompañándome para poderme realizar.

A mis tíos por sus buenos deseos, por creer y confiar en mí y a toda la familia.

A Carlos E. Olórtegui Morey por ser parte importante de mi vida, que ha sido el impulso y el pilar principal para la culminación de mi tesis, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento. T.A amore mío.

A ti Padre Luis E., que a pesar que no estuviste a mi lado en los momentos más difíciles, buenos y felices de mi vida, te quiero y te respeto por ser mi padre, sabes que en el fondo de nuestro ser tu y yo somos casi iguales.

Lency Vásquez Navarro.

Dedico mi Tesis con todo mi amor y cariño a Dios ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera, a mi padre Gerardo Agustín Aquije Vergara que aunque no esté físicamente con nosotros siento que desde el cielo me guía y acompaña en mis pasos; a mi madre Marina Eljarrate Bazán, porque siempre está a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mis hermanos Jimmy Agustín, Gustavo jermain; y cuñadas, por sus palabras y compañía y por nuestros deseos como hermanos y familia para que todas las cosas salgan bien.

Por su apoyo moral, sentimental, afecto, amor y cariño se lo dedico a Cristina Morí Rodríguez, ya que Dios cruzo nuestras vidas, para estar juntos en los buenos y malos momentos.

A mi abuelos; Walter, Mechita, Andrés y Paula, por su amor y ternura que me demostraron como segundos padres, a mis sobrinos; Zamantha, Pierina, Camilo, Mishel, Zoe y Gustavito que son inspiración en mantener la unión familiar junto con mis primos, tíos y demás familiares.

En modo especial, va dedicado a los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por su esmero y su dedicación de formarnos como profesionales, a mis amigos del LIPNAA – CIRNA, Leonor y Wilfredo, por brindarme sus conocimientos en Fitoquímica y Productos Naturales.

Y por último se lo dedico a mi amigos y compañeros; Edzard Torres, a mis compañeros de Boticas Arcángel, a mis amigos de la Promoción LSB – 97, Pisco – Ica, Lucho y Christian por estar pendientes de mí y vivir la amistad verdadera.

Gherardo Anthony Aquije Eljarrate

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a Dios quien nos dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor nos ha dado la sabiduría suficiente para culminar nuestra carrera universitaria.

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por abrirnos las puertas y brindarnos todo lo necesario para terminar nuestra carrera profesional y con el tiempo dejar bien en alto el nombre de nuestra primera casa de estudios.

De manera muy especial queremos agradecer a nuestros queridos maestros, que tuvieron el afán y esmero de educarnos en nuestra formación profesional, a nuestros asesores: Ing. Cleto Jara Herrera, Ing. Julio Arce Hidalgo por brindarnos su apoyo en el desarrollo de esta tesis y demás personas que contribuyeron en la elaboración del presente trabajo científico.

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a nuestros padres por todo el esfuerzo que hicieron para darnos una profesión y hacer de nosotras personas de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años; gracias a ustedes hemos llegado a donde estamos.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma nos ayudaron a crecer como personas y como profesionales.

Para ellos:

Muchas gracias y que Dios los bendiga.

Lency – Gherardo Anthony

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I.	
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.2. OBJETIVOS	17
1.2.1. Objetivo General	17
1.2.2. Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO II.	
2.1. MARCO TEÓRICO	19
2.1.1 .Antecedentes	19
2.2. Identificación Botánica.	21
2.2.1. Descripción Botánica de <i>Theobroma subincanum</i> Mart.	21
2.2.2. Distribución y Hábitat	22
2.2.3. Aspectos Etnomedicinales y Etnofarmacológicos	23
2.2.4. Composición Química de <i>Theobroma subincanum</i> Mart.(Cacao del Varillal)...	23
2.2.5. Usos de la Teobromina.....	24
2.3. Mecanismo de Acción de Teobromina	25
2.4. Alcaloides; Generalidades	26
2.4.1.Clasificación de los Alcaloides	27
A. Alcaloides verdaderos	27
B. Protoalcaloides.....	27
C. Pseudoalcaloides	27
D. Alcaloides imperfectos	27

Según sus propiedades farmacológica	27
A. Modificadores del Sistema Nervioso Central	27
A.1. Estimulantes del Sistema Nervioso Central	27
A.2. Alucinógenos.....	27
B. Modificadores del Sistema Nervioso Autónomo	27
B.1. Parasimpaticomiméticos de acción directa.....	27
B.2. Parasimpaticolíticos.....	27
Según su Distribución en Familias Botánicas.....	27
C.1. Alcaloides de Solanáceas	27
C.2. Alcaloides de Rubiáceas.....	27
C.3. Alcaloides de Amarilidáceas	28
C.4. Alcaloides de Merispermáceas	27
Según su Origen Biosintético	28
D.1. Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos	28
D.2. Alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos.....	28
2.4.2. Biogénesis de los Alcaloides	28
2.4.3. Métodos de Identificación o Caracterización Preliminar de los Alcaloides	29
2.4.4. Proceso de Aislamiento de Alcaloides	30
2.4.4.1. Métodos de Aislamiento de Alcaloides.....	30
2.4.4.2. Extracción en Medio Alcalino.....	31
2.4.4.3. Extracción en medio Ácido	32
2.5. Purificación de los Alcaloides	33
2.6. Alcaloides Purínicos: Teobromina.....	34
2.6.1. Métodos de aislamiento de Teobromina ò 3,7 – dimetil xantina	36

2.6.2. Prueba de Identificación de Teobromina.....	37
2.7. Determinación de las propiedades Fisicoquímicas y Espectrométricas	38
2.7.1. Pruebas Fisicoquímicas	38
2.7.1.1. Punto de Fusión	38
2.7.1.2. Aparatos que miden el Punto de Fusión.....	38
El Aparato de Thiele	38
El aparato Fisher Johns	39
El aparato Nalge – Axelrod.....	39
2.8. Solubilidad	40
2.9. Propiedades Organolépticas.....	40
2.10. Prueba de Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	40
2.11. Determinación de Peso Molecular por el Método de Rast.	41
2.12 .Pruebas espectrométricas	42
2.12.1. Espectrometría Ultravioleta Visible.....	42
2.12.2. Fundamentos de la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.....	44
2.12.3. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	45
2.12.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones	50
2.12.5. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de C - 13	51
2.13. Elucidación Estructural del Compuesto Aislado	53
2.14. Variables Operacionales	54
2.14.1. Variable Independiente	55
2.14.2. Variable Dependiente.....	56
2.15. Hipótesis	57

CAPITULO III.

3.1. METODOLOGÍA.....	59
3.2. Diseño de Investigación	59
3.3. Población y Muestra	60
3.3.1. Población.....	60
3.3.2. Muestra.....	60
3.3.3. Criterios de Inclusión	60
3.3.4. Criterios de Exclusión	60
3.4. Procesamiento de Laboratorio	61
3.4.1. Etapas	61
3.4.1.1. Quebrantamiento de Mazorcas.....	61
3.4.1.2. Despojo de Arilo	61
3.4.1.3. Secado y Molienda de Semillas	61
3.4.1.4. Desengrasado	61
3.4.1.5. Maceración.....	62
3.4.1.6. Filtrado	62
3.4.1.7. Inclusión.....	62
3.4.1.8. Aislamiento de Teobromina.....	63
3.4.1.9. Cristalización	64
3.5. Evaluación del Rendimiento	64
3.6. Elucidación de la Estructura Química de la Sustancia Aislada	62
3.7. Pruebas Fisicoquímicas.....	64
3.7.1. Punto de Fusión.....	64
3.7.2. Cromatografía de Capa Fina	65
3.7.3. Determinación del Peso Molecular por el Método de Rast.....	65

3.8. Pruebas Espectrométricas para la Elucidación de la Estructura Química	67
3.8.1. Espectroscopia UV - Visible.....	67
3.8.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones	67
3.8.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono - 13.....	68
3.9. Equipos, Materiales y Reactivos.....	69
3.9.1. Equipos y Materiales.....	69
3.9.2. Materiales de vidrio.....	69
3.9.3. Materiales de Metal.....	69
3.9.4. Materiales de Porcelana	70
3.9.5. Materiales de Filtración	70
3.9.6. Reactivos	70
3.9.7. Material Cromatográfico	70

CAPITULO IV.

4.1. Resultados	72
4.1.1. Rendimiento de Teobromina Aislada de Semillas de <i>Theobroma subincanum</i> Mart. (Cacao del Varillal)	72
4.1.2. Resultados de las Pruebas Fisicoquímicas	72
4.1.3. Resultados de las Pruebas Espectrométricas para la Identificación de Teobromina	72
4.1.3.1. Prueba de Espectroscopia UV - Visible.....	72
4.1.3.2. Prueba de Resonancia Magnética Nuclear.....	73
4.1.3.2.1. Prueba de Resonancia Magnética Nuclear de Protones en un Equipo Bruker – AC 300 (300.15 MHz)	73
4.1.3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono - 13	73

4.2. Discusión	74
4.3. Conclusión	76
4.4. Recomendaciones	77
4.5. BIBLIOGRAFÍA	78

V. ANEXOS

5.1. Constancia N° 28 de <i>Theobroma subincanum</i> Martius (Cacao del Varillal), otorgada por el HERBARIUM AMAZONENSE	81
5.2. Diagrama de Bloque del Proceso de Investigación	82
5.3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones	83
5.4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C - 13	84

INTRODUCCIÒN

La especie vegetal *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), como objeto de estudio, ha permitido demostrar que esta planta marginal, tan igual que *Theobroma cacao* (Cacao), posee teobromina, alcaloide de naturaleza purínica que se halla presente en plantas de la familia *Esterculiáceae*.

Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal), por ser poco conocido, no ha llegado a tener ninguna demanda frente a las repercusiones industriales, alimentarias que posee el cacao del cual se elabora el chocolate para la alimentación y se obtiene la manteca que se utiliza en la industria farmacéutica y cosmetológica.

Este estudio pone a la luz del conocimiento una nueva especie vegetal complementaria al cacao; porque puede otorgársele los mismos usos que tiene el cacao, pero también se puede utilizar para la obtención de teobromina para cubrir la demanda de la industria farmacéutica mundial.

El hallazgo de teobromina en esta especie vegetal abre además la posibilidad de introducir en la región una nueva línea de actividad agroindustrial que permitirá dar trabajo a los campesinos y mejorar sus condiciones de vida.

CAPÍTULO I.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mundo existe una creciente necesidad en la búsqueda de especies vegetales con contenido de teobromina, ya que actualmente son pocas las fuentes que contienen este alcaloide y están circunscritas a la familia *Esterculiáceae*.

El más conocido mundialmente es *Theobroma cacao* (Cacao), originario de América tropical (México, Brasil, Perú, Ecuador y otros países). Es una planta que también se cultiva en África (Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Camerún) y en el Sureste de Asia (Malasia e Indonesia). El cacao es utilizado tanto por la industria farmacéutica como por la industria alimentaria; la semilla contiene un alcaloide característico, la teobromina. Además es rica en materias grasas y albumina. De las semillas, desecadas, torrefactadas y molidas se obtiene el polvo de cacao, base para la elaboración del chocolate, para el cual se separa 50% de manteca (triglicéridos de ácidos grasos de C₁₆ a C₁₈), para la fabricación de pomadas o supositorios y crema facial, y finalmente después del desengrase la teobromina se usa para preparados farmacéuticos como diuréticos, antiinflamatorios, bronco dilatadores y estimulantes del sistema nervioso.⁽¹⁾

Por sus mejores cualidades farmacológicas frente a otros principios activos de acción similar, resulta de suma importancia encontrar otras plantas con contenido de teobromina.

El presente estudio pretende demostrar que *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), planta de uso marginal en la Amazonía peruana, posee teobromina, de esta manera permitirá incorporar esta especie a la industria farmacéutica mundial como nueva materia prima que se sumará a las ya conocidas.

Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal) es un fruto silvestre casi desenvainado semejante a *Theobroma cacao* (Cacao), pero más pequeño.

Otras especies de la familia *Esterculiácea* son casi irrelevantes en cuanto al contenido de teobromina y se consumen como frutas, tales como *Theobroma bicolor* (Macambo), *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), *Theobroma obovatum* (Cacao Cenizo), *Herrania nitida* (Poepps) y *Schultes* (Cacahuillo).

Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal) es pariente a nivel del género de *Theobroma cacao* (Cacao), las pruebas fotoquímicas para demostrar la presencia de teobromina ha recaído en las semillas. Sin embargo, es necesaria que esta sea corroborada mediante otras pruebas de más complejidad como las de Resonancia Magnética Nuclear de H⁺ y de Carbono - 13, que validen con éxito el resultado inicial.

Por todo lo mencionado es que se plantea la siguiente interrogante:

¿Es posible lograr el aislamiento y elucidación estructural de teobromina presente en las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) por métodos fisicoquímicos y espectrométricos?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- Aislar y elucidar estructuralmente la teobromina que se halla presente en las semillas de *Theobroma subincanum* Mart (Cacao del Varillal) por métodos fisicoquímicos y espectrométricos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aislar la teobromina de las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (cacao del Varillal) por el método de inclusión y reparto de fases.
- Identificar la teobromina aislada por métodos fisicoquímicos y espectrométricos.

CAPÍTULO II.

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1. Antecedentes

Bruni, R. (2000) en su investigación sobre “Composición lipídica de semillas de *Theobroma subincanum* Mart. en la región salvaje ecuatorial y la comparación con dos variedades de *Theobroma cacao*”, analiza la fracción lipídica de las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. La fracción de lípidos se obtiene de las semillas a través de la extracción con fluidos supercríticos y el análisis realizado por cromatografía en capa fina preparatoria seguido por cromatografía de gases. Los resultados revelaron que en *Theobroma subincanum* Mart. Los triglicéridos contienen ácidos grasos con cadenas más largas. El punto de fusión y peróxido y números saponificables se determinaron para cada componente de Theobroma. Los resultados llevan a la conclusión de que *Theobroma subincanum* Mart. Produciría una mantequilla de calidad inferior a *Theobroma cacao* (cacao). Sin embargo, los resultados apuntan hacia un uso comercial significativa de *Theobroma subincanum* Mart. en productos de bajo perfil.⁽⁶⁾

Médici, A. (2002) en su trabajo “Tocoferol, ácidos grasos y esteroides en semillas de *Theobroma subincanum* Mart. en la región salvaje ecuatorial”, analizó partes de las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. Para determinar la distribución cualitativa y cuantitativa de tocoferol. Los ácidos grasos y los esteroides en los embriones, endospermo y tegumentos también se evaluaron con el objetivo de caracterizar mejor la matriz de la planta para su uso potencial como una fuente de compuestos fitoquímicos, para el procesamiento de la manteca de cacao y/o como una nueva fuente de bajo costo para productos naturales para el uso en cosmética y las industrias alimentarias y/o nutracéuticas. Se realizaron análisis de HPLC para los tocoferoles y cromatografía de gas, espectrometría de masas y análisis de perfil de ácidos grasos y fitosteroides.

Los tocoferoles son particularmente abundantes en el embrión, con datos cualitativos y cuantitativos similares al aceite del germen de trigo, mientras que, en los tegumentos y endospermo, las concentraciones de tocoferoles fueron menores. El perfil de ácidos grasos de fitosterol y caracterización de las partes de la semilla mostraron datos homogéneos cualitativos. En el endospermo, 80% de todos los ácidos grasos consistió en ácido oleico y esteárico mientras que entre los esteroides, cicloartenol fue más abundante en el endospermo que en los embriones y los tegumentos. En consecuencia, las semillas de *Theobroma subincanum* Mart. se pueden proponer como posibles sustitutos en la industria de procesamiento de cacao y como una fuente potencial de isómeros de vitamina E.⁽⁷⁾

González, C. (2009) en su estudio sobre “Contribuciones al conocimiento de *Theobroma subincanum* Mart. (macambillo) frutal nativo de gran potencial en la Amazonía peruana”, revela que la caracterización física, química y bromatológica de la pulpa y semillas son aprovechables y representan entre 40 y 50% del fruto. La pulpa presenta valores de humedad de 80.42 a 85.43 g/100g de muestra original, ceniza 0.22 a 0.68 g/100 g, lípidos 0.12 a 0.49g/100g y proteínas de 2.41 a 4.48 g/100g. Las semillas presentan valores de ceniza de 2.14 a 3.68 g/100g de muestra original, lípidos de 8.38 a 16.72 g/100g y proteínas entre 9.08 a 12.47 g/100g. La pulpa de macambillo o Cacao del Varillal presenta proteínas, ceniza y lípidos ligeramente superiores a *T. cacao*, *T. grandiflorum* y *T. bicolor*; sin embargo el valor nutritivo de la semilla muestra ligera inferioridad.⁽⁸⁾ Aunque es una planta de potencialidades económicas muy cercanas al cacao.

En la actualidad no se conocen otros estudios realizados relacionados con la presencia de teobromina en *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) u otro metabolito de esta planta de la familia de las xantinas.

2.2. Identificación Botánica

La identificación botánica de la especie vegetal, se realizó en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, por comparación con excicata de especies análogas. Ésta responde a la clasificación siguiente:

<i>Theobroma subincanum</i> Mart.	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Orden	Malvales
Familia	<i>Esterculiáceae</i>
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma subincanum</i> Mart.
Nombres vulgares o comunes	Cacao del Varillal, Cacahuillo, Cacao Macambillo, Macambo Sacha.

2.2.1. Descripción Botánica de *Theobroma subincanum* Mart.

Árbol silvestre mediano de unos 6 a 12 m de alto (a veces hasta 20 m), el tronco tiene un diámetro de 15 a 20 cm (a veces hasta 30 cm). Las hojas son alargadas, elípticas a oblongas, obovada, ligeramente asimétricas en la base, anteras o sinuadas hacia el ápice, el haz color verde oscuro, envés densamente marrón o ferruginoso, con longitud entre 14 a 60 cm y entre 5 a 17 cm de ancho. Las flores son unisexuales y apétalas reúnen numerosos estambres y 2 lóculos en las anteras, los estambres pueden ser libres o connatos (por ejemplo fusionados).

Las relaciones evolucionarias de estas plantas no está todavía muy claro pero varios grupos monofíleticos, pueden ser distinguidos por ejemplo;

malvoideae: malvaceae, malvariscaeae, hibiscus y parientes *gossypium* y parientes, *bombacoideae, tiloideae, dombeyoideae, esterculiodeae, browlowioideae, felicteoideae, grewtioideae, byttaderioideae*, algunos no pueden ser diagnosticados morfológicamente.⁽¹⁷⁾

2.2.2. Distribución y Hábitat

El género *Theobroma* tiene su origen en el Neotrópico. Existen 22 especies, todos árboles pequeños, que crecen típicamente en el sotobosque de los bosques húmedos tropicales (Rondón & Cumana, 2005).⁽¹⁰⁾

Dentro de las especies del género *Theobroma*, ***Theobroma subincanum Mart.*** (Cacao del Varillal), es la que presenta la mayor franja de dispersión, encontrándose en toda la extensión de la cuenca del Amazonas - Orinoco (TCA, 1997). El “macambillo” o “Cacao del Varilla” habita generalmente en el bosque de tierras altas, de preferencia en las márgenes húmedas de las quebradas (Cavalcante, 1991; Vásquez, 1997; Rondón & Cumana, 2005).⁽¹⁰⁾

En la Amazonía peruana se la encuentra en el bosque natural o bosques secundarios en los departamentos de Amazonas, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín y Ucayali.⁽¹⁰⁾

Crece en la Selva baja de la región Loreto; en áreas arenosas y asociada a las plantas del Varillal. En la región Ucayali, se ha observado en las zonas de río Aguaytía en los bosques de Rinquía.

En la figura N° 01 se muestra su distribución geográfica en el departamento de la región Loreto.

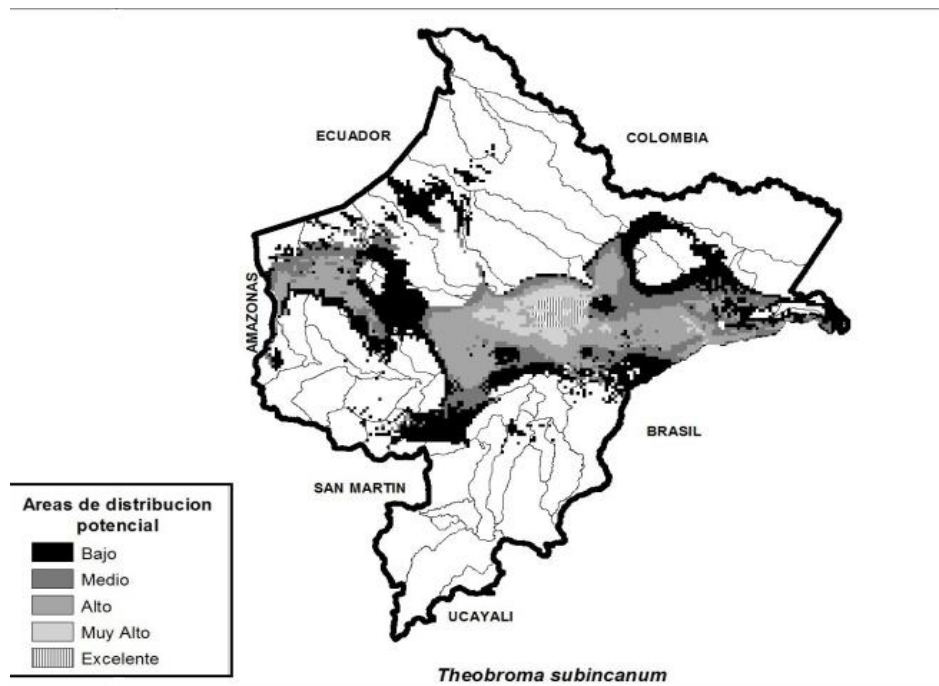


Fig.01 Distribución en el departamento de la región Loreto.

2.2.3. Aspectos Etnomedicinales y Etnofarmacológicos

La corteza del Cacao y otras especies del género *Theobroma* se usan para el control de la diabetes. ⁽¹⁰⁾

Las semillas se mastican hasta obtener una sustancia mucilaginosa que se luego se traga para calmar la tos. ⁽¹¹⁾

2.2.4. Composición Química de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal)

Contiene taninos; cuando se desengrasa, en la manteca se hallan triglicéridos de ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido esteárico

y ácido palmítico; también están presentes en la manteca, pequeñas cantidades de esteroides: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol y pequeñas cantidades de colesterol.⁽¹²⁾

Teobromina es el componente alcaloidal del género *Theobroma*, más estudiado en *Theobroma cacao* (cacao) que en otras especies; también contiene cafeína en un 0.2 a 0.86mg.⁽¹³⁾

Hay presencia de azúcares tipo glucosa y sacarosa, y vitaminas como niacina, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico (vitamina C), piridoxina, nicotinamida, ácido pantoténico.

Se encuentran en la semilla, aminoácidos como; histidina, arginina, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, lisina, leucina, isoleucina, tirosina y fenilalanina,⁽⁶⁾ así como oligoelementos; calcio, fósforo y hierro.⁽¹⁵⁾

2.2.5. Usos de la Teobromina

- Se emplea como diurético para evitar la retención del agua en el cuerpo causado por la insuficiencia renal.
- Contra el asma y la bronquitis actúa como relajante muscular y vasodilatador.
- Como estimulante cardíaco.
- Es relajante de la musculatura lisa de las vías biliares, se usa en el tratamiento del cálculo biliar y del cardíaco.
- Tiene la capacidad de fijarse a receptores adenosínicos.⁽¹⁹⁾
- Estimulan la contractibilidad cardíaca en la forma más rápida que la digitalina y más prolongada que los β -adrenérgicos, es útil en pacientes con cor pulmonale.

2.3. Mecanismo de Acción de Teobromina

Las xantinas inhiben la fosfodiesterasa del AMP_C (adenosin monofosfato cíclico) del GMP_C (guanosin monofosfato cíclico) aumentando los niveles de dichos nucleótidos, alterando la movilización del Ca⁺⁺ intercelular, pero estas acciones se producen con concentración de teobromina superiores a la dosis terapéutica, la hipótesis de acción actualmente más aceptada se basa en la capacidad de las xantinas para bloquear receptores adenosínicos A1 y A2 a concentraciones equivalentes a las terapéuticas.

Las acciones de la adenosina en los diversos órganos es variado. El SNC es la región más rica en receptores adenosínicos de todo el organismo, la activación de receptores A1 parasimpático reduce la liberación de neurotransmisores tanto excitadores, como inhibidores a nivel post sináptico, la activación de receptores A1 y A2 origina hiperpolarización e inhibición de la actividad neuronal que explica las propiedades de la adenosina en el SNC; ansiólisis, sedación y sueño. Depresión respiratoria acción anti epiléptica y neuroprotectora en situaciones de crisis epiléptica, hipoxia, isquemia e hipoglucemia por acción facilitadora de la actividad antinociceptiva de los opioides a nivel cardiovascular. La adenosina tiene propiedades inotrópicas, cianotropicas negativos (A1) y provee vasodilatación en la mayoría de los territorios con receptores A2 incluyendo coronarios y arterias cerebrales. Sobre el riñón la adenosina reduce el flujo sanguíneo, la velocidad de filtración glomerular y la liberación de renina (A1), por lo tanto originará una disminución de la diuresis sobre la musculatura lisa bronquial, su acción directa A2 es broncodilatadora pero la inhalación de adenosina por individuos asmáticos genera una poderosa respuesta bronco constrictora, mientras que paradójicamente en individuos sanos no modifica el calibre de las vías aéreas, se propone que la adenosina favorece la liberación de mediadores por parte de los mastocitos pro activados inmunológicamente y pone en marcha mecanismos inflamatorios neurógenos.

Todas estas acciones de la adenosina son antagonizados por la metilxantinas justificando así la mayoría de sus acciones farmacológicas.

Sin embargo la acción anti adenosínica de las metilxantinas no explica completamente su acción bronquial ya que esta aun por dilucidar el papel real que puede desempeñar la transmisión adenosínica en la patogenia del asma y por lo tanto la relevancia que el bloqueo de sus receptores pudiera tener en la respuesta terapéutica a la teobromina.⁽¹⁹⁾

2.4. Alcaloides; Generalidades

El termino Alcaloide proviene de *alkaly* que significa **sosa** (alcalino), acuñado por Wilhen Meisner en 1818 y se refería a las propiedades básicas que tenían estas sustancias aisladas de las plantas.⁽⁵⁾

El alcaloide es un compuesto orgánico de origen vegetal, nitrogenado en él se encuentra generalmente constituyendo un compuesto cíclico, derivado generalmente de aminoácidos de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a bajas dosis y que responden a reacciones comunes de precipitación.

Actualmente se emplea la palabra alcaloide en un sentido más restrictivo que el criterio original, se incluye actualmente en la denominación a metabolitos secundarios con propiedades no necesariamente básicas en la que parte de la estructura incluyendo el nitrógeno procede de los aminoácidos, no se incluye azúcares, ni lípidos nitrogenados como tampoco compuestos en los que el nitrógeno forma parte de funciones neutras, no amínicas, ni amídicas, tales como por ejemplo: nitrociano o isociano; se excluye así mismo a aminas simples como etanol amina, adrenalina o dopamina, que se desempeñan como mensajeros químicos o cumplen otras funciones; también se excluyen aminoácidos o péptidos raros procedentes de hongos, heterocíclicos nitrogenados simples y pigmentos pirrólicos.⁽¹⁶⁾

2.4.1. Clasificación de los Alcaloides

Según su estructura química los alcaloides se clasifican en 4 grupos:

- A. Alcaloides verdaderos.-** Formados a partir de aminoácidos que tienen siempre un nitrógeno intra cíclico que forma parte de un heterociclo: triptófano.⁽⁵⁾ Tienen carácter básico y existen en la naturaleza en estado de sal.
- B. Protoalcaloides.-** Son aminas sencillas con nitrógeno extra cíclico, de carácter básico y provienen del metabolismo de los aminoácidos: tiramina, serotonina.
- C. Pseudoalcaloides.-** No son derivados de aminoácidos aunque tienen todas las características de los alcaloides.⁽⁴⁾
- D. Alcaloides imperfectos.-** Son derivados de bases purínicas y no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides; caso de teobromina, cafeína y teofilina.

Según sus propiedades farmacológicas los alcaloides pueden ser:

A. Modificadores del Sistema Nervioso Central:

A.1. Estimulantes del Sistema Nervioso Central: Ibogaina, estricnina.

A.2. Alucinógenos: como mezcalina del peyote, harmalina de *Banisteriopsiscaapi* (ayahuasca), dimetiltriptamina de *psychotriaviridis* (chacrana).

B. Modificadores del Sistema Nervioso Autónomo:

B.1. Parasimpáticomiméticos de acción directa: pilocarpina.

B.2. Parasimpaticolíticos: alcaloides de la belladona y de la efedra.

Según su Distribución en Familias Botánicas, los alcaloides pueden ser:

C.1. Alcaloides de Solanáceas: solasodina, nicotina y hioscina.

C.2. Alcaloides de Rubiáceas: mitrafilina y cafeína.

C.3. Alcaloides de Amarilidáceas: colchicina.

C.4. Alcaloides de Menispermáceas; D-tubocurarina.

Según su Origen Biosintético los alcaloides pueden ser:

D.1. Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina):
lobelina

D.2. Alcaloides derivados de aminoácidos Aromáticos
(fenilalanina/tirosina): solasodina, papaverina, triptófano, psilocibina
y harmina. ⁽¹⁷⁾

2.4.2. Biogénesis de los Alcaloides

Los alcaloides provienen de aminoácidos precursores como los aminoácidos alifáticos y aminoácidos aromáticos. Se tienen los siguientes:

- Alifáticos como: ornitina, lisina e histidina.
- Aromáticos como: fenilalanina, tirosina y triptófano.
- En la formación de los alcaloides también intervienen vitaminas como: ácido nicotínico; derivados del ácido benzoico (ácido antranílico) o ácido 2 – aminobenzoico.
- También intervienen bases purínicas, unidades de triterpenos y derivados de acetato.

En la figura N° 02 se observan algunos aminoácidos, vitaminas y purinas que originan alcaloides.

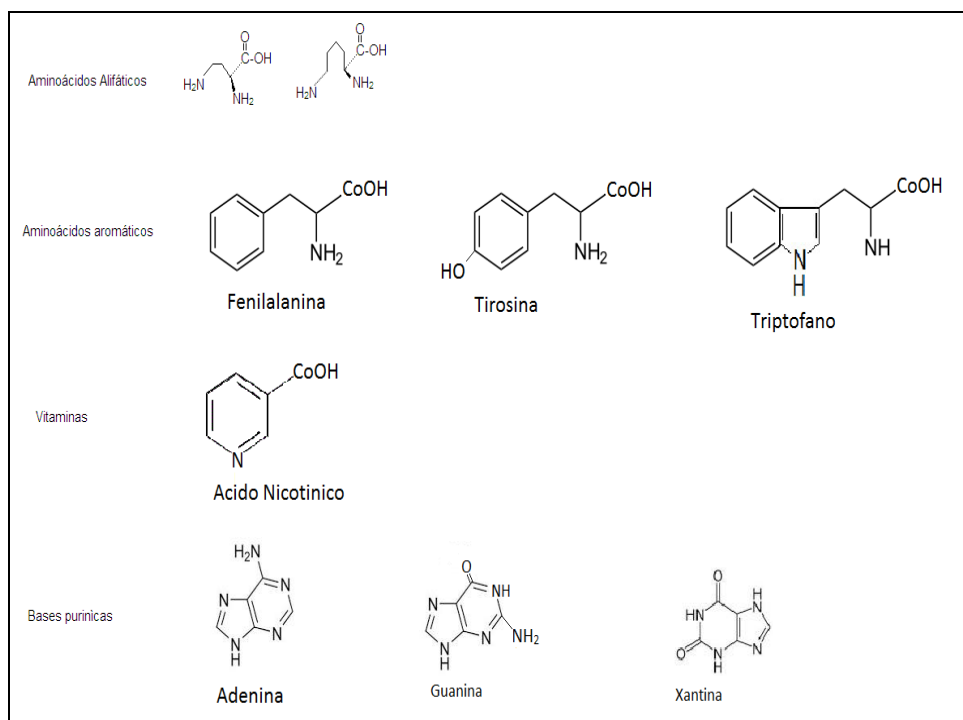


Fig. N° 02 Aminoácidos, vitaminas y purinas que dan origen a los Alcaloides.

2.4.3. Métodos de Identificación o Caracterización Preliminar de los Alcaloides.

La técnica de caracterización de los alcaloides consiste en una precipitación de éstos con reactivos específicos, se basa en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con metales pesados: Bismuto, Mercurio, Tungsteno o Iodo. En la práctica se emplean soluciones yodo - yoduradas como el Mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer), el tetrayodo bismutato de potasio (reactivo de Dragendorff) pero también se puede utilizar el ácido sílicotúngstico (mezcla de óxidos de tungsteno y de silicio) o soluciones alcalinas de iodoplatinato.

Otros reactivos originan reacciones coloreadas características de un determinado grupo de alcaloides, como el p-dimetilamino benzaldehído para los alcaloides del cornezuelo de centeno; el Sulfato de cerio y de amonio que diferencian los índoles (amarillos) de los de hidroíndoles (rojos) y los β -amino acrilatos (azules), los oxiíndoles, etc, la ninhidrina para los fenilalquilaminas; el reactivo de Vitali-Morin para los alcaloides tropánicos; el Cloruro férrico en medio clorhídrico para las tropolonas o en medio perclórico para los alcaloides de *Rauwolfia*, pero los alcaloides de naturaleza purínica como teobromina no son detectados con los reactivos citados, si es posible identificar con ácido nítrico concentrado disolviendo la teobromina en este ácido evaporándolo a sequedad y añadiendo gotas de NH_4OH que da una coloración purpura⁽²⁰⁾. Stahl Egon señala que teobromina puede ser identificado por cromatografía de capa fina (TLC), utilizando placas de sílica gel F₂₅₄ y resolviendo la corrida con los disolventes de acetona, cloroformo, n-butanol e hidróxido de amonio al 25% a saturación normal, el valor de $R_f \times 100 = 36$.⁽²³⁾

2.4.4. Proceso de Aislamiento de Alcaloides

2.4.4.1. Métodos de Aislamiento de Alcaloides

Se funda en el hecho de que los alcaloides se hallan en las plantas al estado de sales o de combinaciones solubles, con carácter básico y que sus bases y sus sales poseen distinta solubilidad en disolventes orgánicos y agua, respectivamente, según su pH.

Pero cuando el material del que se va a aislar contiene a menudo cantidades considerables de grasas, terpenos, ceras y otras sustancias lipofílicas que interrumpen el proceso de aislamiento, sobre todo dando lugar a emulsiones, previamente

se debe proceder a un desengrasado del material vegetal pulverizado, empleando n-hexano o éter de petróleo en un equipo de Soxhlet que liberará del material las sustancias lipídicas. Estos disolventes no arrastran nunca en medio neutro a los alcaloides ni parte de ellos.⁽⁵⁾

2.4.4.2. Extracción en Medio Alcalino

La droga pulverizada y desengrasada se mezcla con una solución acuosa alcalina que desplaza los alcaloides de sus combinaciones salinas; en forma de bases se extraen con un solvente orgánico como cloroformo, diclorometano, benceno, etc.⁽¹⁸⁾

El agente empleado para la alcalinización suele ser el amoníaco si los alcaloides poseen una función lábil; por ejemplo para una función éster se debe emplear carbonatos alcalinos en vez de amoníaco.⁽¹⁸⁾

El disolvente orgánico que contiene disuelto los alcaloides base se separa por destilación a presión reducida llevada a 1/5 de su volumen.⁽¹⁸⁾

Luego se trata con solución acuosa ácida, para que los alcaloides pasen a sales, que se solubilizan en la fase acuosa mientras otras moléculas como pigmentos, esteroides y otras impurezas permanecen en solución en la fase orgánica. Se pueden emplear diferentes ácidos (ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido orto-fosfórico), pero siempre en soluciones diluidas (2 al 5%).⁽¹⁸⁾

Las soluciones acuosas de las sales de alcaloides reunidas y en caso necesario lavadas con solvente apolar, se alcalinizan con

una base en presencia de un disolvente no miscible (cloroformo). Se agota así de la fase acuosa todos los alcaloides ya que pasan a la fase orgánica, lo que se verifica al presentar la fase acuosa resultados negativos cuando se le agrega el reactivo de Mayer.⁽¹⁸⁾

El disolvente orgánico que contiene el alcaloide base se decanta, se eliminan las trazas de agua que pudiera contener con sulfato de sodio anhidro y se concentra al vacío; se obtiene así un residuo que contiene los alcaloides totales.⁽⁴⁾ Éstos se pueden separar por cromatografía de columna en gradiente de pH.⁽¹⁸⁾

2.4.4.3. Extracción en medio Ácido

Se pueden presentar dos casos, en el primer caso la droga pulverizada se extrae con una solución ácido acuoso.⁽¹⁸⁾ En el segundo caso se utilizan soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas ácidas, de ácido tartárico, por ejemplo para la extracción se debe concentrar el líquido extraído por destilación al vacío para eliminar el alcohol.⁽¹⁸⁾

En ambos casos se obtienen soluciones acuosas de sales de alcaloides y estas soluciones pueden tratarse de los modos siguientes:⁽¹⁸⁾

- Alcalinizando y extrayendo las bases con un disolvente orgánico no miscible (con lo que se vuelve al caso anterior).
- Fijación de los alcaloides sobre resinas de intercambio iónico y después realizar su elución con ácidos fuertes.

- Precipitación de los alcaloides bajo la forma de yodo - mercuriatos utilizando el reactivo de Mayer concentrado, el complejo formado se recupera tras filtración o centrifugación éste se redissuelve en una mezcla de alcohol : agua : acetona (60:30:10); posteriormente estas sales de alcaloides se rompen al pasarlas por resinas de intercambio iónico, técnica indicada para los alcaloides amino cuaternarios (tipo D-tubocurarina del curare).⁽¹⁸⁾

Existen técnicas especiales de extracción destinadas a la obtención de alcaloides volátiles. Por ejemplo, por arrastre en corriente de vapor de agua caso la esparteína o para aquellos alcaloides de carácter básico débil que por este motivo son solubles en agua en forma de base (colchicina) o también en el caso de alcaloides cuyas sales son directamente dissociables y por lo tanto solubles en medio orgánico como por ejemplo la reserpina de *Rauwolfia serpentina*.⁽¹⁸⁾

2.5. Purificación de los Alcaloides

Sea cual fuera el método elegido para el aislamiento de los alcaloides, no se obtiene un producto puro sino una mezcla de sustancias a menudo complejas que hay que separarlas. En el mejor de los casos una de estas sustancias es mayoritaria y puede obtenerse por cristalización directa. Por ejemplo, la quinina que cristaliza en forma de sulfato, se logra neutralizando los líquidos donde se la extrajo; en otros casos los distintos alcaloides que se encuentran en la mezcla, tienen distinto grado de basicidad por lo que se puede proceder realizando extracciones selectivas a diferente pH.⁽¹⁸⁾

Técnicas habituales de laboratorio pueden ser separaciones en contracorriente y sobre todo el empleo de técnicas cromatográficas: cromatografía de capa

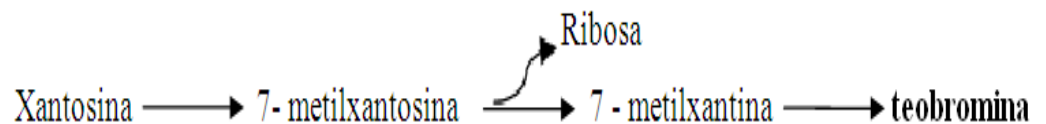
fina, sobre sílice o alúmina, cromatografía de filtración en gel con sephadex LH de diferente graduación, cromatografía de intercambio iónico, etc.⁽¹⁸⁾

2.6. Alcaloides Purínicos: Teobromina

Biogénesis. Los alcaloides derivados de bases purínicas como por ejemplo teobromina, cafeína y teofilina tienen un origen biosintético común.⁽³⁾ En la figura N° 03 se observa la ruta metabólica que sigue la formación de teobromina.

Estudios metabólicos amplios de los alcaloides Purínicos en la hoja de té (*Theasinensis*) y café (*Coffee arabica*) han permitido elucidar la biosíntesis de la teobromina con ciertos detalles según Misako K. *et al.* 1999

La disponibilidad de datos respalda las fases siguientes:⁽³⁾



En la figura N° 03, se observa que este recorrido es considerado como la ruta mayor para llegar a la síntesis de la teobromina.

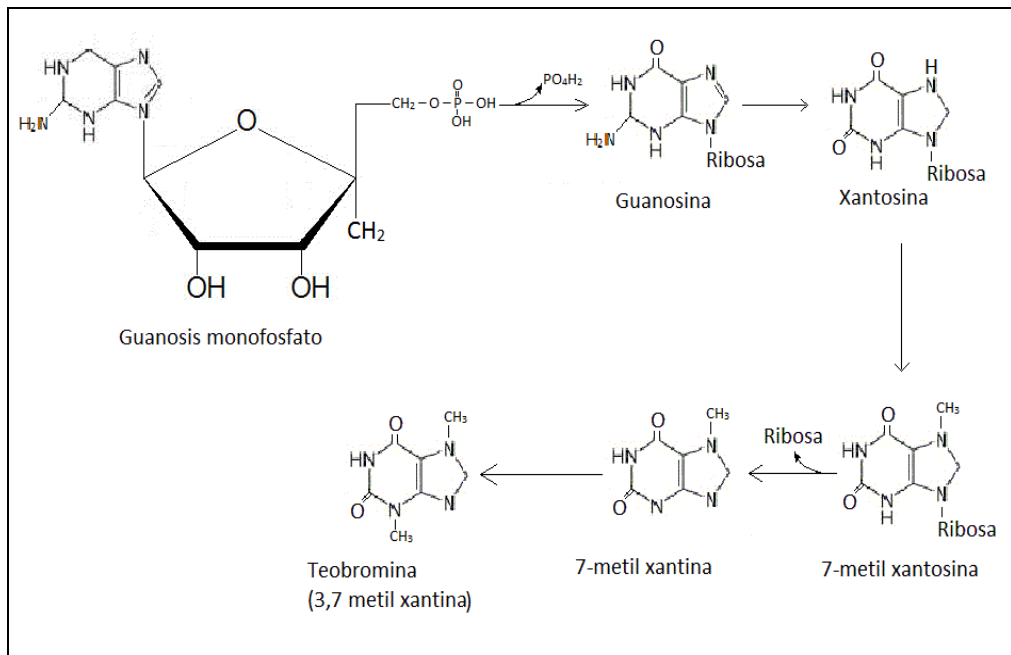


Fig. N° 03 Recorrido de la Síntesis de Teobromina.

Según Misako, K. *et al*, poco se conoce acerca de las propiedades de las enzimas que participan en la biosíntesis de la teobromina. El recorrido sigue dos etapas de metilación dependientes del S – adenosil metionina. Las N – metil transferasas cumplen un rol importantísimo; ejemplo, la xantina N – metil transferasa cataliza la formación de 7 – metil-xantosina a partir de xantosina de la que se sustrae la ribosa para dar lugar a la 7 – metil – xantina, luego por acción enzimática se muestra en posición 3 para dar lugar a la 3,7 dimetil - xantina o teobromina. ⁽³⁾

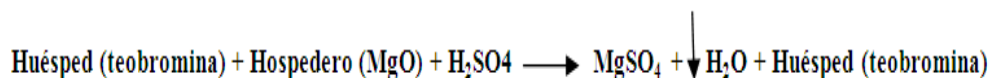
2.6.1. Método de Aislamiento de teobromina ó 3,7 dimetil- xantina

La teobromina dada sus particulares condiciones de no poder ser reconocida con reactivos generales para alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner, también tiene la particularidad de no ser fácilmente aislado por los métodos ácido y básico señalados.

Los alcaloides; teobromina, cafeína y teofilina son separados por el método de inclusión utilizado por Ikan R, y señalado por Harborne J.B. quien recomienda explicar este método para el aislamiento de cafeína pero también es utilizado para el aislamiento de teobromina.⁽²⁰⁾

En este caso a la sustancia que se va a separar; teobromina, se conoce como *huésped*, el adsorbente donde será retenida la solución se conoce como *hospedero*, a la estructura cristalina del hospedero se le denomina estroma en este caso el óxido de magnesio (MgO) que vamos a utilizar para separar la teobromina.

En los retículos cristalinos del *hospedero* se introducen las moléculas *huésped* de teobromina y solo pueden salir de esta cuando se le hace reaccionar con solución de ácido sulfúrico al 10%, produciéndose la reacción siguiente:



Al reaccionar el MgO con el H₂SO₄, se rompe el hospedero y deja libre al *huésped* (teobromina).

Después de producida la reacción, se filtra para separar el MgSO₄ formado, y el filtrado acuoso en el que está contenida la teobromina se extrae con cloroformo.

Se destila el cloroformo a presión reducida y se obtiene el *huésped* (teobromina). Mientras que la cafeína se disuelve en etanol, la teobromina es débilmente soluble en alcohol al 95% pero es soluble en solución de sustancias básicas (NaOH). Se puede cristalizar la teobromina tratando con una mezcla de alcohol absoluto y agua con la proporción: 10 ml y 90 ml de una solución acuosa de bicarbonato al 2%.

2.6.2. Prueba de Identificación de teobromina

Ninguno de los reactivos generales para alcaloides da positivo para cuando se trata de los alcaloides de naturaleza purínica a los que pertenece teobromina (alcaloide denominado “imperfecto”). Para determinar teobromina una vez aislada se disuelve una pequeña cantidad de cristales en 03 gotas de ácido nítrico concentrado, se evapora a sequedad en cápsula de porcelana, se añaden 02 gotas de hidróxido de amonio y da una coloración violeta.⁽²⁰⁾

Es posible determinar la teobromina aislada utilizando TLC sobre capas de sílica gel F₂₅₄, se aplica 3 microgramos disuelto en diclorometano utilizando como solvente de resolución benceno: acetona (30:70 vol.) se satura la cámara con Hidróxido de Amonio al 25%.

El valor para 3,7 dimetil – xantina es de $R_f \times 100 = 36$ ⁽²³⁾

2.7. Determinación de las propiedades Físicoquímicas y Espectrométricas de Teobromina

2.7.1. Pruebas Físicoquímicas

2.7.1.1. Punto de Fusión

Es una prueba importante en la elucidación de la estructura química de la sustancia en estado de pureza y solo se realiza con sustancias que se hallan en estado sólido.

En sustancias que se presumen conocidas, si se dispone de un patrón con el que se quiere comparar la sustancia aislada, se mezclan ambas sustancias, reduciéndolas a partículas muy finas, se colocan en el aparato de Thiele o en el equipo Fisher Johns. Si en el momento que funde no hay depresión en el punto de fusión de la muestra patrón, quiere decir que ambas sustancias son iguales. En otro caso se mide el punto de fusión de la muestra de prueba y se compara el valor obtenido con la literatura (Handbook of Chemistry and Physics CRC Press 1982). Si los valores son idénticos se asume que se trata de la misma sustancia.

2.7.1.2. Aparatos que miden el Punto de Fusión

Aparato de Thiele.- Es un recipiente en forma de una pistola en el que se introduce aceite mineral, luego un termómetro al que va adosado un tubo capilar que contiene la muestra cerca al bulbo del termómetro.

En la parte exterior se coloca otro termómetro paralelo al introducido en el Thiele, se calienta por la parte de abajo con mechero Bunsen a una velocidad de elevación de la temperatura de 1 a 2°C por minuto. Deberá observarse la temperatura a la cual la

sustancia prueba empieza a fundirse y aquella a la cual se licúa (T_1).

Estos valores se anotan como el intervalo del punto de fusión; también debe registrarse la temperatura que marca el termómetro exterior (T_2).

La corrección del vástago se calcula por la formula siguiente:

$$\text{Corrección} = + N (T_1 - T_2) \times 0.000154$$

Donde:

N = grados de la columnilla de mercurio arriba del nivel del baño de aceite.

T_1 = punto de fusión observado.

T_2 = temperatura promedio de la columnilla de mercurio.

El valor de corrección se añade al punto de fusión observado y éste es el punto de fusión corregido. ⁽²²⁾

En la actualidad se dispone de equipos modernos para determinar el punto de fusión, estos son: aparato Fisher Johns, aparato Nalge – Axelrod.

Aparato Fisher Johns.- Tiene una platina de aluminio que se calienta eléctricamente, provista de un termómetro que registra lecturas hasta de 300°C, la muestra se coloca entre dos cubre objetos de 18 mm en la depresión de la platina de aluminio, la temperatura se regula por medio de un transformador variable, y el punto de fusión se observa con ayuda de un foco de iluminación y una lupa.

Aparato Nalge – Axelrod.- Consiste en un microscopio de 25 aumentos que tiene insertado un filtro polaroide, una fuente de

iluminación, una platina de aluminio que se calienta mediante resistencia eléctrica y un termómetro que registra temperaturas de 400°C.

La muestra se coloca en dos cubreobjetos de 18 mm y se acomoda en la parte hueca de la platina, se enciende la luz y se enfoca el microscopio. El tubo se hace girar hasta que casi se crucen los filtros polaroides y se observa la fusión de los cristales a medida que se va elevando la temperatura. Si la sustancia se aisló es teobromina, el punto de fusión debe estar a 351 a 357°C.⁽²¹⁾

2.8. Solubilidad

- 1 g de teobromina se disuelve en 1.5 ml de agua.
- Débilmente soluble en alcohol.

2.9. Propiedad Organoléptica

Tiene ligero sabor amargo no persistente.

2.10. Prueba de Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Valor de Rf x 100

En placa de sílica gel F₂₅₄ (fase estacionaria) se aplica 3 microgramos de cristales de la sustancia aislada, como solvente de resolución se utiliza un solvente o mezcla de solventes (fase móvil) de benceno: acetona (30:70vol.); mediante la separación de componentes por efecto de una migración diferencial se deberá obtener un $R_f \times 100 = 36$.⁽²³⁾

2.11. Determinación del Peso Molecular por el Método de Rast

Cuando no se dispone de un espectrómetro de masas en el que se pueda determinar el peso molecular (ion padre) en caso de los fragmentos en que se divide la molécula, el peso molecular de una sustancia se procede a determinar con el clásico método de Rast por medio de la depresión del punto de fusión del D–alcanfor natural.⁽²²⁾

El procedimiento consiste en lo siguiente:

Se determina el peso de un tubo de ensayo pequeño (8 x 50 mm) limpio y seco. En el tubo de ensayo se coloca 50 mg del compuesto y se pesa en la balanza analítica, después se añade 500 mg de D–alcanfor natural y el tubo de ensayo se pesa nuevamente. El contenido del tubo de ensayo se funde en una llama muy pequeña hasta que se vuelva un líquido transparente.

Después que se enfríe, el contenido del tubo de ensayo se saca y coloca sobre una luna de reloj. El material se pulveriza y se determina su punto de fusión por el método de Thiele. Debe utilizarse un termómetro graduado hasta decimas de grado y con un intervalo de 130 hasta 180°C. Se toma la temperatura de fusión cuando la sustancia disuelta se vuelve transparente y sin presencia de fase sólida. Se determina el punto de fusión del D–alcanfor natural. La diferencia entre dos puntos de fusión de la depresión que es el punto de fusión del alcanfor, produjo el compuesto problema. El peso molecular se calcula con la fórmula siguiente:

$$M = \frac{39.7 \times W_1 \times 1000}{\Delta T \times W_2}$$

Donde:

W_1 = peso del compuesto problema

W_2 = peso del D-alcanfor

ΔT = depresión en el punto de fusión

39.7 = k , constante de depresión molar del D-alcanfor

2.12. Pruebas Espectrométricas

2.12.1. Espectrometría Ultravioleta Visible

La absorción en la región UV - visible del espectro depende de la estructura de la molécula que se estudia. Se limita a detectar sistemas conjugados que poseen una molécula como teobromina que tiene una conjugación formada por el grupo ceto (C = O) en posición 6 y el doble enlace C = C en las posiciones 4 y 5.

Un grupo C=O tiene dos pares de electrones no enlazantes (n). Bajo la acción de una radiación de luz n absorbe energía y promueve sus electrones de $\delta \rightarrow \delta^*$ y de $\pi \rightarrow \pi^*$.

Una banda $\pi \longrightarrow \pi^*$ debido al doble enlace carbono C=C

Una banda $n \longrightarrow \pi$ debido a los dos grupos ceto C=O

Con absorciones en el ultravioleta cercano, semejante a la cafeína.

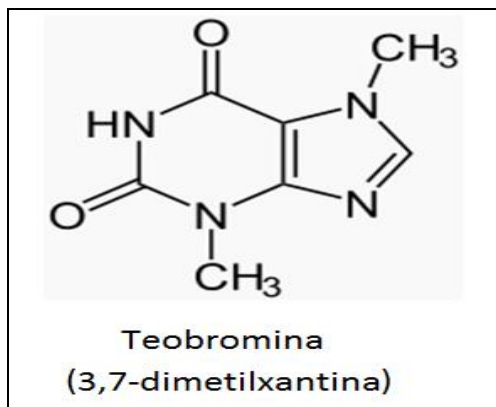


Fig. N° 04. Estructura química de Teobromina.

Todas las purinas tienen una banda de absorción intensa entre 250 y 290 nm.

Un espectrofotómetro UV – visible es un equipo que consta de una fuente de radiación para la región UV del espectro. Consiste en un tubo de descarga de hidrógeno que puede ser sustituido por una lámpara incandescente de tungsteno, un monocromador que dispersa la luz de la fuente en longitudes de onda separadas. Se usan prisma y redes de difracción. Un fotómetro donde la luz monocromática se transforma en luz pulsante por medio de un interruptor periódico para que los haces de la luz pasen al área de la muestra; aquí se colocan pequeñas celdas en la región más cercana al área del detector.

En el área de detección se registran los espectros en forma de longitud de onda versus transmitancia ya que la absorbancia A es igual a la recíproca de la transmitancia $1/T$. Las muestras a analizar son colocadas en celdas de cuarzo.

Cuando la muestra se disuelve en agua la longitud de onda debe ser igual a 275nm. Con lo que se evidencia que se trata de teobromina.

2.12.2. Fundamentos de la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

La espectrometría de resonancia magnética nuclear es una de las herramientas más útiles para determinar la estructura de moléculas orgánicas, da información acerca del número, tipo y conectividad de los átomos de hidrógeno y carbono.⁽¹⁴⁾

La técnica involucra la interacción (resonancia de energía y una fuente externa) con las propiedades magnéticas de un núcleo. Esto no produce una reacción nuclear o una reacción química. Ya que el material que se somete a la prueba puede ser recuperado sin que cambie sus propiedades.

El núcleo de un átomo cargado de partículas que rotan al igual que los electrones se considera que tienen un estado de spin. El núcleo puede ser comparado con las manecillas de reloj ya que gira idéntico a estas o contrarias, lo que se conoce como dos estados de spin ($\uparrow\downarrow$) las partículas cargadas que generan un campo magnético de spin. El campo magnético actúa igual que una pequeña barra magnética; semejante a las agujas de una brújula. Es una pequeña barra magnética que puede ser alineada con o contra un campo magnético externo B_0 . Ver figura 5.

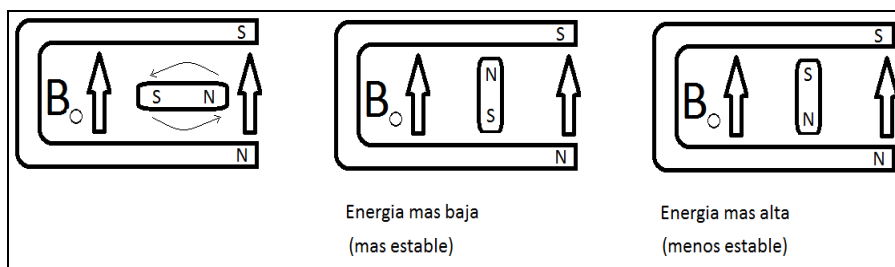


Fig. N° 05 Imán moviéndose a favor en un centro magnético externo.

Este mismo efecto se produce cuando se coloca un protón en un campo magnético externo. Según la mecánica cuántica se requiere que el momento magnético del protón se alíne bien en el mismo sentido del campo magnético externo o en sentido contrario al campo magnético externo.

Al estado de energía más bajo con el protón alineado al estado de energía más bajo con el campo externo, se conoce con el nombre de estado de spin alfa (α); al estado de energía más alta con el protón alineado en contra del campo magnético externo, se conoce con el nombre de spin beta (β).

La energía requerida para que el núcleo cambie la dirección de spin deberá ser exactamente la diferencia de energía entre los dos estados de spin. Ver figura N° 06.

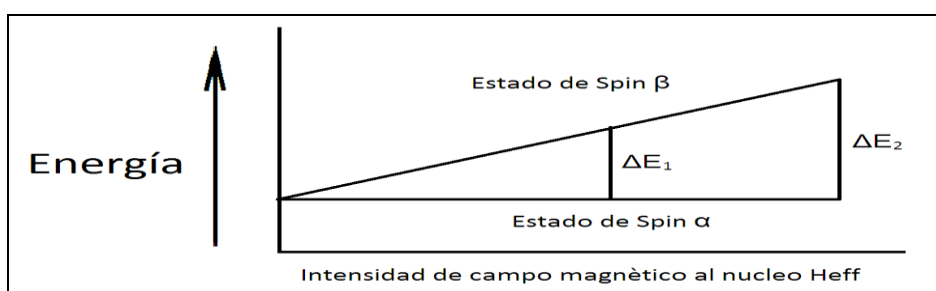


Fig. N° 06 Energía del cambio de Spin en función de la intensidad del campo magnético

2.12.3. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

El espectrómetro es diseñado para tomar ventajas de las propiedades magnéticas del núcleo.

Contiene un magneto muy fuerte. En el centro del magneto una electro bobina enrollada suministra energía en el rango de radio frecuencia del espectro electromagnético.

La energía ε de un fotón de radiación electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia (ν), de modo que:

$$\varepsilon = h\nu = \frac{h}{2\pi} B_0$$

Donde:

h = Constante de Planck = 6.626×10^{-27} erg x seg.

π = Constante giro magnético.

El núcleo absorbe energía en este rango de radio frecuencia y cambia del estado de spin alfa más estable al más alto estado de energía spin beta; de otro lado, la electro bobina capta cuando la muestra se introduce en su interior (absorbe energía) y también cuando la energía es liberada al retornar el núcleo del estado de spin beta al estado de spin alfa y hallarse en un estado de equilibrio $\alpha - \beta$ donde el equilibrio se haya restablecido.

Esta información de cambio de energía es enviada a una computadora y analizada luego pasa a una registradora.

La registradora imprime el espectro de la muestra dando información acerca del número, tipo y conectividad de H^+ y de $C-13$.⁽¹⁴⁾

La diferencia de energía entre dos estados de spin de un protón es pequeña. Para un campo magnético externo intenso debe ser de 25,000 Gauss equivalente a 2.5 teslas; esta diferencia de energía es solo de aproximadamente 10^{-5} Kcal/mol (4×10^{-5} KJ/mol). Esta pequeña energía es detectada por resonancia magnética nuclear.

Los espectrómetros de resonancia magnética nuclear suelen incorporar imanes muy poderosos de forma que ΔE sea lo mayor posible y que sea fácilmente detectable. La radio frecuencia que se necesita para la resonancia se calcula en base a la intensidad del campo externo con el que se trabaja. En el pasado la frecuencia de los espectrómetros solían ser de 60 MHz que corresponde a un campo magnético de 14,092 Gauss. Los espectrómetros de resolución más alta operan a frecuencias de 100 y 300 MHz que corresponden a campos de 23,486 y 70,459 Gauss, respectivamente. Actualmente existen espectrómetros de campo alto de 400, 500, 600, 800 y 900 MHz. Están en fase experimental espectrómetros que trabajan a un Giga.

Cuando los protones de los compuestos no están aislados se rodean de electrones que lo apantallan parcialmente del campo magnético externo. Los electrones circulan en torno a los núcleos y generan un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo externo aplicado.

En una molécula la nube de electrones que hay alrededor de cada núcleo actúa como un espiral metálico rotando en función del campo externo; esta rotación inducida es una corriente circular cuyo campo magnético se opone al campo externo: el resultado es que el campo magnético en el núcleo es más débil que el campo externo y se dice que el núcleo esta apantallado.

A 300 MHz por ejemplo, el protón aislado desapantallado absorbe a 70,459 Gauss, pero un protón apantallado requiere un campo más intenso. Los protones con entornos químicos diferentes están apantallados de manera desigual; en el metanol por ejemplo, el átomo electromagnético del oxígeno hace que la densidad electrónica alrededor del protón del grupo oxhidrilo disminuya. El protón oxhidrilo no está tan apantallado con los protones del grupo metilo por lo que los protones del grupo oxhidrilo absorben a un campo más bajo que los protones del metilo aunque todavía a un campo más alto que los

protones aislados; se dice que el protón oxhidrilo está algo desapantallado por la presencia del átomo de oxígeno electronegativo.

Debido a las estructuras diversas y complejas de las moléculas orgánicas, los efectos de apantallamiento de los electrones en varias posiciones son generalmente diferentes. La medida cuidadosa de la intensidad de campo requerido por la resonancia de varios protones en una molécula, proporciona dos clases de información importante:

- a. El número de absorciones diferentes, también llamado señales o picos, indica cuántos tipos de protones están presentes.
- b. El grado de apantallamiento mostrado por esas absorciones indica la densidad electrónica de la molécula próxima a cada tipo de protón. Otros dos aspectos de la resonancia magnética nuclear que se consideran, son las intensidades de las señales y sus modelos de desdoblamiento.
- c. Las intensidades de las señales son un indicador de cuántos protones de cada tipo están presentes.
- d. Los desdoblamientos de las señales dan información sobre los protones próximos.

La medida de los desplazamientos químicos en resonancia magnética nuclear es importante debido al apantallamiento y desapantallamiento electrónico que se conoce con este nombre.

El desplazamiento químico es la diferencia en partes por millón entre la frecuencia de resonancia del protón observado y del tetrametilsilano (TMS) que se utiliza como referencia interna. En la práctica, para distinguir los protones individuales es difícil medir con precisión el campo absoluto donde el protón absorbe, debido a que las señales suelen diferenciarse en solo unas milésimas de Gauss a un campo aplicado de 70,459 Gauss. Un método más preciso para expresar el

desplazamiento químico es determinar el valor relativo con referencia a un compuesto que se añade a la muestra (referencia interna). La diferencia entre la intensidad del campo magnético necesario para la resonancia de los protones de la muestra y los protones de la referencia, se pueden medir con mucha precisión.

El compuesto de referencia que más se utiliza en Resonancia Magnética Nuclear es el $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS). Como el silicio es menos electronegativo que el carbono los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones y estos protones están muy apantallados. Los protones TMS absorben a intensidades de campo más altos que la mayoría de los hidrógenos enlazados al carbono u otros elementos, por lo que las señales de una muestra de resonancia magnética nuclear aparecen a campo bajo (hacia la izquierda) de la señal del TMS.

Los doce protones del TMS absorben al mismo valor de campo magnético aplicado ya que todos son equivalentes por lo que dan una sola absorción interna (un solo pico) en el espectro.

Se añade una pequeña cantidad de TMS a la muestra y el aparato mide la diferencia de campo magnético entre la absorción de los protones de la muestra y la absorción de los protones del TMS. Para cada tipo de protón de la muestra, la distancia al campo bajo del TMS es el desplazamiento químico del protón. Los desplazamientos químicos δ (delta) se miden en partes por millón (ppm), fracción adimensional del campo total aplicado.

Por costumbre, la distancia en el espectro de resonancia magnética nuclear entre las señales (diferencia de campo o de desplazamiento químico) de un protón, y del TMS no se mide en Gauss sino en unidades de frecuencia (Hertzios) porque las unidades de frecuencia y las unidades de campo magnético son siempre proporcionales.

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

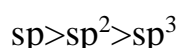
El eje horizontal del espectro de resonancia magnética nuclear está calibrado en Hertzios.

$$x = \frac{\text{Desplazamiento a campo bajo respecto a TMS(Hz)}}{\text{Frecuencia total del espectrómetro (MHz)}}$$

El hecho de utilizar desplazamientos químicos para describir las absorciones estandariza los valores para todos los espectrómetros.⁽²²⁾

La hibridización es un aspecto que debe ser tenido en cuenta en resonancia magnética nuclear. La mayoría de protones en compuestos orgánicos están utilizados por átomos de carbono. La electronegatividad de los átomos de carbono varía en función de su hibridización.

Los átomos de carbono que son hibridizados como sp son más electronegativos que sp² y átomos de carbono hibridizados sp² son más electronegativos que sp³.⁽²⁾



2.12.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones

Un protón por diferenciación es un átomo de hidrógeno sin un electrón (H⁺). Los protones en resonancia magnética estudian los átomos de hidrógeno covalentemente enlazados a otro átomo generalmente carbono; no es el estudio de protones libres. Sin embargo, las discusiones de resonancia magnética nuclear utilizan los términos protón y átomo de hidrógeno intercambiable.⁽²²⁾

Para que la resonancia magnética nuclear tenga validez como una herramienta de diagnóstico, los protones en diferentes ambientes químicos necesitan absorber (resonar) radio-ondas a diferentes frecuencias.

El núcleo de un átomo de hidrógeno está rodeado por una nube electrónica (densidad del electrón). El campo magnético externo produce una fuerza (torque) sobre el electrón causándole que genere un campo magnético (H local) que se opone al campo magnético externo H_0 .

La densidad del electrón alrededor del núcleo de hidrógeno es diferente para protones que existen en diferentes ambientes químicos.

La densidad del electrón varía el campo magnético filtrado; por un núcleo de hidrógeno también varía ($H_{\text{eff}} = H_0 - H$ local).

Si el campo magnético producido por los cambios del núcleo cambia, la frecuencia a la cual la radiación es absorbida también cambia. La frecuencia a la cual la radiación es absorbida da información acerca del ambiente químico de los protones responsables de estas absorciones.

Protones en diferentes ambientes químicos son llamados protones no equivalentes. Ellos absorben radiación a frecuencias levemente diferentes medidas en Mega Hertzios (MHz); todos los protones del TMS están en un ambiente químico idéntico y son llamados protones equivalentes; todos ellos absorben radiación a la misma frecuencia.⁽²³⁾

2.12.5. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de C-13

La identificación de un compuesto es obtenido analizando un espectro de C-13 en adición a un espectro de protones. Hay varias diferencias

entre espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de C-13 y el de protones.

La energía para que el spin cambie de dirección (transmisión $\alpha \rightarrow \beta$) ocurre a diferente frecuencia (Energía).

Las señales de la espectroscopia de C-13 no aparecen en las del espectro de protones.

El desplazamiento químico de protones ocurre en un rango de 0 a 10 ppm, mientras que el rango del espectro de C-13 es de 0 a 220 ppm; esto constituye una ventaja debido a que la absorción de C-13 presenta un rango más amplio que la adsorción de protones, lo que permite una lectura más fácil (Figura N° 06) pues indica cómo están distribuidos los desplazamientos para el C-13 en función de las estructuras sp, sp² y sp³; también hay menos oportunidad de hallar picos de traslapamiento no equivalentes.⁽²⁴⁾

Cuando las multipletas se traslapan es difícil determinar cuál pico pertenece a cada multiplete de traslapamiento. El rango aproximado de los desplazamientos químicos de los átomos de carbono no equivalentes es como se muestra en la figura N° 07.

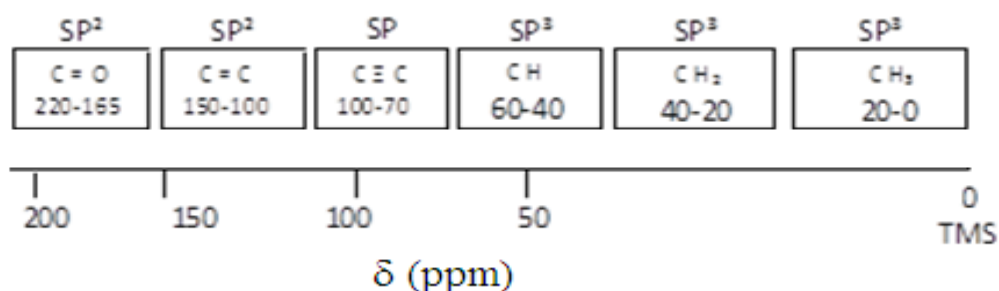


Fig. N° 07. Valores de desplazamientos químicos aproximados de RMN de C-13 (δ en ppm).

2.13. Elucidación Estructural del Compuesto Aislado

Para la elucidación de la estructura química de la teobromina se utilizarán los métodos fisicoquímicos siguientes:

- Punto de fusión.
- Valor de $R_f \times 100$ (TCL).
- Determinación del peso molecular por el método de Rast.

Así como los métodos espectrométricos siguientes:

- Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN $-H^+$)
- Resonancia Magnética Nuclear de Carbono - 13 (RMN C-13)

2.14. Variables Operacionales

Titulo temático: Aislamiento y elucidación estructural de teobromina de semilla de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) por métodos fisicoquímicos y espectrométricos, Iquitos 2014.

2.14.1. Variable Independiente

Aislamiento de teobromina de semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal)

2.14.2. Variable Dependiente

Elucidación estructural de teobromina por métodos fisicoquímicos y espectrométricos.

2.14. Operacionalización de Variables

2.14.1. Variable Independiente

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo y Escala de Variable	Índice
Aislamiento de teobromina en semillas de <i>Theobroma subincanum</i> Mart. (Cacao del Varillal).	<i>Theobroma subincanum</i> Mart. (Cacao del Varillal) es una especie de cacao silvestre sin uso conocido a pesar de tener las mismas características morfológicas del cacao y poseer los arilos de sabor dulce y ácido como el cacao, poseen semillas de color púrpura semejante al cacao y tener un cierto sabor amargo cuando se mastica la semilla y al tostar el olor que emana es agradable semejante al cacao. No se ha reportado presencia de teobromina en esta planta pero las pruebas que realizamos arrojan resultados positivos que queremos confirmar luego de obtener la teobromina.	Recolectado el fruto se quitará las semillas, se llevará para quitar el arilo, luego se secará la semilla y se llevará a molida de la cual se tomará 95 g para desengrasarla en equipo de Soxhlet con éter de petróleo el proceso se realizará por 120 horas. El desengrasado se extraerá con una solución de NaOH al 10 % (2 g de NaOH en 200 ml de agua) calentándolo en baño de arena a 45°C se concentrará en baño de arena a 1/5 de su volumen, esta solución se verterá sobre 50 g de óxido de magnesio que incluirá selectivamente a la teobromina en sus retículos cristalinos para liberar la teobromina se tratará con H ₂ SO ₄ al 10% y se extraerá la teobromina con cloroformo luego se procederá a su cristalización.	Teobromina pura en forma de agujas blancas.	Rendimiento de teobromina aislada.	Producto sólido cristalino.

2.14.2. Variable Dependiente

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo y Escala de Variable	Índice
Elucidación estructural de teobromina por métodos fisicoquímicos y espectrométricos .	Para verificar si la sustancia aislada de las semillas de <i>Theobroma subincanum Mart.</i> (Cacao del Varillal) Es el alcaloide purínico conocido como teobromina es necesario elucidar la estructura del compuesto utilizando métodos fisicoquímicos tales como; punto de fusión, Rf x 100 en TLC, peso molecular por el método de Rast y por ultimo realizar las pruebas espectrométricas de resonancia magnética nuclear de protones y de C-13.	A los cristales puros se les determina el punto de fusión en el aparato Kisatom (Nalge – Axelrod) se somete a prueba cromatográfica de capa fina en placa de sílica gel F ₂₅₄ corriendo en una mezcla de benceno :acetona (30 :70 vol.); si el volumen de Rf x 100 es igual a 36, comparado con el valor de la literatura se trata de teobromina. Si sometido a las pruebas de resonancia magnética nuclear de H ⁺ y de C – 13 tiene desplazamiento según la intención de los protones y de C-13 se trata de teobromina.	Prueba de punto de fusión, pruebas para detectar el peso molecular, pruebas de TLC, valor Rf x 100, pruebas de resonancia magnética nuclear y desplazamiento químico de protones (H ⁺) y de C-13.	Grados centígrados, g/mol, Razón de corrida del soluto sobre el solvente, desplazamiento en (ppm).	Pureza del producto analizado. Solvente de disolución.

2.15. Hipótesis

Es posible el aislamiento y elucidación estructural de teobromina de semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), por métodos fisicoquímicos y espectrométricos.

CAPÍTULO III.

3.1 METODOLOGIA

El tipo de estudio que realizamos se inscribe en el marco de una investigación descriptiva por que realiza un análisis de la semilla de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), se interesa en determinar la presencia de teobromina en esta especie vegetal del mismo género del cacao (*Theobroma cacao*) pero de diferente especie, estableciendo diferencias en cuanto al contenido de teobromina en el Cacao y el Cacao del Varillal.

Desde el punto de vista de la diferenciación entre investigación científica e investigación tecnológica esta se inscribe en el marco de una investigación tecnológica por que tiene el propósito de lograr conocer la ocurrencia de teobromina en esta especie vegetal por darle igual aplicación práctica que a la teobromina obtenida de cacao o por el método de síntesis cuyo máximo propósito es su utilización en la industria farmacéutica como estimulante, diurético y que posee actividad en la contractilidad del miocardio, produciendo estimulación del simpático con simulación de la actividad simpática mimética. ⁽¹⁹⁾

3.2. Diseño de la Investigación

Consiste en señalar todas las transformaciones que tuvieron lugar desde la selección de una población vegetal de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), toma de la muestra, clasificación botánica, criterios para seleccionar la muestra, empleo de métodos y técnicas del procesamiento de estudio en el laboratorio como parte su aislamiento seguido de la elucidación de la estructura química por métodos fisicoquímicos y espectrométricos.

3.3. Población y Muestra

3.3.1. Población

El trabajo de campo consistió en encontrar un rodal de árboles de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) en el km 16 de la carretera Iquitos –Nauta a 30 minutos de la ciudad de Iquitos, comprensión del distrito de San Juan Bautista, se localizó 30 árboles en una extensión de 500 m².

3.3.2. Muestra

Los árboles se encontraron en plena fructificación, aleatoriamente se tomó 10 mazorcas maduras (fruto maduro), cada mazorca posee 40 semillas, en total 400 semillas, se recolectaron una rama con hojas y fruto para ser identificados en el Herbarium Amazonense de la UNAP, la identificación botánica se halla contenido en el Anexo.

3.3.3. Criterios de Inclusión

Frutos maduros sanos y de mayor tamaño.

Hojas con flores y frutos para la identificación botánica.

3.3.4. Criterios de Exclusión

Se descartaron frutos con invasión de plagas (*Phytophthorasp.*).

Se descartaron hojas agujeradas y con ataque de tizón (hongo de la descomposición).

3.4. Procesamiento de Laboratorio

3.4.1. Etapas

3.4.1.1. Quebrantado de Mazorcas

Se romperán las mazorcas maduras golpeándolos con un Martillo y de 10 mazorcas de obtendrán 400 semillas.

3.4.1.2. Despojo del Arilo

Arilo es la sustancia dulce – ácida y gomosa que recubre la semilla, se quita el arilo lavando las semillas con arena blanca, se agrega abundante agua y luego se filtra en un colador.

3.4.1.3. Secado y molienda de semillas

Las semillas se secaron sobre papel despacho a temperatura ambiente por espacio de 15 días. Luego se pesó 200 g y se molió en molino de disco, se tomó 95 g de la muestra para el estudio.

3.4.1.4. Desengrasado

Se realizó en equipo de soxhlet, se prepararon dos cartuchos de papel filtro whatman # 3, en uno de ellos se introdujo 50 g y en el otro 45 g de muestra, se selló correctamente y se introdujo en el vaso del soxhlet, luego se armó el equipo que consta de un envase de alimentación y a la vez colector del solvente de desengrase, a este colector se incorpora el vaso de soxhlet en cuyo interior se introduce el cartucho y consta de unos tubos de reflujo por donde circula el solvente (éter de petróleo), se incorpora el refrigerante de reflujo que tiene orificios de entrada

y salida de agua de refrigeración, el equipo además consta de una batería calentamiento que eleva la temperatura al punto de ebullición del éter de petróleo (40 – 60 °C) el equipo funcionará automáticamente después de su montaje por el tiempo necesario hasta que se agote el contenido de grasa en la muestra.

Se trabajó desengrasando las semillas molidas por espacio de 120 horas después de este tiempo se desmonta el equipo.

3.4.1.5. Maceración

Se maceró la muestra desengrasada equivalente a 95 g en 250 ml. de una solución de NaOH al 10% (2 g de NaOH en 200 ml de agua) calentándolo en baño de arena a 45 °C en un sistema de reflujo que consta de un balón de 500 ml de base esmerilado al que se le incorpora un serpentín de reflujo para extraer la teobromina.

3.4.1.6. Filtrado

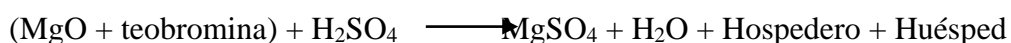
Se filtró en embudo de buchner que lleva incorporado una bomba de vacío de 0.1 militorricellis.

3.4.1.7. Inclusión

Se toma 50 g de óxido de magnesio (MgO) en el vaso de precipitado de 500 ml. y se vierte 200 ml. del filtrado; la estructura de la molécula del óxido de magnesio contiene porosidades donde selectivamente son atrapados las moléculas de teobromina.

El óxido de magnesio forma una red estromática que cumple el papel de *hospedero* mientras la teobromina hace el papel de *huésped* que queda retenido en las porosidades del hospedero.

Se seca la mezcla de MgO – teobromina, liberándolo del agua de baño de arena a 45°C luego con una solución de ácido sulfúrico al 10% (36.8 g de H₂SO₄ en 200 ml. de agua) se rompe la red estromática que retiene a la teobromina dejándolo libre de acuerdo con la reacción siguiente:



Reacción (I)

3.4.1.8. Aislamiento de Teobromina

Mediante la reacción (I) se forma sulfato de magnesio y la teobromina se halla en la solución acuosa, es decir el producto de la reacción (I) es la siguiente:



Se filtra el producto de la reacción en papel de filtro, queda retenido en el papel el sulfato de magnesio, mientras la teobromina atraviesa el papel filtro, se adiciona hidróxido de sodio al 10%, el filtrado se lleva a una pera de decantación y se extrae con cloroformo y la teobromina se separa con el cloroformo formando dos fases, se desecha la fase acuosa y la solución con cloroformo se destila en un equipo de rotavapor, la teobromina se obtiene de forma impura.

3.4.1.9. Cristalización

Se disuelve la teobromina con agua caliente en medio alcalino con NaOH al 10%, luego se adiciona norita (carbón activado), se calienta y se filtra, luego se vuelve a calentar y otra vez se vuelve a filtrar para quitar todo el carbón activado, luego se deja en reposo y el precipitado es un polvo blanco cristalino.

3.5. Evaluación del Rendimiento

De 95 g de muestra se obtuvo 1.27 g de teobromina cristalina.

$$\% \text{ de rendimiento de teobromina} = \frac{\text{peso de cristales aislados} \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ de rendimiento de teobromina} = \frac{1.27 \text{ g} \times 100}{95 \text{ g}}$$

$$\% \text{ de rendimiento de teobromina} = 1.34$$

3.6. Elucidación de la estructura química de la sustancia aislada

La estructura química de la sustancia aislada se ha comprobado utilizando pruebas fisicoquímicas y espectrométricas.

3.7. Pruebas Fisicoquímicas

3.7.1. Punto de Fusión

Se determina en el equipo Kistom, una modificación del equipo Nalge– Axelrod se obtuvo el valor de 351.8 °C que comparado con el valor de la literatura; se encuentra dentro del rango establecido.⁽¹⁶⁾

3.7.2. Cromatografía de Capa Fina

Se tomó 3 microgramos de la sustancia y se aplicó sobre la placa (cromatofolio de 3 cm X 20 cm) de sílica gel F254 en una solución de diclorometano, se corrió el cromatofolio en una mezcla de benceno:acetona (30:70vol.) en la cámara cromatográfica debidamente saturada se obtiene el valor de $R_f \times 100 = 36$; comparado con el valor de la literatura el resultado es idéntico. ⁽²¹⁾

$$R_f \times 100 = \frac{\text{Distancia de recorrido} \times 100}{\text{Frente del solvente}}$$

$$R_f \times 100 = \frac{5.04 \times 100}{14}$$

$$R_f \times 100 = 36 \text{ (valor experimental)}$$

3.7.3. Determinación del Peso Molecular por el Método de Rast

Se mezcló 500 mg de alcanfor con 50 mg de la muestra aislada, la diferencia de temperatura ΔT que es la disposición en el punto de fusión fue medido en el aparato de Kisatom el peso molecular fue obtenido con los datos siguientes:

$\Delta T = \text{Pto de fusión del Alcanfor} - \text{Pto de fusión de la mezcla Alcanfor + muestra problema}$

Pto de fusión del Alcanfor = 176

$\Delta T = 176 - 154 = 22$

$$\text{Peso molecular} = \frac{39.7 \times 0.05 \times 100}{22 \times 0.5}$$

$$\text{Peso molecular} = \frac{1985}{11}$$

$$\text{Peso molecular} = 180.45 \text{ g/mol}$$

Comprobado este valor de 180.45 g/mol con el de la literatura de 180.15 g/mol, ambos valores son similares y calculamos el % de error con la siguiente formula:

$$\% \text{ de error} = \frac{\text{valor experimental} - \text{valor teorico}}{\text{valor experimental}} \times 100$$

$$\% \text{ de error} = \frac{180.45 - 180.18}{180.45} \times 100$$

$$\% \text{ de error} = \frac{27}{180.45}$$

$$\% \text{ de error} = 0.15$$

El porcentaje de 0.15 es casi insignificativo, en consecuencia se trata de la misma sustancia.

3.8. Pruebas Espectrométricas para la Elucidación de la Estructura Química

3.8.1. Espectrometría UV –Visible

30 microgramos de la muestra se disolvió en agua a pH 7, se corrió en un aparato de espectroscopia de UV – Visible Génesis VI de la facultad de Ingeniera Química de la UNAP que no posee registrador aritmético pero en la pantalla se observa la gráfica se observa un valor de λ máx. de 275nm. (Ver figura N° 08).

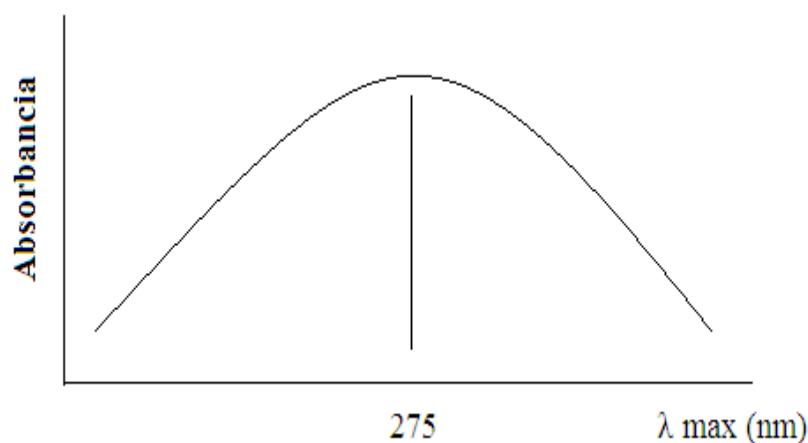


Fig. N° 08. Espectro UV – Visible de teobromina

3.8.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones

Esta prueba se realizó en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad católica del Perú, sección química, Facultad de Ciencias e Ingeniería en un espectrómetro Bruker AC – 300 (300.13 MHz), para correr el espectro se preparó una solución con 5 mg de cristales de la muestra, se diluyó en D₂O (agua deuterada) y se realizó en total 16 adquisiciones utilizando un pulso de 2.70 microsegundos y un ancho espectral (SW = 6,024.10 Hz) de 20.07 ppm, la lectura e interpretación de las señales del espectro de RMN H⁺ se hace en el capítulo IV.

3.8.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono – 13

El espectro de Carbono - 13 se obtuvo en la Pontificia Universidad Católica del Perú, preparando 20 mg de la muestra en D₂O (agua deuterada), se realizó un total de 20,600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y un ancho espectral de 245.38 ppm (SW = 1,858.52 Hz) en el espectrómetro Bruker AC - 300 de 75.47 MHz para núcleos de Carbono – 13, en el capítulo IV se hace la interpretación de los desplazamientos y señales.

3.9. Equipos, Materiales y Reactivos

3.9.1. Equipos y Materiales

- Batería Soxhlet
- Molino de disco
- Rotavapor Buchi R – 300
- Balanza analítica
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear – Bruker AC – 300 de la PUCP.
- Aparato de Kisatom para medir el p. f.
- Estufa Menmert
- Bomba de vacío General Electric 0.1 militorricellis

3.9.2. Materiales de Vidrio

- Pera de decantación
- Balones de vidrio
- Embudo
- Vaso de precipitado de 50, 100, 200 y 500 ml.
- Luna de reloj
- Capilares

3.9.3. Materiales de Metal

- Soporte universal
- Espátulas
- Pinza de Moore

3.9.4. Materiales de Porcelana

- Embudo Buchner

3.9.5. Material de Filtración

- Algodón
- Papel de filtro

3.9.6. Reactivos

- Ácido sulfúrico
- Óxido de magnesio
- Éter de petróleo
- Cloroformo
- Ácido nítrico
- Hidróxido de amonio
- D – Alcanfor

3.9.7. Material Cromatográfico

- Placas cromatográficas (cromatofolio)

CAPÍTULO IV.

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Rendimiento de Teobromina Aislada de Semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal)

Peso de los Cristales = 1.27 g

Peso de la muestra empleada = 95 g

$$\% \text{ Rendimiento de la teobromina aislada} = \frac{\text{peso de los cristales}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento de la teobromina aislada} = \frac{1.27 \text{ g}}{95 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento de la teobromina aislada} = 1,34 \%$$

4.1.2. Resultados de las Pruebas Fisicoquímicas

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS									
Peso Molecular		Punto de fusión		Color		Forma de Cristal en agua		Rf x 100 (TLC)	
Valor de Literatura	Valor Experimental	Valor de Literatura	Valor Experimental	Valor de Literatura	Valor Experimental	Valor de Literatura	Valor Experimental	Valor de Literatura	Valor Experimental
180.18 g/mol	180.45 g/mol	351 - 357 °C	351.80°C	Blanco	Blanco	Agujas	Agujas	36	36

4.1.3. Resultados de las Pruebas Espectrométricas para la Identificación de Teobromina

4.1.3.1. Prueba de Espectroscopia UV – Visible

λ máx. Literatura en nm	λ máx. Valor experimental en nm
275	275

4.1.3.2. Prueba de Resonancia Magnética Nuclear

4.1.3.2.1. Prueba de Resonancia Magnética Nuclear de Protones en un Equipo Bruker AC – 300 (300.15 MHz)

En la figura N° 09 (ver anexo) a δ 3.301, se observa el singlete de un protón solitario correspondiente al grupo metino del imidazol a δ 3.769 ppm se halla un singlete correspondiente al grupo imino de la pirimidina.

El valor de δ 4.697 ppm corresponde al disolvente que se usó como solvente para diluir la teobromina.

El ΔJ a 7.18 ppm y ΔJ a 3.39 y ΔJ 1.00 corresponden al acoplamiento de la heteromolécula (heteroaromática) piperidone - imidazol.

4.1.3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono – 13

En el espectro de RMNdeC-13 se observa un desplazamiento a 159.53 ppm correspondiente a una estructura C = O sp^2 en posición 2.

A un desplazamiento a 142.97 ppm se observa la interacción del grupo C = C sp^2 en posición 4 y 5.

A 130.86 se observa un desplazamiento correspondiente al grupo C = O en posición 2 de estructura sp^2 .

A 33.27 ppm el desplazamiento corresponde al de un carbono del metilo sustituyente en posición 7.

A 29.00 ppm se observa un desplazamiento del carbono sp^3 del grupo metilo sustituyente en posición 3.

Los desplazamientos a 119.27 y 116.17 ppm están referidos a las interacciones del grupo C = C sp^2 en la heteromolécula piperidone – imidazol.

4.2. DISCUSIÓN

El aislamiento experimental empleando el método de adsorción selectiva con óxido de magnesio (MgO), es específico para la obtención de alcaloides derivados de la xantina; cafeína, teobromina y teofilina. No pueden emplearse los métodos utilizando reactivos ácidos o básicos, en consecuencia el alcaloide obtenido de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), solo puede deberse a cualquiera de estos tres alcaloides, para la cual se procedió a realizar la Cromatografía de capa fina (TLC) siguiendo las recomendaciones de Stahl – Egon⁽²³⁾, y se procedió tal como se describió en el inciso (3.7.2.).

Por cromatografía de capa fina en una placa de sílica gel F₂₅₄, se disolvió 3 microgramos de la sustancia, utilizando como disolvente al diclorometano y se corrió en una mezcla de benceno: acetona (30:70vol.) el valor R_f x 100 fue de 36; que es coincidente con el valor de la literatura que es similar a 36.⁽²³⁾

El punto de fusión de 351.80°C; medido en el equipo de Kisatom del laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química, que no es más que una modificación del clásico equipo de Nalge – Axelrod, es similar al valor comparado con el de la literatura⁽¹⁶⁾ que comprende a la teobromina.

El valor λ máx. de una muestra de la sustancia disuelta en metanol y medido en un aparato de espectrometría UV – Visible Génesis VI del laboratorio de Análisis por Instrumentación de la facultad de Ingeniería Química de la UNAP, es de 275 nm tan similar comparado al valor de la literatura.⁽²³⁾

La lectura de espectro de Resonancia magnética Nuclear de protones se realizó comparando los valores de desplazamiento en ppm de la sustancia consultando el libro “Tabla para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por métodos Espectrométricos”.⁽²⁶⁾

La lectura del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 muestra el desplazamiento correspondiente a 2 grupos carbonilos en posición

2 y 6 y los sustituyentes metilínicos en posición 3 y 7 de la heteromolécula, característica principal de la 3,7 dimetil - xantina o teobromina.

Resultado sumamente valioso para el aislamiento de teobromina emplearse el método propuesto por Harbone;⁽²⁰⁾ en su obra “Phytochemical Methods” que utilizado convenientemente muestra su especificidad en cuanto al aislamiento de alcaloides derivados de la xantina.

4.3. CONCLUSIÓN

De *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) de la familia *esterculiácea* se aisló y caracterizo utilizando métodos fisicoquímicos y espectrométricos; la teobromina, un alcaloide derivado de la xantina de importancia farmacológica.

Con este hallazgo *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) se constituye en una fuente complementaria de teobromina que se encuentra en *Theobroma cacao* (Cacao), cuyo contenido es variable según el lugar de procedencia, nuestro estudio ha logrado determinar un rendimiento de 1,34% de teobromina en *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal).

Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal) y *Theobroma cacao* (Cacao) tienen una relación de parentesco en cuanto a filogenia, es la razón por la que *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) también puede sintetizar teobromina.

Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal), por ser una especie vegetal que crece en el bosque asociada en habitad con otras plantas, es más resistente a plagas que *Theobroma cacao* (Cacao) que se siembra como monocultivo, es posible obtener una hibridización entre ambas mediante trabajos de fito mejoramiento genético.

4.4. RECOMENDACIONES

Se debe considerar a *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal) como fuente complementaria para la obtención de teobromina para la industria farmacéutica ya que a la actualidad es una especie marginal sin uso conocido e ignorado frente a *Theobroma cacao* (Cacao).

Se debe promover su cultivo sustentable observando a las plantas frente a las cuales crece en el bosque.

La facultad de agronomía de la UNAP debe estudiar esta planta silvestre para buscar el hábitad adecuado de cultivo y lograr su propagación y mejoramiento.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Handbook Physics and Chemistry. Editors Press. (U.S.A.). 1982
2. Winnaeker, K; Weingaertner, E. Tecnología Química. Editores Galisa. España; 2001. p. 102-112.
3. Misako, K; Kouichi, M; Mazanori, I; Masachika, I; Crozier, A; Iroshi, A. Plant Physiology. Vol. 120, American Chemycal Society of Plants Physiologist. U.S.A. 1999. p. 579 - 586.
4. Marco, A. Química de los Productos Naturales. Editorial España. 2006. p. 230.
5. Trease, E. Farmacognosia. Editores Interamericana Mc Graw Hill. México. 1991. p. 48.
6. Bruni, R. Composición lipídica de semillas de *Theobroma subincanum* Mart. en la región salvaje ecuatorial y la comparación con dos variedades de *Theobroma cacao*. J Agric Food Chem. 2000 Mar;48 (3):691-4.
7. Médici, A. Tocoferol, ácidos grasos y esteroides en semillas de *Theobroma subincanum* Mart. en la región salvaje ecuatoriana. Food Chemistry (Impact Factor: 3.33). 06/2002; 77(3):337-341.
8. **González, C.** Contribuciones al conocimiento de *Theobroma subincanum* *Martius* (macambillo) frutal nativo de gran potencial en la Amazonía peruana. 2009. Torres editores. Contribuciones al conocimiento de frutales nativos amazónicos. Inst. de Inv. de la Amaz. Per. Iquitos, Perú, 59-83.
9. Mobit, J; Campos, J; Arce, J. Consideraciones acerca del brebaje ayahuasca y perspectivas terapéuticas. 1992. Lima – Perú. p. 118 – 131.
10. Dukaj, A, Vásquez, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. Editores Press (U.S.A.). 1994. p. 157.
11. Kalvatchev, Z; Garzaro, D; Guerra, F. *Theobroma Cacao* L. Un Nuevo Enfoque para la Nutrición y Salud Agroalimentaria. Venezuela. 1994 p. 06.
12. Conant, J; Blalt, A. The Chemistry of Organic Components. Editores McMillon. 1963. p. 57.
13. Revista Agronoticias N° 290. 2004. Lima – Perú. p. 86

14. Blech, D. Organic Chemistry Demystified A Self Teaching Guide. Editorial McGraw Hill (U.S.A.). 2005. p. 131.
15. Barriga, C. Investigación Educativa. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2005. p. 63.
16. Aldrich, C. Fine Chemical. Editorial Wisconsin (U.S.A.). 2008. p. 245.
17. Judd, C; Kellogg, D. Plant Systematic. Editores. Sinaner Ass. Inc. Publish. U.S.A. 2006. p. 79.
18. Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Arabia. España. 1991. p. 184.
19. Flores, J; Armijo, J; Mediavilla, A. Farmacología Humana. Editores Masson. España. 2000. p. 177.
20. Harborne, B. Phytochemical Methods. Editores Chapman and Hall (U.K.). 2008. p. 58.
21. Pharmacopeia Internationalis. Vol. I. Editores World Health Organization. Geneva – Suiza. 1951. p. 128.
22. Shriner, C. Identificación sistemática de los compuestos orgánicos. Editores Jhon Willey. U.S.A. 1965. p. 65.
23. Sthal, E. Thin Layer of Chromatography Ledmatory Handbook. Editorial Springer Vealeg. Germany. 1969. p. 132.
24. Wade, G. Química Orgánica. Editores Pearson. U.S.A. 2004. p. 182.
25. Rao C.N. Espectroscopia Ultravioleta y Visible. Editorial Alharbor. España. 1977. p. 25.
26. Clerc T. Tabla para Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Editorial Alharbor. España. p.29.

ANEXOS V.



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales - CIRNA

CONSTANCIA N° 28

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE – AMAZ DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA AMAZONIA PERUANA

HACER CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada en el mes de marzo del 2013 por los Bachilleres; **GHERARDO ANTHONY AQUIJE ELJARRATE** y **LENCY VÁSQUEZ NAVARRO**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, son parte del Proyecto de Tesis titulado: **“AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE TEOBROMINA DE SEMILLAS DE *Theobroma subincanum* C. Martius (Cacao del varillal) POR MÉTODOS FISICOQUÍMICOS Y ESPECTROMÉTRICOS”**, la cual fue verificada e identificada en este Herbarium Amazonense - AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

Familia	Nombre científico	Nombre vulgar
MALVACEAE	<i>Theobroma subincanum</i> C. Martius	“cacao del varillal”

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,

Iquitos, 19 de Mayo del 2014


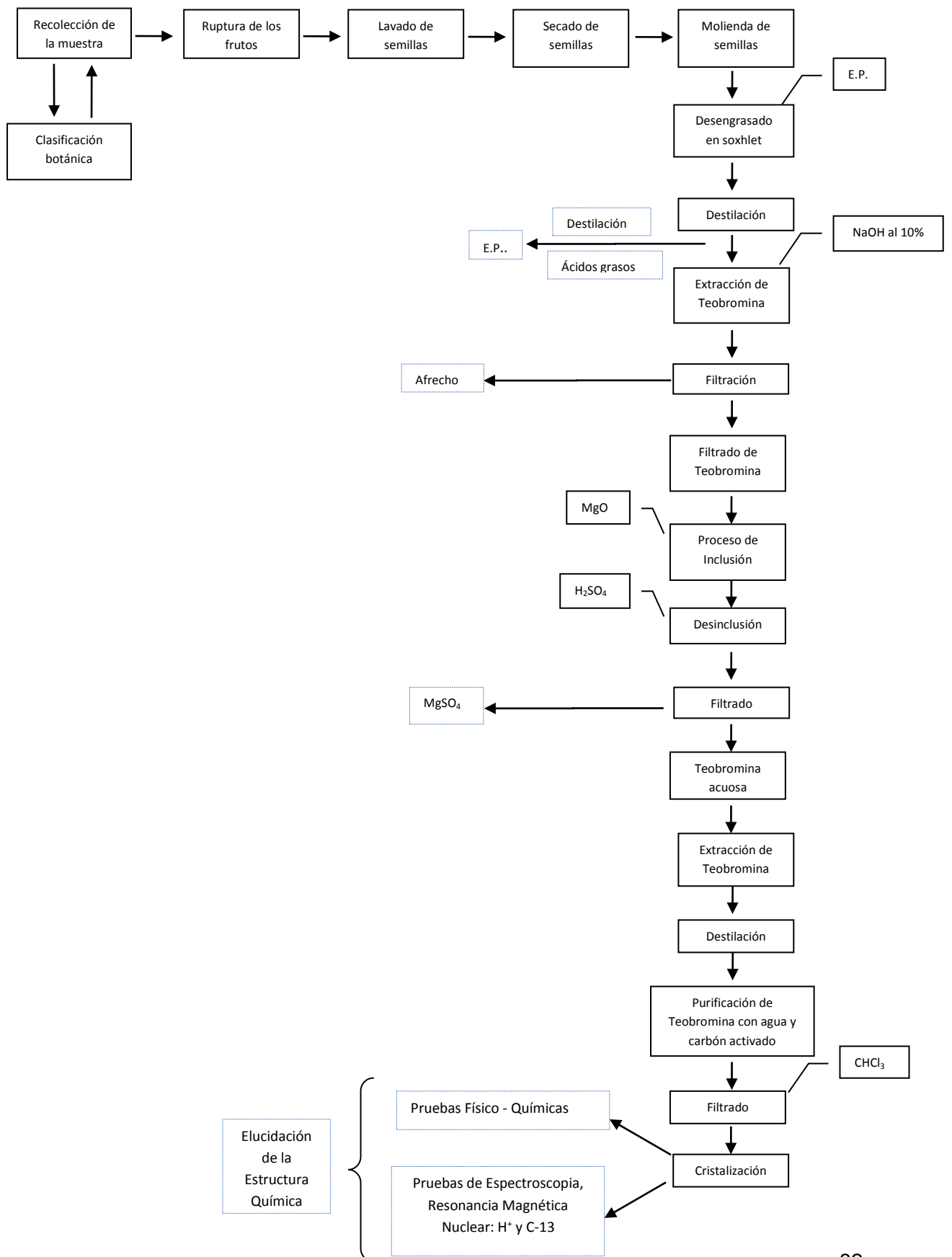
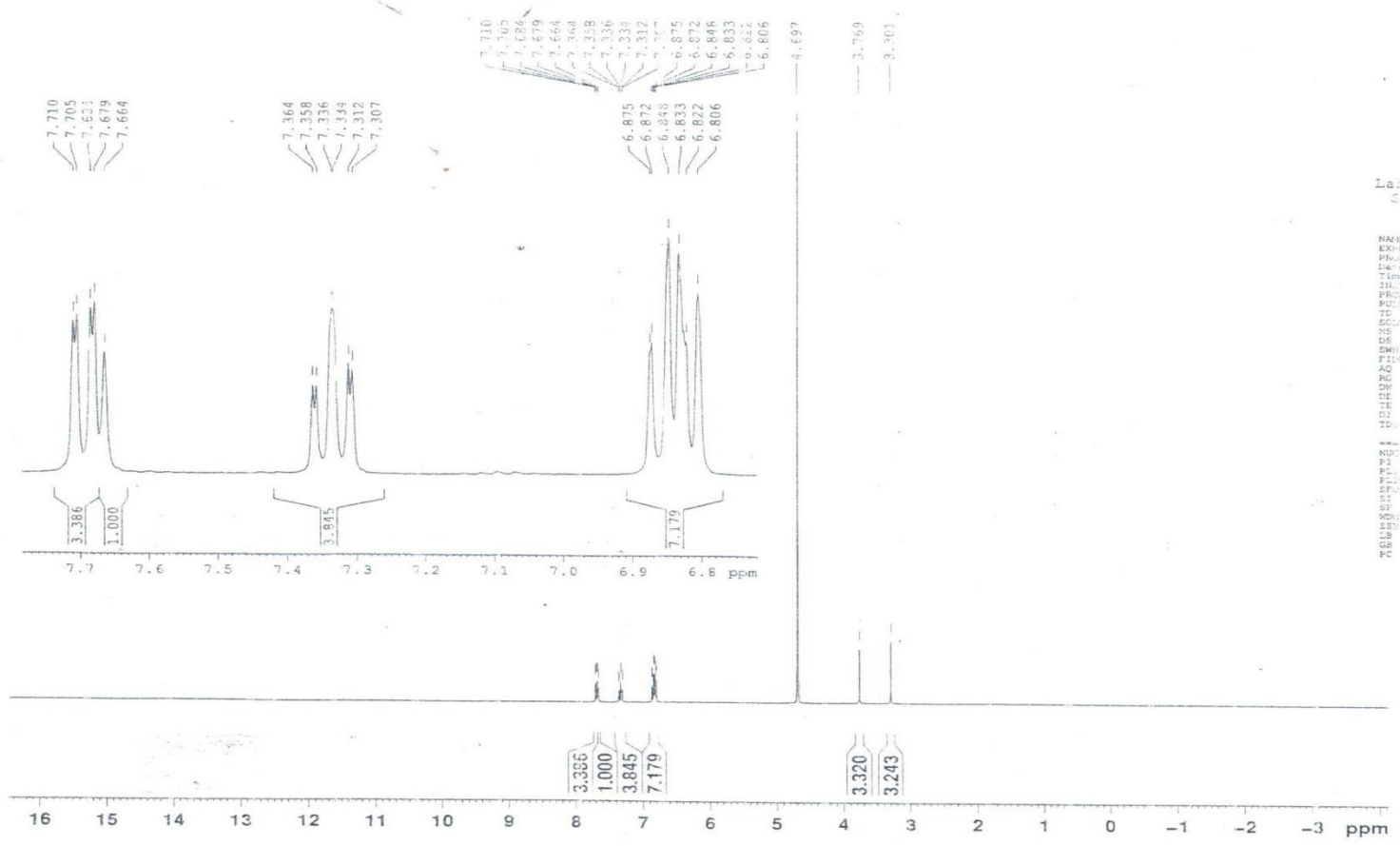

Blgo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTURA M.Sc.
Coordinador Herbarium AMAZ
CIRNA-UNAP



Diagrama de Bloque del Proceso de Investigación



1H TH-LA en D2O



Laboratorio de RMN
Sección Química

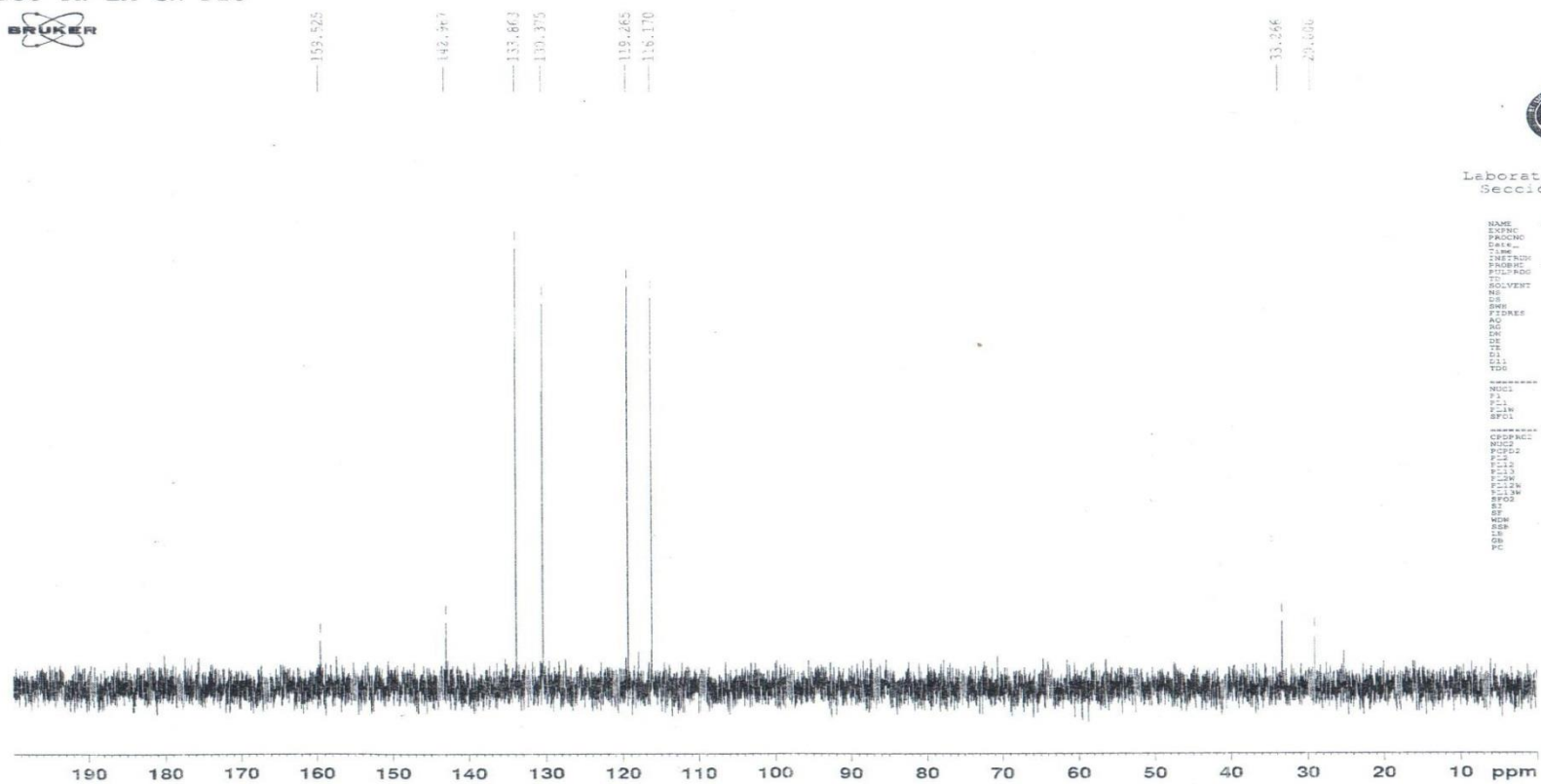
```

NAME      Juliar_e_TH-LA_241514
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20140624
Time      15.25
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 5B-1H
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   DMS
NS         400
DS         4
SWH        6188.139 Hz
F2-RES    0.05427 Hz
AQ         0.2923567 sec
RG         64
DQ         80.000 umsec
DE         10.00 umsec
TE         300.2 K
D1         1.0000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         9.00 umsec
PL1        -2.00 dB
PC1        24.5587430 Hz
SFO1       300.1316274 MHz
SI         4
SF         300.1316274 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

5.3. Fig. N° 09. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN – H⁺)

13C TH-LA en D2O



Laboratorio de RMN
Sección Química

```
NAME      GUIA-06_TH-LA_240E14
EXPNO    4
PROCNO   1
DATE_    20140224
TIME     15.34
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBO BB-1H
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  D2O
NS        251
DS        4
SWH       16125.941 Hz
FIDRES   0.256427 Hz
AQ        1.4088534 sec
RG         20250
DN         27.650 Hz
DE        10.00 usec
TE        300.2 K
D1        0.0000000 sec
d11       0.0000000 sec
TDC        6
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        12.00 usec
PL1       -2.00 dB
PL12      50.0000000 W
SFO1      125.7628588 MHz
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    100.00 usec
P2        3.00 dB
PL12     17.52 dB
PL13     17.52 dB
PL14     17.52 dB
PL15     17.52 dB
PL16     17.52 dB
PL17     17.52 dB
PL18     17.52 dB
PL19     17.52 dB
PL20     17.52 dB
SFO2     400.1462032 MHz
SI        32768
SF        75.4677480 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.40 Hz
GB        0
PC        1.40
```

5.4. Fig. N° 10. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono – 13 (RMN C - 13)