

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TESIS**

**“AISLAMIENTO DE TEOBROMINA DE SEMILLA DE *Herrania nítida* (Poepp)  
Schultes (Cacahuillo de Murciélago), ELUCIDACION ESTRUCTURAL POR  
ESPECTROMETRIA”**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. MURRIETA SILVANO, PIERO JAIR.**

**Bach. TORRES MOZOMBITE, OSBALDO.**

**ASESORES:**

**Ing. CLETO JARA HERRERA**

**Ing. JULIO ARCE HIDALGO**

**NINA RUMI - PERÚ – 2015**

“AISLAMIENTO DE TEOBROMINA DE SEMILLA DE *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de Murciélago), ELUCIDACION ESTRUCTURAL POR ESPECTROMETRIA”

Bach. MURRIETA SILVANO, PIERO JAIR.

Bach. TORRES MOZOMBITE, OSBALDO.

---

## RESUMEN

La presente tesis fue realizado en el laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales, de la Facultad de Ingeniería Química de la UNAP, las Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizadas en la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

De la especie vegetal *Herrania nítida* (Poepp) Schultes de la familia Malvácea del clado esterculoideae al que también pertenece *Theobroma cacao* (cacao); se ha aislado teobromina con el método de Inclusión, usando como adsorbente óxido de magnesio que atrapa en su seno a la teobromina formando una red estromática donde el huésped es el alcaloide y el hospedero el adsorbente. La red estromática luego se rompe con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, que deja en libertad a la teobromina que se halla en la solución ácido – acuoso de la que se le extrae con cloroformo, después de su cristalización se realizaron las pruebas fisicoquímicas y espectrométricas para su elucidación. La medición de su punto de fusión 357 °C coincide con el valor de la literatura.

En TLC tiene un de  $R_f \times 100 = 46.88$  usando silicagel G254 y como solvente acetona, cloroformo, n – butanol, hidróxido de amonio al 25% también coincide con el valor de la literatura. Las pruebas espectrométricas que se realizaron fueron las siguientes: U.V- visible dio un valor  $\lambda_{m\acute{a}x.}$ : 275.3 nm coincide con el valor de la literatura. La prueba de RMN de protones coincide con los espectros Aldrich de la literatura, la prueba de RMN de <sup>13</sup>C da siete líneas espectrales que indican la presencia de siete átomos de carbono no equivalentes de la heteromolécula de teobromina coincidente con la literatura.

Estos resultados confirman que la sustancia aislada de semillas de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes es teobromina, su presencia en el clado esterculoideae corrobora que biogénicamente elabora metabolitos secundarios similares a la que metabolizan especies vegetales del género *Teobroma*.

**Palabras claves:** *Herrania nítida*, elucidación, teobromina, pruebas fisicoquímicas y espectrométricas.

"ISOLATION DE TEOBROMINA OF SEED DE *Herrania nítida* (Poepp) Schultes  
(Cacahuillo of bat), STRUCTURAL ELUCIDATION FOR ESPECTROMETRIA"

Bach. MURRIETA SILVANO, PIERO JAIR.

Bach. TORRES MOZOMBITE, OSBALDO

---

### SUMMARY

The present thesis was carried out in the laboratory of Phytochemistry, of the Chemical Engineering Faculty of the UNAP, and the Tests of Nuclear Magnetic resonance was carried out in the Catholic University to Peru. (PUCP)

In the vegetable spices *Herrania nítida* (poepp) Schultes, of de clade stercoloidae, where is also included Theobroma cacao (cacao) was isolated by the method of inclusion, used oxide of magnesium. The teobromine, in the inclusión is retained, was break the cristaline cell with sulphuric acid to 10%, and was separate the theobromine of the aqueous phase with chlorform for the method partition of phases

Then of the cristalización was realized the test for elucidation physical chemistry determination of the Melting point 357 °C. TLC Rf X 100: 36.44. The test of magnetic nuclear resonance of protons is same at the measure. spectral of the Aldrich the test of magnétic nuclear resonance of carbon- 13 also is similar to theobromine and shown seven lines that belongs seven carbon Atoms no equivalent present in the heteromolecule of theobromine. The uv – visible measurement espectrometric have a band.

This results confirm that the substance isolated of *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago) is theobromine and have correlation biogenetical with the clade sterculoideae where belong the gene Theobroma that sinteticeen vegetables species.

Key Word: *Herrania nítida*, elucidation, theobromine, physical chemisty and spectometric tests.

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A mi madre Lizbeth Silvano Saquiray, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y por apoyarme siempre Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.*

*A mi hijo que está en el vientre de la mujer que amo, gracias Dios, por estar dándome la alegría de saber que voy a ser padre, él será mi motor y motivo para conseguir todo lo que anhelo en la vida.*

*A mis abuelos Juan Silvano y Mercedes Saquiray, por quererme y apoyarme siempre, se los debo mucho.*

*A mis hermanos, Juan Luis, Ruth Estefany y Braulio André, por estar conmigo y apoyarme siempre: los quiero mucho.*

*Y a Todos aquellos familiares y amigos que siempre estuvieron conmigo es este largo camino de estudios, Ustedes saben de mis sacrificios y yo sé quiénes son ustedes. Los quiero mucho.*

**PIERO**

## **DEDICATORIA**

*A Dios en primer lugar por haberme guiado y cuidado durante todo este tiempo y darme las fuerzas para seguir adelante y conseguir las metas trazadas.*

*A mis padres Jorge Q.E.P.D.y Victoria por haberme inculcado el amor al estudio, al trabajo y por sus constantes consejos para seguir adelante hasta lograr el objetivo final.*

*A Romel y Miriam por sus consejos siempre acertados y por esa tenacidad que siempre muestran ante la adversidad los quiero mucho.*

*A Jessica mi esposa 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 eres y seguirás siendo mi compañera inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento.*

*A Isaac y Andrea mis queridos hijos, gracias por su comprensión por no estar con ustedes en momentos de mucha valor y significación. Los amo*

*A mis hermanos María, Haroldo, Sonia, Hernando, Sofía y Verónica por su constante apoyo y estar siempre a mi lado. Los quiero mucho.*

*Al Lic. Wagner A. Grately Silva, Director de la I.E CNI por su comprensión y apoyo*

*A mis grandes amigos que me apoyaron, me alentaron desde el primer semestre de la carrera, y a los que quiero mucho, a Lucio, Sam, Piero, Alexis y Christian y otros jamás olvidare nuestras aventuras en la universidad como fuera de ella. Les deseo un éxito enorme, que sé que lo merecen.*

**OSBALDO**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mi agradecimiento a ti Dios por bendecirnos para llegar a la culminación de este trabajo haciendo realidad nuestro sueño anhelado.*

*A nuestros asesores de tesis, Ing. Cleto Jara Herrera, Ing. Julio Arce Hidalgo por brindarnos su conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación para el desarrollo de esta tesis y otras personas que contribuyeron en su elaboración.*

*Un agradecimiento recóndito a nuestros familiares por su constante apoyo en todo momento. Sin el cual hubiera sido imposible llegar a realizar nuestras metas.*

*No, nos podemos olvidar de nuestros profesores a quienes les debemos gran parte de nuestros conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad que nos abrió a personas como nosotros anhelantes de saber preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien*

**PIERO JAIR Y OSBALDO**

# INDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>INTRODUCCION</b>	13
1.1. Objetivos	16
1.1.1. Objetivo General	16
1.1.2. Objetivo Especifico	16
<b>CAPITULO II</b>	
2.1. Marco teórico	18
2.1.1. Antecedentes	18
2.2. Marco conceptual	19
2.2.1 Identificación taxonómica	20
2.2.2. Descripción Botánica	21
2.2.3. Distribución y hábitat	22
2.2.4. Aspectos Etnomedicinales y Etnofarmacológicos	22
2.2.5. Composición química de <i>Herrenia nítida</i> (Poepp) Schultes	22
2.2.6. Uso de la teobromina	23
2.3. Mecanismo de acción de la teobromina	23
2.4. Alcaloides	24
2.4.1. Criterios de Clasificación	25
2.4.2. Origen biogénético del nitrógeno en los alcaloides:	
Aminoácidos precursores	26
2.4.2.1. Alcaloides procedentes del par fenilalanina/tirosina	26
2.4.2.2. Alcaloides procedentes del Triptófano	28
2.4.2.3. Alcaloides provenientes del par ornitina/lisina	28
2.4.2.4. Alcaloides provenientes de la histidina	29

2.4.2.5. Alcaloides provenientes del ácido nicotínico	30
2.4.2.6. Pseudo alcaloides.	30
2.5. Biogénesis de los alcaloides	31
2.5.1. Alcaloides derivados de la purina: Teobromina	31
2.5.1.1. Ruta de formación de la teobromina	32
2.6. Métodos de identificación cualitativa de los alcaloides	33
2.6.1. Reactivos de Precipitación	33
2.6.2. Reactivos de coloración	34
2.7. Procesos de aislamiento de alcaloides purínicos, con sustancias de inclusión	34
2.8. Pruebas de identificación de la teobromina	36
2.9. Pruebas fisicoquímicas para la determinación de la teobromina aislada de <i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes	36
2.9.1. Punto de fusión	36
2.9.1.1. Aparatos para determinar el punto de fusión	37
2.10. Prueba organoléptica	37
2.11. Por cromatografía de capa fina	37
2.12. Pruebas espectrométricos para la determinación de la teobromina aislada de <i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago).	38
2.12.1 Por espectrometría ultra- violeta visible	38
2.12.1.1. Espectrometría de Resonancia magnética nuclear	38
2.12.2. Resonancia magnética nuclear de Protones	43
2.12.1.3. Espectrometría de resonancia magnética nuclear de carbono 13	45
2.13. Elucidación estructural del compuesto aislado.	46
2.14. Hipótesis	46
2.15. Variables operacionales	46
2.15.1. Variable independiente	46



2.15.2. Variable dependiente	47
2.16. Operacionalización de las variables	48
2.16.1. Variable independiente	48
2.15.2. Variable dependiente	49
<b>CAPITULO III</b>	
Metodología	
3.1. Metodología de la investigación	51
3.2. Diseño de la investigación	52
3.2.1. Actividades del campo	52
3.2.2. Trabajo de Gabinete	52
3.2.3. Trabajo de laboratorio	52
3.3. Aislamiento de teobromina	52
3.3.1. Inclusión de la teobromina en MgO	53
3.4. Análisis del producto	53
3.5. Elucidación de la estructura química por espectrometría	54
3.6. Flow sheet de bloque	55
3.7. Población y muestra	56
3.7.1. Población	56
3.7.2. Muestra	56
3.7.3. Criterio de inclusión	56
3.7. 4. Criterio de exclusión	56
3.8. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos	56
3.9. Instrumentos, materiales y reactivos	57
3.9.1. Instrumentos / equipos	57
3.9.2. Material de vidrio y/o porcelana	57
3.9.3. Materiales de metal	57

3.9.4. Materiales de filtración y cromatografía	57
3.9.5. Materiales de inclusión	58
3.9.6. Reactivos	58
3.9.7. Materiales de bioseguridad	58
3.10. Aspectos éticos	58
3.11. Procedimiento experimental	58
3.12. Elucidación de la estructura química de la sustancia aislada	60
3.12.1. Pruebas físico- químicas	60
3.12.1.1. Punto de fusión	60
3.12.1.2. Cromatografía de capa fina	60
3.12.1.3. Determinación del peso molecular por el método de Rast	61
3.12.1.4. Determinación organoléptica	62
3.13. Prueba espectrométrica para la elucidación	62
3.13.1. Espectrometría UV- Visible	62
3.13.2. Resonancia magnética nuclear de protones	63
3.13.3. Resonancia magnética nuclear de carbono- 13	63
<b>CAPITULO IV</b>	
4.1. Resultados	65
4.1.1. Rendimiento de la teobromina aislada de las semillas de <i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes	65
4.1.2. Resultados de las pruebas fisicoquímicas	65
4.1.3. Pruebas de espectrométricas	65
4.1.4. Pruebas de resonancia magnética nuclear	65
4.1.5. Resonancia magnética nuclear de C- 13	66
5.1.6. Discusión	67

4.1.7. Conclusión	68
4.1.8. Recomendación	69
4.1.9. Referencias bibliográficas	70

## **V ANEXO**

5.1. Constancia N° 48 de <i>Herrania nítida</i> (Cacahuillo de murciélago), otorgada por el HERBARIUM AMAZONENSE	75
5.2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones	76
5.3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C – 13	77
5.4. Foto N° 01 planta de <i>Herrania nítida</i> (Cacahuillo de murciélago)	78
5.5. Foto N° 02 Fruto maduro de <i>Herrania nítida</i> (Cacahuillo de murciélago)	78
5.6. Foto N° 03 Fruto con las semillas <i>Herrania nítida</i> (Cacahuillo de murciélago)	78

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION

El estudio estuvo orientado a demostrar que *Herrania nítida* (Poepp) Schultes del mismo clade esterculoideae que *Theobroma cacao* (cacao) y otros de este género también contiene teobromina, alcaloide cuyo precursor químico es la xantina y por no contar esta especie vegetal con estudios previos no se le asigna importancia en los diccionarios de plantas amazónicas, es mas en otros se lo omite<sup>10,26</sup>.

Falta realizar un levantamiento químico de las especies vegetales amazónicas y específicamente de esta planta a fin de asignarle su valor real según sus aptitudes de uso y sus ventajas comparativas. A muchas especies amazónicas no se les da ninguna importancia, pareciera que no cumplirían ninguna función como complemento del bosque, sin embargo en el caso de cacahuillo de murciélago inconscientemente se le da este nombre vulgar porque de él se alimenta este mamífero volador y él lo propaga en el bosque a través de sus defecaciones al trasladarse de un lugar a otro.

En las semillas de esta planta encontramos teobromina y puede ser una excelente materia prima para su obtención, a nivel industrial. Es de fácil aislamiento porque no se realiza desengrase como en la semillas de cacao ya que no contiene excesivas sustancias lipídicas.

Podría constituirse en una fuente específica de obtención de teobromina si se cultivara extensivamente, permitiendo el desarrollo de un nuevo tipo de actividad agrícola e industrial en la amazonia con aporte de trabajo para los campesinos y ribereños que vieran una mejora ostensible de sus condiciones económicas.

Es evidente, que el cacao a nivel mundial goza de gran importancia trascendental, debido a su uso generalizado y cotidiano en la alimentación humana en forma de chocolate, cocoa, pastas alimenticias, licores, jarabes y productos de belleza y de uso farmacéutico. Ya que posee un alto poder nutritivo energético y sedativo por su contenido de proteínas, grasas, carbohidratos, flavonoides, antioxidantes<sup>1</sup> y teobromina, complementados por su delicioso sabor y gratísimo olor.

Pocas son en el mundo las fuentes naturales que contiene teobromina, la más reconocida es el cacao (*Theobroma cacao*) de la gran familia de las malvales y según la filogenia de los

clados mayores se halla comprendida entre las *Esterculoideae* a que también pertenece *Herrania nítida*.

El método para obtener teobromina a partir del cacao consiste en tratar los cotiledones por expresión en caliente luego de quitar el tegumento se obtiene butter oíl o mantequilla de cacao que contiene principalmente glicéridos de los ácidos: esteárico, palmítico, oleico, araquídico y linoléico<sup>19</sup> que se usa en la industria farmacéutica para fabricar supositorios y en la cosmetológica para elaborar cremas faciales, lápiz labial ungüentos para el cutis, etc.

El metabolito secundaria más importante que se halla en el cacao es un alcaloide purínico conocido como teobromina (3,7 – dimetil – xantina) se extrae del cotiledón así como de la cubierta externa y del tegumento que recubre la semilla, en la industria farmacéutica se obtiene hirviendo la cubierta y el tegumento molidos y para eliminar los taninos, que son los mayores interferentes se aplica solución de acetato de plomo<sup>6</sup>, esto de por si es un método contaminante a pesar de la purificación correspondiente con agua y alcohol para eliminar el plomo, debido a que este metal tiene alta solubilidad en el agua y a pesar de su insolubilidad en alcohol, trazas de esta sustancia se pueden hallar en la teobromina cristalizada.

Otro método de obtención de la teobromina se logra por síntesis a partir del ácido úrico 3 – metilo, que reacciona con pentocloruro de fosforo, ácido yodhídrico y cinc como catalizador, este método también deja trazos de compuestos fosforados y clorados<sup>4,11</sup>

Frente a estos inconvenientes hay otras interesantes alternativas:

- a. Búsqueda de nuevas especies vegetales con contenido de teobromina y bajo contenido de grasas.
- b. Utilizar métodos de inclusión para aislar alcaloides purinicos a los que pertenecen la teobromina, en forma selectiva por ejemplo el óxido de magnesio tiene alta selectividad, para actuar como sustancia de “inclusión” en el aislamiento de la teobromina, no es toxico y fácilmente suelta al incluido (teobromina) cuando se le hace reaccionar con solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%.

La especie vegetal *Herrania nítida*(Poepp) Schultes cuyo análisis preliminar con los reactivos de Murexida da reacción positiva para teobromina, de este modo puede constituirse en un excelente materia prima alternativa por la obtención de este alcaloide tal vez en

mejores condiciones que *Theobroma subincanum* (cacao de varillal) estudiada por Aquije y Vásquez que por sus componentes proteicos y grasos pueden resultar inadecuados para este propósito y más bien ser excelente sustituto y/o complemento del cacao en la industria alimentaria.

La búsqueda de Teobromina en otras especies vegetales ha creado gran expectativa en la industria farmacéutica mundial debido a que este alcaloide es utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades: dolores musculares, problemas del miocardio, asma, bronquitis (vasodilatador), contra la retención de líquidos (diurético), contra el cálculo biliar y del cardias, contra el cor pulmonale. Es importante señalar que su amplitud de usos genera una demanda insatisfecha y para cubrir este déficit, como no existen fuentes naturales en cantidad suficiente se sigue obteniéndolo por síntesis, estas son las razones que motivan estudiar con especial interés esta planta; otro aspecto de este estudio está encaminado en respaldar los criterios filogenéticos ya que de acuerdo con la clasificación cladística de Judd y Manchester, Alverson y Whitcock; *Herrania nítida* (Poepp) Schultes tan igual que el género *Theobroma* están incluidos en el grupo Esterculioideae y guarda estrecho parentesco<sup>2,3,4</sup>

Si las pruebas preliminares realizadas en las semillas de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes dieron positivo la reacción cromogénico de la murexida que duda cabe que nuestro estudio evidencia que estamos frente a una especie de singular importancia.

En consecuencia planteamos que: ¿Es posible aislar teobromina de la semilla de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago) y elucidar su estructura interpretando los resultados por los métodos espectrométricos?

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo General:

Aislar Teobromina de la semilla de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélagos) y realizar la elucidación estructural por espectrometría.

### 1.1.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Recolectar los frutos de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélagos) para su identificación botánica y como materia prima para el aislamiento de Teobromina.
- ✓ Procesar la semilla para el aislamiento del alcaloide (purínico).
- ✓ Aislar y separar los componentes interferentes para su cristalización.
- ✓ Elucidar la estructura química mediante la determinación de sus propiedades fisicoquímicas y mediante métodos espectrométricos: UV- Visible, Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de  $^{13}\text{C}$ .



# CAPÍTULO II

## 2.1. MARCO TEORICO

### 2.1.1. ANTECEDENTES

La teobromina hasta el presente se ha encontrado dentro del grupo cladístico Esterculioideae en el género *Theobroma*, especies: *Theobroma cacao* (*cacao*) y recientemente en *Theobroma subincanum* Mart (Cacao de varillal)<sup>4</sup>. No hay reportes de su presencia en *Theobroma bicolor* (Macambo), *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), *Theobroma obovatum* KL (Cacahuillo), aunque se intuye que si está presente.

El Clado mayor del orden Malvales, familia Malvaceae en concordancia con las relaciones filogenéticas generales tiene como componente al grupo Esterculioideae<sup>2,3</sup> al que está adscrito *Herrania nítida* (Poepp) Schultes, especie vegetal silvestre de poca trascendencia económica frente a *Theobroma cacao* (*cacao*); de gran importancia para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica. Schultes eminente botánico de la Universidad de Harvard señaló no haber encontrado alcaloide en una especie de *Herrania* procedente del Estado de Amazonas (Manaos) en 1967.<sup>9, 10, 11</sup> desde esa época no se insistió en estudiar esta planta como fuente alternativa de teobromina esta afirmación de Schultes se debe tal como argumentamos a que en su análisis de campo utilizó reactivos generales de identificación de alcaloides (Mayer, Wagner, Dragendorff, etc.) y ha quedado demostrado que para la identificación de alcaloides de naturaleza purínica (pseudo alcaloides) en la actualidad resulta inadecuado, se precisa de reactivos cromogénicos que al reaccionar con cafeína, teobromina y teofilina dé una coloración rojo púrpura<sup>12</sup>. Al formarse murexida cuando reacciona con las estructuras precursoras de las xantinas.

También se conoce otras dos especies de *Herrania*: *Herrania mariae* (Mart) conocido por la etnia Huitoto como mu – se – na y *Herrania nysterdam* Schultes que en lengua Huitoto se conoce como mu – se – ge – ke a ambos no se le asigna aun ningún uso conocido, *herrania arbiflora*, encontrado por Schultes en el Departamento de Boyaca Colombia, *Herrania lacimifolia*, *Herrania unbratica*

*Herrania nítida* (Poepp) Schultes es comestible y cuando está maduro el arilo es de sabor agridulce semejante al cacao pero poco aromático.

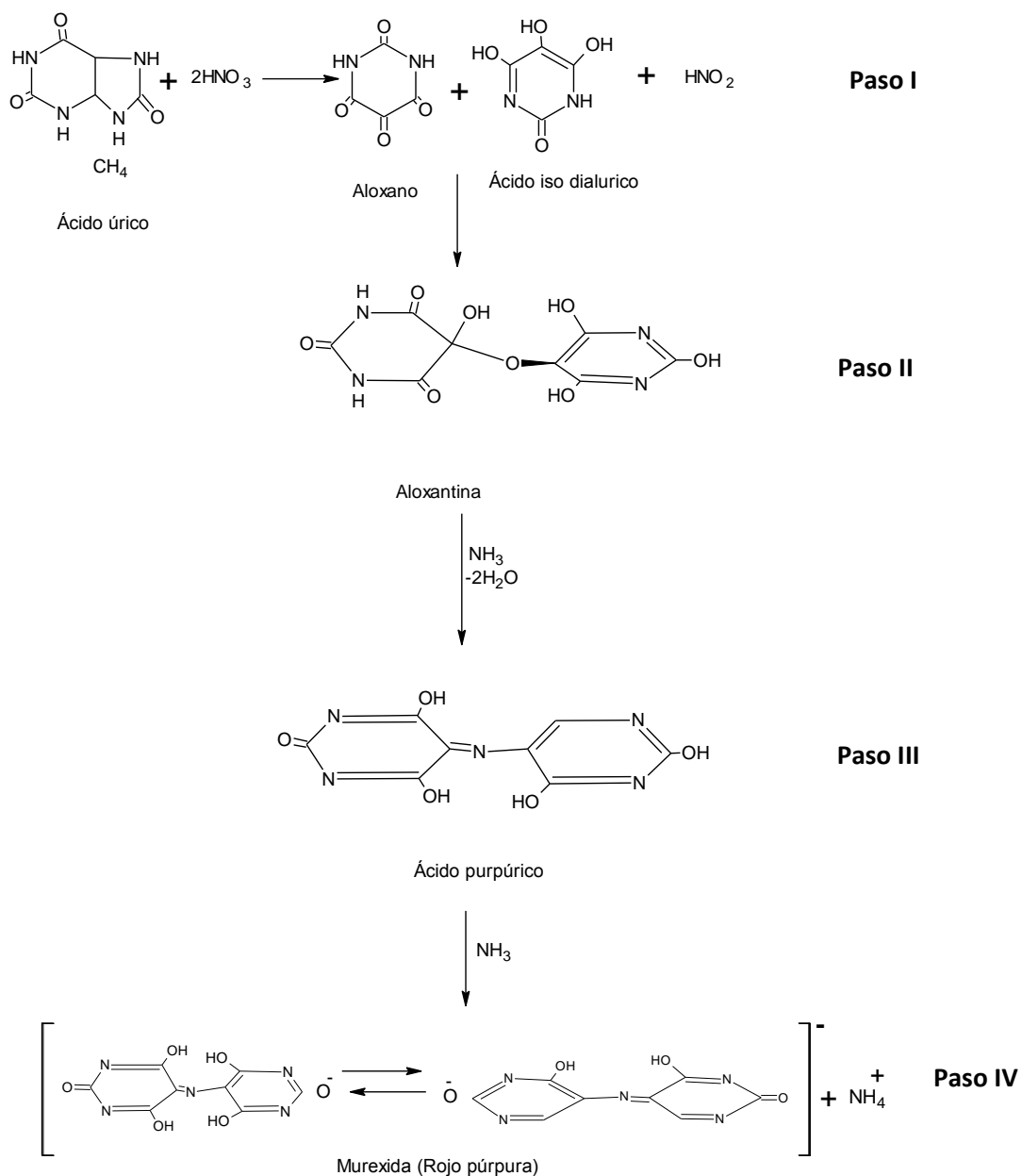
Amazonian Ethnobotanical Dictionary que trata de recoger un amplio abanico de plantas amazónicas no hace la mínima mención a *Herrania nítida* a pesar de que como fuente bibliográfica pretende abarcar muchas plantas de la amazonia peruana<sup>13</sup>, Soukup J., en su obra Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros levemente señala que su fruto es comestible sin mayores detalles.

No se conoce estudios fitoquímicos de *Herrania nítida*, nuestro trabajo constituye el primer esfuerzo con el que se pretende demostrar la presencia de teobromina en esta planta. La ventaja que posee si se destinaria a la obtención de teobromina se funda en su bajo contenido de ácidos grasos, por la que no se requiere un desangrase que alarguen el proceso de aislamiento, como ocurre en el caso de *Teobroma cacao* (cacao) cuyo desangrase hasta su agotamiento impone un tiempo largo de trabajo.

## 2.2. Marco Conceptual

Los alcaloides que tienen el grupo purínico dan positivo la reacción de Murexida, el esqueleto precursor de las purinas es el ácido úrico este en contacto con el ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado y el amoniaco da lugar a la murexida<sup>9,10,12</sup> reacción que sigue varios procesos como se observa en la figura 1.

Se realiza disolviendo un extracto alcohólico acuoso de semillas de *Herrania nítida* al que se agrega tres gotas de ácido nítrico concentrado en una cápsula de porcelana llevado a sequedad se añade 2 gotas de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), y se forma la murexida de color rojo púrpura. Una reacción cromogénica específica para pseudo alcaloides.



**Fig. 1.** Reacción cromogénica del ácido nítrico concentrado y del amoníaco con alcaloides purínicos. Esta reacción general sirve para los alcaloides purínicos cafeína, teobromina y teofilina al llegar al paso IV.

### 2.2.1. Identificación Taxonómica

La muestra botánica de hojas flores y fruto recolectada para el estudio fue previamente identificadas en el Herbarium Amazonense, CIRNA – UNAP por el Ingeniero Juan Ruiz Macedo por comparación con comprobando con exsicatas de esta planta y responde a la clasificación siguiente:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsidae
Orden	:	Malvales
Familia	:	Sterculiaceae
Género	:	Herrania
Especie	:	<i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes

### **Nombres vulgares**

Cacahuillo de murcielago, Mu – se – na (Huitoto), cacahuillo, cacao de monte, cha- te- ra en ticuna etc.

### **2.2.2. Descripción Botánica:**

- Arbusto de 6 metros de altura, tallo delgado de 4 cm de diámetro, hojas anchas palmadas con vellosidades, inflorescencia indeterminada reducida a una simple flor axilar.
- Flores bisexuales o unisexuales.
- Frutos capsulares con bordes en forma de quilla, indehiscente, que se localizan a lo largo del tallo
- La familia no es monofilética es decir no proviene de un antecesor.
- Tiene retenidos numerosos estambres con anteras biloculares, los estambres pueden ser libres o connatos (partes iguales fusionadas) y la connación aparece para desarrollarse al mismo tiempo.
- Tiene semillas de forma angular. Los arilos son dulces cuando se muerden las semillas se siente un sabor amargo no persistente, se atribuye su propagación en el bosque a mamíferos como el murciélago.
- Las relaciones de evolución de esta planta a un no está clara pero sin duda pertenece al clado esterculoideae

### **2.2.3. Distribución y hábitat**

Está distribuida en los bosques de la amazonia continental: Brasil, Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador.

Crece en zonas no inundables de la amazonia peruana siendo un componente del sotobosque no forma extensas comunidades vegetales como el cacao.

En el Perú se encuentra en los bosques de las regiones: Loreto, Ucayali, San Martín y Madre de Dios.

#### **2.2.4. Aspectos Etnomedicinales y Etnofarmacológicos.**

Cuando se machaca la cáscara del fruto verde produce una sustancia mucilaginosa hialina que se usa mezclando con hojas de suelda consuela en lisiaduras o roturas óseas.

Los Vaupés del suroeste de Colombia beben las semillas tostadas y molidas la beben los Vaupés en Colombia contra la fiebre y la gripe<sup>9</sup>.

El mucilago del pericarpio tiene actividad floculante, se puede machacar y usar en el tratamiento de aguas turbias<sup>16</sup> en pueblos amazónicos que no disponen de sistemas de tratamiento para la bebida y el uso doméstico.

#### **2.2.5. Composición química de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes**

La cubierta externa contiene mucilagos constituidos por galactomananas azucres de elevado peso molecular<sup>28</sup> comunes en la familia Malvaceae que les dan las propiedades aglutinantes o floculantes. Las galactomananas están formadas por unidades de manosa, galactosa que forma la macromolécula, agrupadas en bloques de 20 a 25 unidades ramificadas.

Contiene Teobromina, que se ha determinado por la reacción con ácido nítrico concentrado y amoníaco concentrado (Reacción de Murexida) (prueba preliminar de este trabajo).

El sabor agridulce del arilo probablemente se deba a la presencia de hexosas y el leve sabor ácido puede ser debido a la presencia de ácido ascórbico pero no hay un conocimiento definitivo sobre este aspecto es una inferencia organoléptica desprendida del sabor del arilo, que sin duda es agradable cuando está maduro.

### **2.2.6. Usos de la teobromina.**

- En insuficiencia renal se usa como diurético para evitar la retención de agua.
- Contra el asma y bronquitis actúa como relajante muscular y vasodilatador.
- Como estimulante del corazón
- Como relajante de la musculatura lisa de las vías biliares, puede ser útil en el tratamiento del cálculo biliar.
- Se usa en niños para el tratamiento del cor pulmonale, estimula la contractibilidad cardíaca con acción más rápida que la digitalina y más prolongada que los betas adrenérgicos.

### **2.3. Mecanismo de acción de la teobromina.**

Como todas las xantinas teobromina inhibe la fosfodiésterasa del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) aumentando los niveles de dichos nucleótidos, alterando la movilización del catión calcio ( $Ca^{++}$ ) intercelular, pero esta acción se produce con concentraciones de teobromina superior a la dosis terapéutica. La hipótesis de acción actualmente más aceptada se basa en la capacidad de las xantinas para bloquear receptores adenosínicos  $A_1$  y  $A_2$  a concentraciones equivalentes a la terapéutica, la acción de la adenosina en los órganos es variada.

El SNC es la región más rica en receptores adenosínicos de todo el organismo, la activación de receptores  $A_1$  en el parasimpático reduce la liberación de los neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores a nivel post-sináptico.

La activación de receptores  $A_1$  y  $A_2$  originan hiper- polarización e inhibición de la actividad neuronal que explica las propiedades de la adenosina en el SNC, ansiolisis, 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, (modulación

en la respuesta al dolor) de los opioides inotrópicos a nivel cardio vascular (efecto sobre la contractibilidad del miocardio), cianotrópicos negativos ( $A_1$ ) y provoca vasodilatación en la mayoría de los territorios con presencia de receptores incluyendo coronarias, arterias cerebrales, sobre el riñón la adenosina reduce el flujo sanguíneo la velocidad de filtración glomerular y la liberación de renina ( $A_1$ ) por lo tanto origina una disminución

de la diuresis sobre la musculatura lisa bronquial su acción directa  $A_2$  es broncodilatadora, pero la inhalación de adenosina por individuos asmáticos genera una poderosa respuesta bronco-constrictora, mientras que paradójicamente en individuos sanos no se modifica el calibre de las vías respiratorias, se propone que la adenosina favorece la liberación de mediadores por parte de los mastocitos pro-activados inmunológicamente y pone en marcha mecanismos inflamatorios neurogénicos. Contra estas acciones de la adenosina la teobromina actúa antagonizándola por eso se justifica la mayoría de sus acciones farmacológicas<sup>6</sup>

#### **2.4. Alcaloides.**

Se incluye estructuralmente en la denominación de alcaloides, metabolitos exclusivamente secundarios con propiedades no necesariamente básicas en la que parte de su estructura incluyendo el nitrógeno proceden biogénicamente de aminoácidos precursores<sup>12</sup>.

No se incluye en esta denominación azúcares ni lípidos nitrogenados, ni tampoco compuestos en el que el nitrógeno forma parte de funciones neutras no amínicas ni amídicas como por ejemplo nitro, ciano, isociano. Se excluye de la denominación de alcaloide a sustancias tales como:

- a. Ciertas aminas bioactivas extracelularmente simples como etanol amina, adrenalina, dopamina, etc., que aparecen en el metabolismo desempeñando el papel de mensajeros químicos.
- b. Aminoácidos o péptidos raros procedentes generalmente de hongos o microorganismos.
- c. Derivados heterocíclicos nitrogenados simple
- d. Pigmentos pirrólicos.

##### **2.4.1. Criterios de clasificación de alcaloides**

Los verdaderos alcaloides derivan su estructura total o parcialmente de los aminoácidos.

El grado de conservación de la estructura del aminoácido es sin embargo variable. En la mayoría de los alcaloides se retiene la totalidad de la estructura del aminoácido, salvo el grupo carbonilo que puede perderse por lo general<sup>20</sup>.



Entonces el aminoácido puede constituir la totalidad de la estructura del alcaloide o solo parte proviniendo el resto de la vía metabólica del acetato-mevalonato, de la vía del ácido Shikimico o de algunos precursores isoprenoidales (C<sub>5n</sub>).

En el otro extremo de la escala, puede ocurrir que el aminoácido proporcione únicamente el átomo de nitrógeno a través de un proceso de transaminación perdiendo el resto de la estructura o alguna de las grandes rutas metabólicas mencionadas.

Se ha creado la denominación de pseudo alcaloides para designar a este último tipo de compuestos.

Aunque los alcaloides son representantes arquetípicos del metabolismo de las plantas, se encuentran también en una variedad de microorganismos marinos y algunas especies animales (anfibios, algunos insectos).

La inmensa mayoría contiene al menos un átomo de nitrógeno incluido en un anillo, es decir son compuestos heterocíclicos por esta razón desde el siglo XIX se han clasificado los alcaloides de acuerdo con el tipo de heterociclo que contienen por ejemplo alcaloides piperidínicos, pirrolidínicos, indólicos, isoquinoleicos, etc.

También ha gozado de uso bastante definido su clasificación basada en el origen biológico, casi siempre vegetal (alcaloides del curare, de la coca, del tabaco) etc, sin embargo parece más razonable acudir al criterio; biosintético, vale decir clasificar los alcaloides de acuerdo con el aminoácido precursor.

#### **2.4.2. Origen biogenético del nitrógeno en los alcaloides: Aminoácidos precursores.<sup>19,20</sup>**

Debido a que muchos alcaloides tienen fórmulas químicas complejas y múltiples carbonos asimétricos, tanto la elucidación de sus estructuras químicas como el estudio de sus vías de biosíntesis han sido relativamente recientes y difíciles de resolver, y en algunos casos permanecen aún incompletas. Casi todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de la

nicotina y la morfina han sido identificadas, pero luego de alrededor de 190 años después del aislamiento de esta última.

Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico

#### **2.4.2.1. Alcaloides procedentes del par fenilalanina/tirosina.**

Principalmente forman este grupo los alcaloides isoquinoleínicos, derivados químicamente de la isoquinoleína (1, 2, 3,4-tetrahydroisoquinoleínicos). Su biosíntesis tiene lugar cuando el aminoácido aromático se descarboxila, y se le une generalmente otro aminoácido desaminado (cetoácido o aldehído) o en contadas ocasiones, una unidad isoprénica. Los más importantes son los alcaloides bencil-isoquinoleínicos.

- Mezcalina aislada de *Lophora williamsii*.
- Salsolina, aislada de *salsola spp* se ha encontrado en la orina humana como trazas generadas por reacción de Pictet-Spengler de dopamina con adrenalina o bien con ácido pirúvico seguido de descarboxilación es una síntesis biomimética.
- Queladonina aislada de *Celedonia majes*
- Papaverina, aislada de *Papaver somniferum*
- Landomosina aislada también de *Papaver somnifeum*
- Colchicina aislada de *Colchicum autumnale*
- Nancodirina tiene como precursor dos moléculas de tirosina que se incorporan a la estructura del alcaloide una de ellas proviene del átomo de nitrógeno por la reacción de Mannich.
- Pseudoefedrina, efedrina norefedrina tienen como precursor la fenilalanina.
- Hordenina y mescalina tienen como precursor a la tirosina así mismo también noradrenalina y epinefrina.

- Merece consideración aparte los derivados de la bencilisoquinoleina. Por ejemplo tubo curarina aislada de *Chondodendron tomentosum* (curare), la papaverina que así como se considera procedente del par fenilalanina/tirosina deriva del 1-bencil – 1,2,3,4- tetra isoquinoleina.

Los alcaloides aporfínicos derivan del sistema aporfina y pueden ser: (S) isoboldina, (R) estetanina, (S) reticulina.

Hay alcaloides del grupo de la morfina los morfínicos se derivan de la base bencilisoquinoleina a través de un único acoplamiento fenólico y está relacionado con (R) - reticulina, salutaridina, tebaína, codeína<sup>21</sup>.

El interés por la morfina es de índole farmacológico, debido a la existencia en el cerebro de varios tipos de receptores proteicos que interaccionan de manera específica.

Como compuestos opiáceos, se ha identificado hace un tiempo una serie de péptidos endógenos de pequeño tamaño denominado endorfinas que se unen a sus receptores produciendo analgesia (supresión del dolor) y otros efectos diversos<sup>21</sup>.

#### **2.4.2.2. Alcaloides procedentes del triptófano**

Es un grupo muy numeroso de alcaloides (tal vez el más amplio de todos) que fue estudiado con detenimiento, a partir del aislamiento de la reserpina extraída de las raíces de la rawolfia (*Rauwolfia reserpina*, de la familia Apocinaceae), por sus propiedades antihipertensivas y su poder tranquilizante. Años más tarde, el interés terapéutico de estas estructuras aumentó con el descubrimiento de las propiedades antitumorales de los alcaloides de tipo bisindólico (como la vinblastina) de la vinca (*Catharanthus roseus*).

Dentro de este grupo podemos mencionar a algunos de ellos:

- Psilocibina aislada de *Peganum harmala* también puede aislarse de *Banisteropsis caapi* (Ayahuasca).

- Fisostigmina de *Physostigma venenosum*
- Ajmalicina aislada de *Rauwolfia serpentina*
- Yohimbina aislada de *Pausinystalia yohimbe*.
- Ibogaina aislada de *Tabernanthe iboga*
- Estricnina aislada de *Strychnos nux vomica*
- Quinina aislada de Cinchona *spp.* También se puede aislar de *Remijia peruviana*
- Camptotecina aislada de *Camptoteca acuminata*.

#### 2.4.2.3. Alcaloides provenientes del par ornitina/lisina.

Este grupo abarca a los alcaloides tropanicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos y los piperidínicos

Dos ejemplos son la higrina y la cuscohigrina encontrada en *Erythroxylon coca* también cocaína y ecgonina.

Pautas similares permiten explicar la biosíntesis de los alcaloides del tropano aislados de *Atropa hyoscinus*, o *Datura* de las solanáceas.

Ejemplo característico de estos alcaloides son la atropina, la hiosciamina (escopolamina) de *Datura stramonium*.

La hiosciamina es un éster ópticamente activo del alcohol quiral tropina con el ácido(s)-trópico ópticamente activo; procedente biogénicamente de la fenilalanina a través del ácido 3 – fenil – láctico.

La atropina es el éster ópticamente inactivo formado por la tropaína y el ácido trópico racémico y es posible que sea en realidad un artefacto producido por racemización total o parcial de la Hiosciamina durante el proceso de aislamiento.

Un sistema bicíclico similar a los alcaloides del tropano se encuentra en los compuestos anatoxina A y epibatina.

La anatoxina A es extremadamente tóxica aislada de la cianobacteria *Anabaena flos aqueae* que prolifera en aguas estancadas. La epibatidina se encuentra en la piel de la rana venenosa sudamericana *Epipadobates tricolor* es un analgésico más poderoso que la morfina y no tiene propiedades adictivas.

- (-)Higrina aislada de *Erythroxyton spp.*
- (-) Hiosciamina aislada de **Hyosciamus spp.** También se puede aislar de *Brugmansia spp.*
- (-) Pelietierina aislada de *Punica granatum.*
- Lupimina aislada de *Lupinus luteus.*
- Esparteina aislada de *Espartium juceum.*

#### **2.4.2.4. Alcaloides provenientes de la histidina.**

La histidina es el aminoácido del cual derivan los alcaloides imidazólicos. Estos alcaloides constituyen un grupo muy pequeño y de localización muy restringida en la naturaleza, como en algunas pocas especies de las familias Rutaceae, Euforbiaceae, Fabaceae, Cactaceae.

- Dolicotelina aislada de *Dolichotelia sphaerica*
- Pilocarpina aislada de *Pilocarpus spp.* Especie arbustiva de la que se extrae este alcaloide, que posee actividad parasimpaticomimética y se emplea principalmente en forma de colirio en el tratamiento de glaucoma.

#### **2.4.2.5. Alcaloides provenientes del ácido nicotínico**

El ácido nicotínico, que se biosintetiza a partir del ácido aspártico por condensación con el gliceraldehído-fosfato (vía ácido quinolínico), es el precursor de los denominados alcaloides piridínicos. Son químicamente similares a los piperidínicos, excepto que su núcleo se encuentra insaturado.

Ejemplos: la nicotina, la nornicotina, anatabina, ricinina, dioscorina, anabasina, miosmina, nicotirina, etc. En el tabaco (*Nicotiana tabacum*), los alcaloides se encuentran mayormente en las hojas, en cantidades variables dependiendo del modo de cultivo y de la variedad (entre un 2 a 10%). La nicotina producida por síntesis, tiene un alto grado de toxicidad, pudiendo ocasionar la muerte por parálisis cardíaca cuando se ingiere pura. La anabasina, de estructura similar a la de la nicotina, es un alcaloide que se encuentra en *Nicotiana glauca*. Su uso principal (histórico) fue como insecticida

- Nicotina aislada de *Nicotiana tabacum*.
- Ricinina aislada de *Ricinus communis*.
- Anabasina aislada de *Nicotiana tabacum*

#### 2.4.2.6. Pseudo alcaloides.<sup>12,20</sup>

Poseen normalmente todas las características de los alcaloides verdaderos pero no se forman a partir de aminoácidos. En la mayoría de los casos conocidos se trata de isoprenoides, de allí que se los nombre como alcaloides terpénicos; por ejemplo los alcaloides monoterpénicos:

- Como la b-esquitantina en *Skytanthus acutus* (cuerno de cabra);
- alcaloides diterpénicos, como la aconitina en tubérculos de *Aconitum napellus* (acónito);
- triterpenoides, como la tomatidina en Solanaceae y sesquiterpénicos en nenúfares (Nymphaeaceae). Igualmente se conocen sustancias nitrogenadas heterocíclicas que provienen del metabolismo del acetato, como la conina, principio tóxico de la cicuta.
- Cafeína y teofilina aislada de *Coffea arabica*
- Teobromina aislada de *Theobroma cacao* son de los niveles de los nucleótidos de la purina, incluyendo las bases purícas del ácido nucleico está formado por un verdadero mosaico biogénico en el que cada átomo tiene un origen diferente donde se puede hallar

la presencia de un nitrógeno en posición 7 aportado por la glicina, un nitrógeno del heterociclo en posición 1 y 3 aportado por el ácido aspártico, el fragmento de un grupo sustituyente metilo en posición 7 el fragmento de este grupo metilo como metino en posición 8 y una amida de glutamina.

## **2.5. Biogénesis de los Alcaloides**

Todos los alcaloides verdaderos proceden de aminoácidos precursores cuyas estructuras pueden ser:

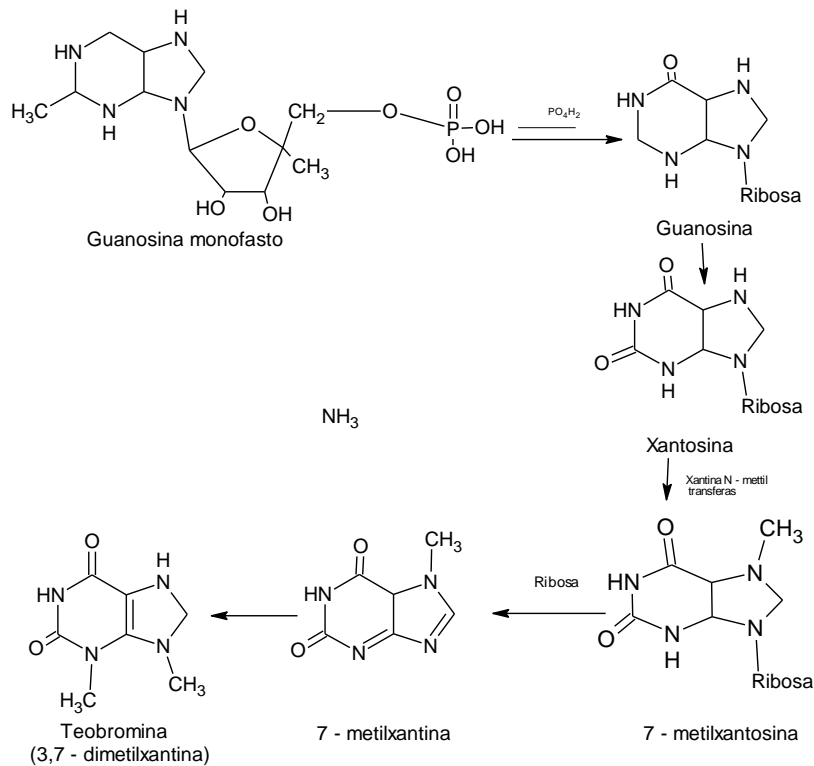
- Alifáticos como ornitina, lisina e histidina
- Aromáticas como: fenilalanina, tirosina y triptófano.
- También interviene bases purínicas para la formación de pseudo alcaloides como teobromina.

### **2.5.1. Alcaloide derivado de la purina: Teobromina.**

Los alcaloides derivados de bases son purínicas conocidas como pseudo alcaloides tales como teobromina, cafeína, teofilina tienen un origen biosintético común e intervienen en su formación varios aminoácidos que aportan parte de su estructura.

#### **2.5.1.1. Ruta de formación de la Teobromina**

La ruta mayor para llegar a la síntesis de la teobromina sigue los pasos siguientes:(Figura 2)



**Fig. 2. Biosíntesis de la teobromina.**

Según Misako K. et al, poco se conoce acerca de las propiedades de las enzimas que participan en la biosíntesis de la teobromina<sup>8,28</sup>

La guanosina monofosfato se transforma en guanosina por pérdida del  $\text{PO}_4\text{H}_3$ . La guanosina se oxida en posición 2 y forma la xantósina, que por acción de la xantina – N – metil transferasa se metila en posición 7 y forma la 7– metilxantósina; este pierde el azúcar pentósico (ribosa) y se convierte en 7 – metilxantina, que luego por acción de la xantina N – metil transferasa se metila en posición 3 dando lugar a la Teobromina (3,7 – dimetilxantina)



## 2.6. Métodos de identificación cualitativa de los alcaloides.

### 2.6.1. Reactivos de precipitación.<sup>12,20</sup>

La técnica de identificación de los alcaloides verdaderos se puede realizar mediante la precipitación de la muestra con reactivos específicos.

Se basa en la capacidad que tienen los alcaloides de formar precipitados insolubles, cuyo color y forma cristalina en ciertos casos depende del reactivo precipitante.

Entre los reactivos de precipitación se encuentran el Iodo/ioduro de potasio (Reactivo de Bouchardt). El nitrato de bismuto en ácido nítrico concentrado (Reactivo de Dragendorff), el mercurio y ioduro de potasio (Reactivo de Mayer) el ácido fosfo-túngstico (Reactivo de Schleibler), el ácido fosfo-molíb dico (Reactivo de Sonneschein), el sulfovanadato de amonio (Reactivo de Mandelein), etc.

- El reactivo de Bouchardt da con los alcaloides precipitados floculentos que varían de color café a rojo o pardo oscuros.
- El reactivo de Dragendorff en solución débilmente acidulada con ácido sulfúrico da precipitados da color rojo o anaranjado amorfo poco estables y cristalizables.
- El reactivo de Mayer da en casi todos las soluciones de los alcaloides color blanco, blanco amarillento o amarillo limón claro.
- El reactivo de Mandelein da con los alcaloides color azul.
- El reactivo de Schleiber da con las soluciones de alcaloides precipitados de color blanco.
- El reactivo de Sonneschein da con las soluciones de alcaloides precipitados de color blanco amarillento.
- El reactivo Silico-túngstico con las soluciones de alcaloides forma precipitados cristalinos.
- El Reineckato de amonio da con las soluciones de alcaloides, precipitados floculentos de color rosa, el precipitado puede recrystalizarse en acetona al 50%.

### 2.6.2. Reactivos de coloración o cromogénico<sup>12</sup>

- El reactivo de URK produce con los alcaloides indólicos una coloración violeta. Este reactivo se prepara disolviendo 1 gramo de 4 - dimetil-amina benzaldehído en 100ml de ácido sulfúrico al 65%.
- El reactivo de Vitali da con los alcaloides del grupo tropáno una coloración violeta. Este reactivo se prepara colocando en 1 capsulita de porcelana 10mg del alcaloide y 1mL de HNO<sub>3</sub> fumante a continuación se evapora al baño María, al residuo frío se añade 3 gotas de solución etanólico de ioduro de potasio (IK), produce una coloración violeta.
- El reactivo denominado murexida: Se usa especialmente para identificar grupos del ácido úrico-purinas.

Este es el reactivo obligado para identificar compuestos alcaloidales, que tienen el grupo purínico tales como el ácido úrico, la guanina, la xantina y sus derivados 1,3 sustituidos (teofilina), 3,7-sustituidos(teobromina) y 1,3,7 sustituidos (cafeína), todos ellos con la murexida producen una coloración rojo-púrpura.

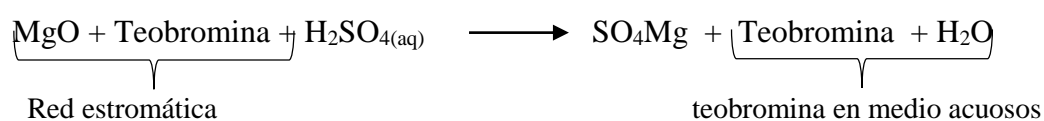
Utilizando este reactivo se identificó preliminarmente la presencia de Teobromina en *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago). Este método es recomendado por Harborne J.B<sup>7</sup> ya que los derivados purínicos como teobromina no dan prueba positiva con los reactivos de precipitación es esta razón por la que Schultes Evans R.E en 1967 no encontró presencia de alcaloides en *Herrania camargoana* muy a pesar de que logró probar el amargor de las semillas.

### 2.7. Proceso de aislamiento de alcaloides purínicos. Con sustancias de inclusión.

Una sustancia de inclusión ideal es aquella que tiene porosidades donde pueden quedar retenidas ciertos tipos de moléculas cuyo diámetro exterior es igual al diámetro interior de los espacios vacíos de la sustancia de inclusión. La molécula conocida como huésped queda retenida en la sustancia de inclusión llamado también hospedero. Huésped y hospedero forman la red estromática donde queda retenido temporalmente el huésped.

Los alcaloides derivados de las purinas no responden a los métodos generales de aislamiento de los alcaloides. Por eso Harborne J.B, siguiendo la experiencia de Rafael Ikan, ha señalado un método que consiste en utilizar el óxido de magnesio como sustancia de inclusión en los espacios vacíos de su red cristalina, el huésped queda adsorbido. Este método ya había sido experimentado por Lieb Wolfgang Schoneger Hans para aislar cafeína del té mucho antes que Rafael Ikan le diera vigencia.

El procedimiento es el siguiente: se seca las semillas o las partes del vegetal del que se quiere aislar alcaloides purinicos se lleva a polvo fino se extrae con etanol en un soxhlet por varias horas, se filtra, el filtrado se vierte sobre el óxido de magnesio se agita convenientemente para que adsorba la teobromina, la mezcla se lleva a sequedad (secador de arena a 50 °C) y se forma una inclusión de magnesio más teobromina que produce una red estromática, para romper esta red y soltar la teobromina se vierte ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 10% sobre ella dejando en libertad la teobromina, según la siguiente reacción.



Se filtra, para romper el SO<sub>4</sub>Mg que queda retenida en el papel de filtro mientras que la solución acuosa filtrada se halla presente la teobromina, del qué es extractada en pera de decantación con cloroformo. Se evapora el cloroformo en rotavapor y queda la teobromina sólida

La teobromina se cristaliza en solución 0.01N de bicarbonato de sodio obteniéndose unas agujas rómbicas blandas y sedosas cuyo punto de fusión es 357°C<sup>24,26</sup>.

Trease – Evans señala que el aislamiento a escala industrial consiste en hervir en agua las cubiertas externas del (cacao), previamente trituradas después se filtra y se precipitan los taninos con acetato de plomo. Se hace burbujear sobre el filtrado SH<sub>2</sub> producida en un generador de Kipp para eliminar el plomo como sulfato de plomo (PbsO<sub>4</sub>) se filtra y el filtrado se evapora a sequedad<sup>25,26</sup>.

Finalmente la teobromina se extrae del residuo con alcohol y se purifica por recristalización en agua.

El primer método señalado por Harborne J.B<sup>7</sup> es el más adecuado para nuestro propósito porque prescinde del acetato de plomo que es un reactivo sumamente tóxico (Produce insuficiencia renal aguda)

## **2.8. Pruebas de identificación de la teobromina**

La teobromina se identifica cualitativamente con reactivos de coloración como la reacción de la Murexida.

También puede ser detectado en placas fluorescentes con luz ultravioleta. La detección también es posible chisgueteando con solución de Iodo resublimado o por exposición a vapores de Iodo.

Por último la Teobromina también se detecta por clorinación y luego chisgueteando con una solución de Iodo, cloruro férrico en acetona conteniendo ácido tartárico.

Se prepara 5g de cloruro férrico y 2g de Iodo, se disuelve en una mezcla de 50ml de acetona y 50ml de una solución acuosa de ácido tartárico al 20%.

## **2.9. Pruebas Fisicoquímicas para la determinación de la teobromina aislada de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélago).**

### **2.9.1. Punto de fusión**

Es una prueba importante en la elucidación de la estructura química de una sustancia ya conocida, cuando se halla en estado de pureza. (Cristales en estado sólido).

En la búsqueda de sustancias ya conocida como teobromina, que se quiere averiguar su presencia en otras especies vegetales que no sea del género Theobroma es necesario disponer de un patrón para compararlo con la sustancia aislada para lo cual se mezclan el patrón y la sustancia aislada se les reduce a partículas finas y luego se lleva al aparato Fischer Jhon's, si en el momento en que se funde no hay depresión en el punto de fusión de la muestra patrón, quiere decir que la sustancia aislada es igual que el patrón.

En otro caso si no se dispone del patrón se mide el punto de fusión de la muestra aislada y se compara el valor obtenido con los de las tablas de la literatura<sup>27</sup> que para el caso de la teobromina es de 357°C.

Valores idénticos confirman que se trata de una misma sustancia.

#### **2.9.1.1. Aparatos para determinar el punto de fusión**

Existe el clásico aparato de Thiele que se usa cuando no se dispone de equipos modernos, los equipos modernos son: Aparato Fischer Jhon's, aparato de Nalge – Axelrod, etc.

Estos 2 equipos funcionan electrónicamente, poseen termómetro de registro automático platina para colocar la muestra, foco de iluminación y lupa para aumentar el tamaño de lo observable.

En el Nalge – Axelrod la lupa ha sido remplazado por un microscopio de 25 aumentos para observar nítidamente la fusión de la muestra desde el inicio hasta el final.

#### **2.10. Prueba organoléptica.**

Consiste en probar un pequeño cristal de la muestra aislada, si el sabor es amargo no persistente se trata de teobromina.

#### **2.11. Por cromatografía de capa fina (TLC)**

Se utiliza cromatófolios de silicagel básica y se corre con solventes neutros o se puede utilizar silicagel neutra con solventes básicos.<sup>24</sup>

El método elegido consiste en tomar un cromatófolio, cuya placa fue elaborado con a base de silicagel G<sub>254</sub> en esta placa se extiende en rayas la solución de teobromina cloroformo a 2 cm arriba del extremo inicial (base) de la placa.

Se saturo la cámara cromatográfica (Chamber Chromatography) con amonio humedeciendo con papel filtro las paredes de la cámara.

El solvente utilizado para la resolución es una mezcla de acetona – cloroformo – n-butanol – hidróxido de amonio al 25% (30+30+40+10).

Una sustancia pura que durante la corrida cromatográfica da una sola franja con un valor  $R_f \times 100 = 47$ , al consultar con la literatura corresponde a la Teobromina<sup>24</sup>.

## 2.12. Pruebas espectrométricas para la determinación de la teobromina aislada de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago).

### 2.12.1. Por espectrometría ultra - violeta visible

Un espectro ultra – violeta visible mide los valores de absorción de una molécula en longitudes de onda.

El equipo puede detectar los dienos conjugados entre 2 dobles enlaces  $C = C - C = C$ , o más.

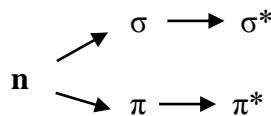
Las purinas naturales presentan una intensa banda  $E_{m\acute{a}x} > 3000$  por debajo de 220nm y otra banda a 263nm ( $E_{m\acute{a}x} > 8000$ ), pero son sensibles a los cambios de pH del medio.

Todas las purinas naturales presentan una banda de absorción entre 250 – 290nm.

Cafeína puede hallarse en un  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de 278nm y en un valor de  $E_{m\acute{a}x}$  de 10 900, Teofilina a 274nm y un  $E_{m\acute{a}x}$  9 100, Teobromina es propiamente un isómero de la teofilina y tienepor  $\lambda_{m\acute{a}x}$ . Aproximadamente a 275nm.

En el área de detección del equipo se registra el espectro (espectrograma) en forma de transmitancia o su recíproca  $\frac{1}{T} = A$  absorbancia.

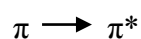
La absorbancia de la molécula de teobromina se debe a la estructura electrónica del grupo  $C = O$  que tiene las transiciones siguientes<sup>30,31</sup>.



Y las transiciones



Comprenden a las interacciones



El valor de  $\lambda_{\text{máx}}$  toma también en consideración los dos sustituyentes metílicos (alquílicos) en posición 3 y 7.

### 2.12.1.1. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

La técnica espectroscópica de resonancia magnética nuclear (RMN), es una de las técnicas más poderosas para la elucidación de la estructura química. El principio de esta técnica se basa en la separación de los estados de los espines nucleares en presencia de un campo magnético intenso. La muestra en presencia del campo magnético es irradiada con una radiofrecuencia, específica para cada núcleo que se desea estudiar. En el caso de la RMN del isótopo de hidrógeno  $^1\text{H}$  (protón), la gráfica se interpreta en función del desplazamiento químico, constantes de acoplamiento y el área bajo la curva de cada señal.<sup>28,31</sup>

El núcleo de un átomo está cargado de partículas que rotan como los electrones y se considera que tienen un estado de spin.

El núcleo puede compararse con las manecilla de un reloj que giran en un sentido u otro, esto se conoce como los estados de spin  $\uparrow$   $\downarrow$  )<sup>31</sup>.

El campo magnético que generan actúa igual que una pequeña barra magnética, o semejante a las agujas de una brújula.

Esta pequeña barra magnética puede ser alineada con o contra un campo magnético externo<sup>31</sup>.

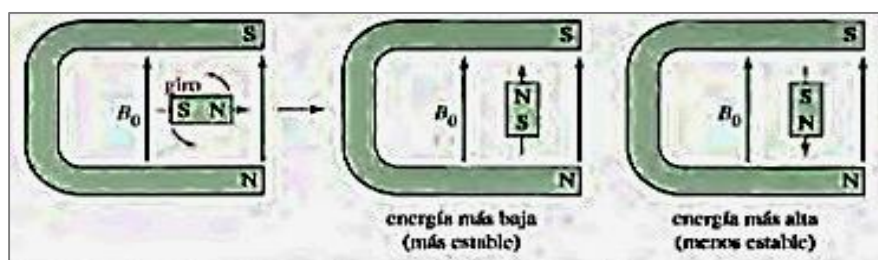


Fig. 3: Imán moviéndose por efecto de un campo magnético externo

Este mismo efecto se produce cuando se coloca un protón en un campo magnético externo ( $B_0$ ).

Según la mecánica cuántica se requiere que el momento magnético del protón se alinee bien en el mismo sentido del campo magnético externo o en el sentido contrario al campo externo.<sup>31</sup>

Al estado de energía más bajo se produce cuando el protón se alinea con el campo (donde polos opuestos se atraen) se conoce como estado de spin alfa  $\downarrow\uparrow$  ( $\alpha$ )<sup>31</sup>.

El estado de energía más alto con el patrón alineado en contra el campo magnético externo (polos del mismo signo con polos del campo externo del mismo signo) se le conoce como estado de spin beta  $\uparrow\uparrow$  ( $\beta$ )

En ausencia de campo magnético externo los momentos magnéticos del protón están orientados al azar. Cuando se aplica un momento magnético externo cada protón de la muestra adquiere el estado alfa ( $\alpha$ ) o el estado beta ( $\beta$ ). Como el estado alfa ( $\alpha$ ) es muy bajo en energía hay más espines alfa ( $\alpha$ ) que beta ( $\beta$ )<sup>31</sup>.

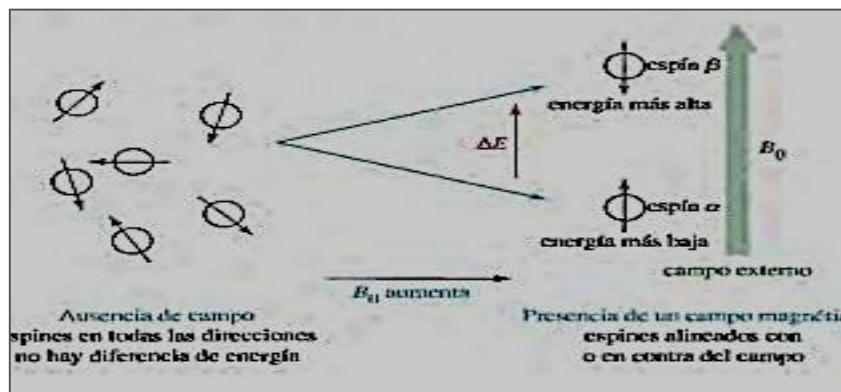


Fig.4 Energía de los espines



La energía requerida para que el núcleo cambie la dirección del spin deberá ser exactamente la diferencia de energía entre los 2 estados de spin  $\Delta E$ .

La energía requerida para lanzar un spin del nivel alfa ( $\alpha$ ) al beta ( $\beta$ ) es muy pequeña del orden de  $10^{-5}$  KJ/mol

El rango de frecuencia de radio ondas en los espectrómetros de resonancia magnética nuclear son usualmente descritos en términos de frecuencia de radioondas.

El espectrómetro más antiguo y de baja resolución opera a 100MHz de frecuencia la cual se expresa en Herzios o segundos. Los instrumentos de mayor resolución operan en rangos de 300, 400, 900 MHz y se espera que pronto se construya un espectrómetro de 1 Gigaherzio.

La intensidad y frecuencia de radiación emitido es analizado por un proceso matemático llamado transformada de Fourier (FT)<sup>31</sup>.

Los espectrómetros con transformada de Fourier ofrecen muchas ventajas en relación con los espectrómetros de onda continua por su velocidad y resolución.

La cantidad de muestra que debe ser analizada por un espectrómetro es de aproximadamente 1.5.mg disuelto en 0.6 ml de disolvente.

El disolvente utilizado no debe contener núcleos que absorben energía de radioondas en el rango en que los protones absorben radiación. Los solventes más usados pueden ser:

Cloroformo deuterado, tetracloruro de carbono y agua deuterada.

El espectrómetro de RMN consta de las partes siguientes:

- a) Un imán fijo que produce un campo magnético preciso con un sistema de control de campo.
- b) Un transmisor de radiofrecuencias capaz de emitir ondas a una frecuencia precisa.

- c) Un detector para medir la absorción de la energía de radiofrecuencia por parte de la muestra.
- d) Un registrador que grafica la señal de salida del detector frente al campo magnético aplicado.

El registrador imprime un gráfico que es un conjunto de picos cuya intensidad se registra en el eje Y y como una función del campo magnético aplicado en el eje X<sup>31</sup>; a campo alto y campo bajo se registra el valor de los desplazamientos.

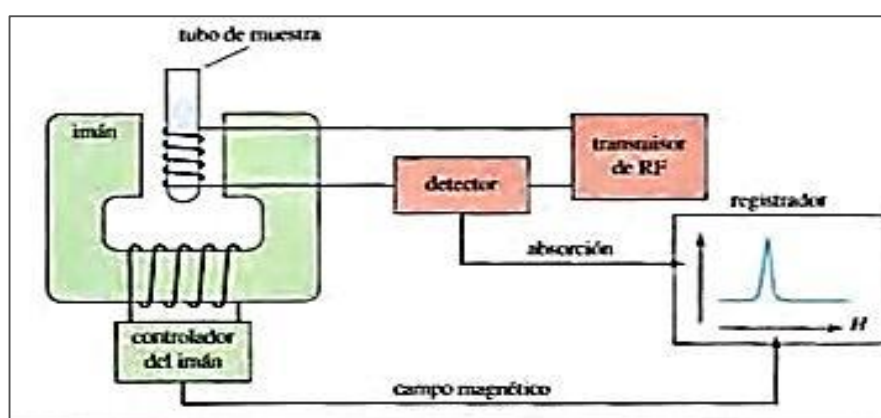
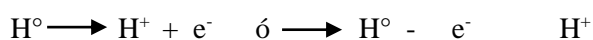


Fig.5 Diagrama de las partes que contiene un espectrómetro de RMN (Tomado de Química Orgánica de Wade L.J Jr. V Edición Editorial Pearson)

### 2.12.1.2. Resonancia magnética nuclear de protones

Para diferenciar un protón de un átomo de hidrógeno diremos que el protón es el átomo de hidrógeno que ha perdido un electrón.



En la RMN de protones se estudia los átomos de hidrógeno covalentes enlazados a otro átomo generalmente al carbono (No es el estudio de los protones libres).<sup>31</sup>

Sin embargo en las discusiones de RMN de protones se utilizan los términos protón y átomo de carbono intercambiable.

Para que la Resonancia Magnética Nuclear de Protones 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 conocida como densidad electrónica.

El campo magnético externo produce una fuerza (torque) sobre el electrón forzándole a que genere un campo magnético local ( $H_{\text{local}}$ ) que se opone al campo magnético externo ( $H_0$ )

La densidad de electrones alrededor del hidrógeno es diferente cuando los protones se hallan en diferentes ambientes químicos.

La diferencia entre el campo magnético externo ( $H_0$ ) y el campo magnético local ( $H_{\text{local}}$ ) genera un campo magnético efectivo:

$$H_{\text{eff}} = H_0 - H_{\text{local}}$$

A los protones que se hallan en diferentes ambientes químicos se conoce como los protones no equivalentes, mientras los protones en un ambiente idéntico se llaman protones equivalentes.

Como los protones de los compuestos orgánicos no están aislados están rodeados de electrones que los 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 aplicado.

En una molécula la nube de electrones que hay alrededor del 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 en el campo externo y se dice que el núcleo está apantallado.

El campo magnético total en el protón apantallado es siempre más débil que el campo externo, por lo que se debe aumentar el campo aplicado para que se produzca resonancia a una frecuencia dada.

Cuando los protones están más apantallados absorben energía a un campo más alto, cuando los protones absorben energía a un campo más bajo se dice que están menos apantallados.

El número de absorciones diferentes se llaman señales o picos, indican cuantas clases de protones están presentes, otros dos aspectos de la resonancia magnética nuclear de protones son las intensidades de las señales y sus modos de desdoblamiento. Las intensidades de las señales son indicativos de cuantos protones de cada tipo están presentes, el desdoblamiento de las señales dan información sobre los protones próximos.

Las variaciones en las porciones de las absorciones débiles al apantallamiento se conoce como desplazamiento químico y es la diferencia en partes por millón (ppm) entre las frecuencias de resonancia del protón observada y del tetrametilsilano

El desplazamiento químico ( $\delta$ ) en partes por millón es <sup>31</sup>

$$\delta = \frac{\text{Desplazamiento del campo respecto al TMS(Hz)}}{\text{frecuencia del espectrómetro(MHz)}}$$

### 2.12.1.3. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono13.

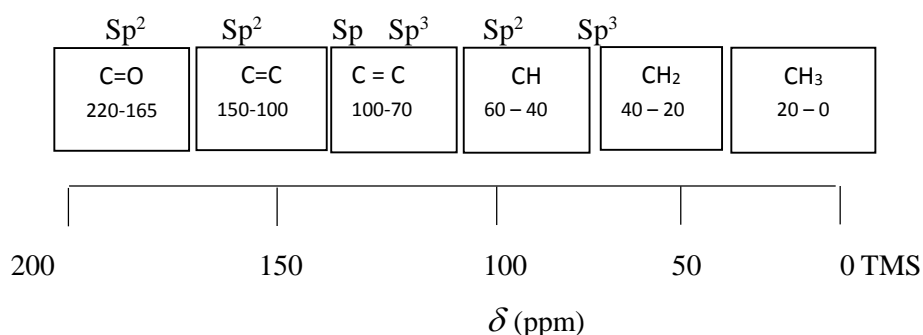
La identificación de un compuesto es obtenido analizando el espectro C – 13 en relación a un espectro de protones. Hay varias diferencias entre RMNH<sup>+</sup> y RMNC – 13.

Las señales del espectro de C-13 no tienen al mismo desplazamiento que en el espectro de protones, mientras en el espectro de protones los desplazamientos ocurren a un rango de 0 – 10 ppm en el espectro

de C-13 aparecen entre 0 – 220 ppm. Este constituye una ventaja para la resonancia magnética nuclear de C-13, debido a que las observaciones se dan en un rango más amplio que la absorción de protones lo que permite una lectura más fácil, pues indica cómo están distribuidos los desplazamientos en C-13 en función de las estructuras  $sp$ ,  $sp^2$ ,  $sp^3$ , también hay menos posibilidad de hallar picos de traslapamiento no equivalente<sup>31</sup>.

Cuando los multipletes se traslapan es difícil determinar cuál pico pertenece a cada multiplete de traslapamiento.

El rango aproximado para desplazamiento químico de átomos de carbono no equivalentes se muestra en la figura 6<sup>32</sup>.



**Fig. 6.** Valores de desplazamiento químico aproximados para RMNC-13 (Tomado de Organic Chemistry Demystified de Bloch Daniel).

### 2.13. Elucidación estructural del compuesto aislado.

Se utilizará los métodos espectrométricos siguientes:

- Espectrometría UV – Visible.
- Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMNH<sup>+</sup>)
- Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de C-13.

Así mismo se utilizaran métodos fisicoquímicos complementarios tales como:

- Determinación del Punto de fusión en el aparato KISATOM
- Determinación del valor de R<sub>f</sub> X 100 por cromatografía de capa fina (TLC), que se complementará con el valor observado de la literatura
- Propiedad organoléptica del compuesto aislado (sabor).

#### **2.14. Hipótesis**

La semilla de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélago) contiene Teobromina y se puede elucidar su estructura por métodos espectro métricos.

#### **2.15. Variables operacionales.**

##### **2.15.1. Variable independiente.**

Aislamiento de teobromina de semilla de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélago)

##### **2.15.2. Variable dependiente.**

Elucidación estructural por espectrometría.

## 2.1. Operacionalización de las Variables

### 2.1.1. Variable Independiente.

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo y escala de variable	Índice
<p>Aislamiento de teobromina de semilla de <i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélagos)</p>	<p><i>Herrania nítida</i> (Poepp) Schultes (Cacahuillo de murciélagos), según la filogenia del clado mayor de la familia Malvaceae se hallan junto con <i>Theobroma cacao</i> (cacao) en el grupo de los esterculoideae, es decir que filogenéticamente están emparentados con el cacao y tan igual que éste biogenéticamente puede producir teobromina un alcaloide de gran utilidad en la industria farmacéutica para el tratamiento de enfermedades: asma y bronquitis, insuficiencia renal (diurético) estimulante del corazón, etc.</p>	<p>Para obtener teobromina de esta planta se muelen las semillas secas se desengrasa y se extrae con agua hervida luego se filtra y el filtrado se vierte sobre óxido de magnesio que actúa como inclusión adsorbiendo las moléculas de Teobromina, incluyéndolos dentro de su estructura molecular que forman una red estromática se lleva a sequedad la mezcla huésped – hospedero en baño de arena luego se hace reaccionar con ácido sulfúrico al 10% para romper la red estromática formada y deja en libertad a la teobromina que se extrae en cloroformo el extracto orgánico se cristaliza primero con agua y luego con alcohol y se obtiene teobromina pura que cristaliza en forma romboédrica de color blanco y consistencia sedosa</p>	<p>Principio activo (teobromina)</p>	<p>Rendimiento de teobromina aislada</p>	<p>Aspecto de los cristales color blanco sedosa en forma de agujas romboédricas.</p>

### 2.1.2. Variable dependiente.

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo y escala de variable	Índice
Elucidación estructural por espectrometría	<p>El principio activo aislado será sometido a pruebas fisicoquímicas tales como:</p> <p>Determinación de los puntos de fusión para saber si el valor de la muestra es idéntico con el valor de punto de fusión de la literatura.</p> <p>Aplicación de TLC para comparar con el valor de Rf x 100 con la literatura.</p> <p>Finalmente la muestra pura se realizará su análisis espectrométricos: en UV- visible, RMNH y de C – 13 que permitirá elucidar el compuesto aislado.</p>	<p>El valor del punto de fusión de teobromina 357°C para ser comparado con el de la literatura, y señalara que se trata del mismo compuesto.</p> <p>El análisis de la muestra en cromatografía de capa fina usando placas de silicagel y usando como solventes de resolución acetona-cloroformo-n-butanol-hidróxido de amonio al 25% da un valor de Rf x100 = 47 el compuesto es teobromina.</p> <p>Mediante la prueba de espectrometría UV- visible se espera un valor de absorbancia de <math>\lambda</math> máx. <math>\cong</math> 275nm que es el valor que la literatura registra para la teobromina.</p> <p>La prueba de espectrometría de RMN de C-13 es predecible que pueda dar valores para una estructura sp<sup>2</sup> del grupo C= O en posición 2 también se podrá identificar el valor de CH (metino) en posición 8 y de 2 grupos metilos estructuras sp<sup>3</sup> en posición 3 y 7 podrá observar el doble enlace C=C de estructura sp<sup>2</sup> de los carbonos en posición 4 y 5 y preveer para RMN de protones singletes de 2 grupos metilos un singulete aislado del CH</p>	Valor del desplazamiento $\delta$ y número de picos	Valores espectrométricos UV-Visible longitudes de onda RMNH <sup>+</sup> en ppm (picos) RMN C-13 en ppm (picos)	<p>UV- Visible: Absorbancia vs <math>\lambda</math> máx.</p> <p>RMN de protones: Desplazamiento y número de picos</p> <p>RMNC-13 Desplazamiento y número de picos</p>



# CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Metodología de la investigación.

Nuestro estudio se inscribe en el tipo de investigación científica tecnológica porque está orientada a resolver problemas prácticos vinculados con los procesos industriales para solucionar la demanda de este producto a nivel mundial.<sup>22,23,24</sup> Tiene el propósito de demostrar que el principio activo conocido como teobromina no solo está presente en *Theobroma cacao* (Cacao) y otras especies de *Theobroma*, sino también en géneros que de acuerdo con los recientes estudios filogenéticos pertenecen al gran orden de las Malvales al clado de los denominados Esterculoideae; en lo que está incluido *Theobroma cacao* (Cacao), *Theobroma subincanum* (Cacao de varillal), *Theobroma bicolor* (Macambo), *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), *Theobroma obovatum* (Upcha cacao)<sup>13,14</sup>, pero además *Herrania nítida*, *Herrania mariae*, *Herrania nysterodendrum*,<sup>13,14</sup> etc., que se ubican en el mismo grupo cladístico que *Theobroma* en el que Schultes en su análisis de campo no halló Teobromina por eso el interés de este estudio consiste en demostrar que *Herrania nítida* (Poepp) Schultes no tiene uso conocido ni estudio recientes contiene alcaloide con el cual habremos contribuido con la industria farmacéutica al señalar una nueva fuente de obtención de teobromina para cubrir la demanda insatisfecha a nivel mundial. Su aislamiento utilizaría un método límpido sin contaminantes en las que todavía la industria farmacéutica no ha superado la utilización de reactivos contaminantes, pues cuando la industria farmacéutica no dispone de *Theobroma cacao* (cacao) para producir teobromina realiza su síntesis partiendo de 3 – metil ácido úrico, con pentacloruro de fósforo, un método que tiene sus inconvenientes por la formación de productos secundarios que aparecen durante la reacción<sup>4</sup>o cuando utiliza cáscara de cacao para separar taninos utiliza acetato de plomo otra sustancia sumamente tóxica.

En base a estos argumentos este trabajo se inscribe dentro del rubro denominado investigación tecnológica sustantiva porque tiene el propósito de solucionar una clara emergencia la demanda insatisfecha de Teobromina a nivel mundial para la industria farmacéutica y dejar sentado el argumento que teobromina es posible encontrar en todas las especies vegetales del clado *Esterculoideae*

### **3.2. Diseño de la investigación.**

Aquí se señala las etapas del proceso experimental tales como:

#### **3.2.1. Actividades de campo:**

- Recolección de la muestra: mazorcas maduras para el trabajo experimental flores y hojas y hojas, flores y frutos verdes para su identificación.

#### **3.2.2. Trabajo de gabinete:**

- Clasificación botánica (Herbarium Amazonense CIRNA – UNAP)

#### **3.2.3 Trabajo de laboratorio**

- Extracción de semillas: Se rompen las mazorcas para liberar las semillas.
- Lavado: De las semillas se elimina el arilo (que contiene mucilagos y azucres), este proceso se realiza mezclando las semillas con arena blanca y abundante agua se elimina la arena blanca pasando por un tamiz # 40.
- Secado de las semillas: Se realiza un proceso al aire libre y luego en estufa.
- Molienda de la semilla: Las semillas secas se pasa a un molino de discos donde se reducen a una masa adherente.

### **3.3. Aislamiento de teobromina**

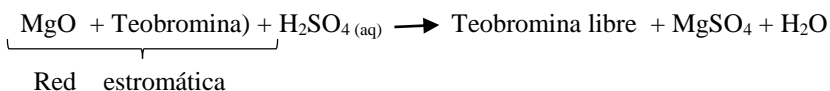
- Se realiza el desengrasado de la semillas molidas en aparato de SOXHLET durante 24 horas, con éter de petróleo , se filtra y el filtrado se evapora para obtener una solución oleosa donde el principal compuesto se conoce como mantequilla de cacao (butter oil),

- 400 gramos de semillas molidas y desengrasadas se tratan con una mezcla de alcohol, agua (60: 40) 1500mL de agua y 1000mL de alcohol por 10 horas a 80°C en hot – plate regulado
- Filtrar para separar el afrecho.
- Dejar enfriar el filtrado (2200mL) y reducir el volumen a ½ litro en rotavapor a presión reducida.

### 3.3.1. Inclusión de la teobromina en MgO

- Verter ½ litro del filtrado sobre 50gramos de óxido de magnesio para incluir la Teobromina en la estructura porosa del óxido de magnesio se debe calentar a 80°C hasta sequedad en calentador de arena se forma una red estromática en la que la teobromina es el huésped o incluido y el óxido de magnesio el hospedero, siguiendo los pasos siguientes:

- a. Romper la red estromática del óxido de magnesio con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% para dejar libre la Teobromina, en la solución acido acuoso este paso se produce la reacción siguiente:



- b. Filtrar: En el papel filtro queda retenido el MgSO<sub>4</sub>
- c. Filtrado: Del filtrado ácido – acuoso se extrae la teobromina por reparto de fases en una pera de decantación usando como reactivo orgánico cloroformo. En la fase clorofórmica se separa la teobromina por destilación en rota vapor da un residuo orgánico blanco sedoso.
- d. Cristalización: Se cristaliza el residuo orgánico con agua y se recrystaliza con alcohol como producto de la recrystalización aparecen cristales blancos sedosos de forma romboédrica.

### 3.4. Análisis del producto

Con el producto obtenido se deben llevar a cabo las pruebas fisicoquímicas siguientes:

- Determinación del punto de fusión para comparar el punto de fusión de la muestra de teobromina aislada con el de la literatura<sup>3,17</sup>, si los valores son iguales se trata del mismo compuesto.
- Determinación de  $R_f \times 100$  en TLC: Esta prueba cromatográfica se realiza siguiendo las indicaciones de Stalh y Egon<sup>24</sup>. Para derivados de la xantina se utiliza capas de sílica gel básica con solventes neutros o capas de sílica gel neutros con solventes básicos. La separación de teobromina, cafeína y teofilina se llevan a cabo sobre placas de silicagel de HF<sub>254</sub> muestra que ha sido preparada con solución de piperazina.

La teobromina se puede separar en capas de silicagel G usando como solventes de resolución acetona: cloroformo: n – butanol: hidróxido de amonio al 25% (30: 30: 40: 10) en cámaras de resolución normal.

El valor de  $R_f \times 100 = 47$

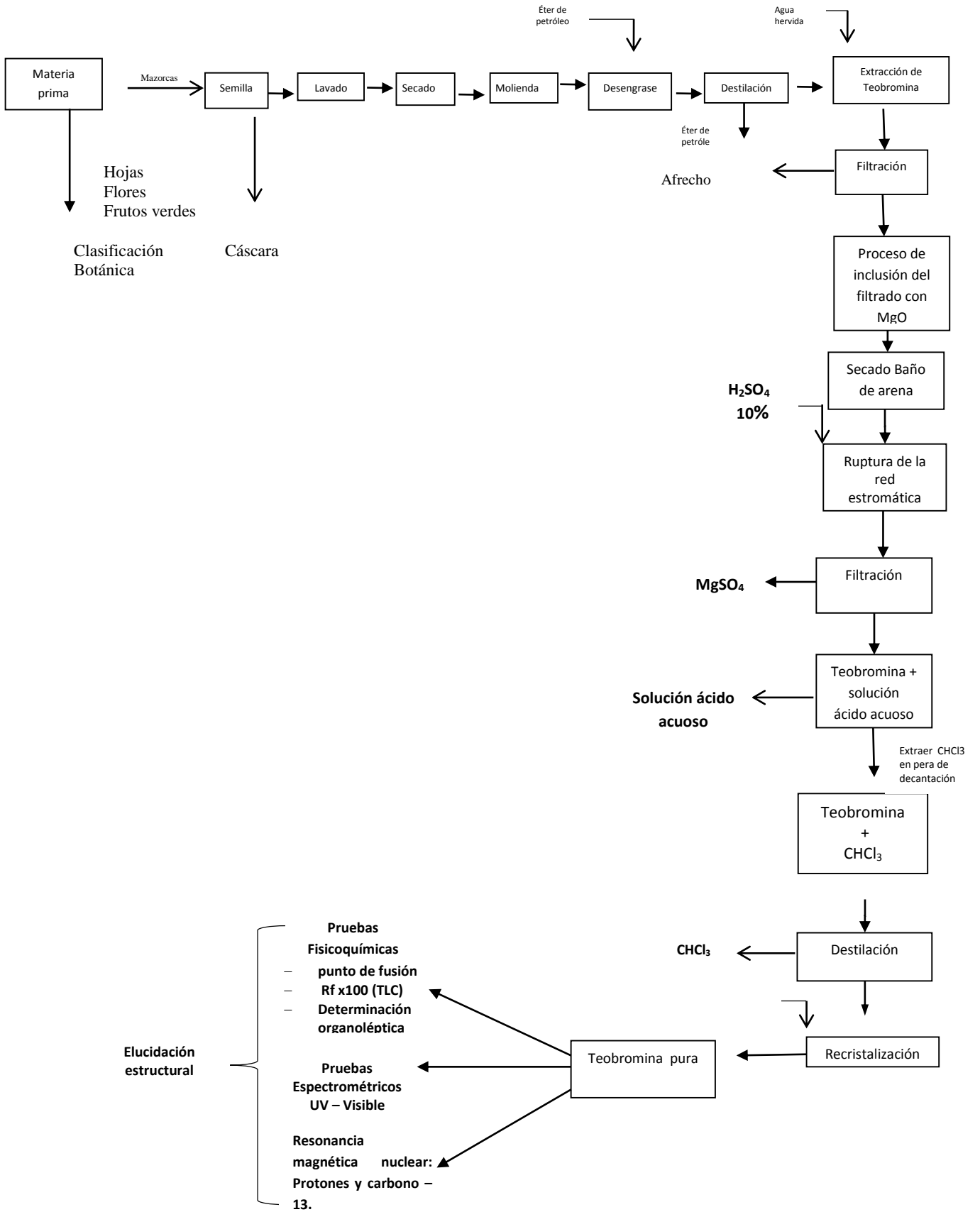
Aplicando este método si obtenemos un valor experimental que semejante al de la literatura es indubitable que nos hallamos frente al mismo compuesto.

- Prueba organoléptica del sabor: Es una prueba física que consta en probar con la lengua un cristal de la muestra, si el sabor es amargo no persistente de seguro que se trata de la teobromina

### **3.5. Elucidación de la estructura química por espectrometría**

- Espectrometría UV-Visible en el laboratorio de análisis por instrumentación del facultad de Ingeniería Química- UNAP (Espectro GENESIS VI)
- Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de protones en la PUCP.
- Espectrometría de resonancia Magnética Nuclear de C-13 en la PUCP 300MHz
- Elucidación estructural de la Teobromina con interpretación de los espectros: UV – Visible de Resonancia Magnética Nuclear de protones y de C – 13.

### 3.6. Flow Sheet de Bloque



### **3.7. Población y muestra**

#### **3.7.1. Población.**

Son las plantas *Herrania nítida* que se pueda encontrar en 50 Has de superficie de bosque del fundo IPIB – SAC del Km. 21 Carretera Iquitos – Nauta variante al caserío Villa el Buen Pastor.

#### **3.7.2. Muestra.**

Está compuesta por: frutos maduros.

Frutos: pequeños flores y hojas para su clasificación botánica

Frutos: maduros para el estudio consta 40 mazorcas ~800 gramos. Peso seco 500gramos.

#### **3.7.3. Criterio de inclusión**

Frutos maduros y sanos con mayor concentración de teobromina

#### **3.7.4. Criterios de exclusión.**

Frutos verdes o frutos atacados por insectos y hongos

### **3.8. Procedimientos, técnicas de recolección de datos**

- Información preliminar sobre la planta en estudio, visita de campo toma fotográfica y recolección de muestra.
- Evaluación botánica.
- Tratamiento de las mazorcas para separar la semilla para el análisis preliminar y para el estudio.
- Pruebas preliminares de teobromina.
- Referencias bibliográficas sobre la planta en estudio: Revistas Científicas: Chemical Abstract, Tetrahedron Letters, Phytochemistry, Science, Natural Products, etc. Referencias obtenidas del banco de datos: NAPRALERT. Chicago – USA.
- Libros de técnicas fitoquímicas de aislamiento de alcaloides purinicos.
- Libros para la elucidación de estructuras químicas Por métodos espectrométricos: UV – Visible, RMNH<sup>+</sup> y de C-13.

### **3.9. Instrumentos, materiales y reactivos.**

#### **3.9.1. Instrumentos/equipos.**

- Equipo de SOXHLET
- Revelador UV – Visible 254 – 366nm.
- Equipo Kison para punto fusión
- Equipo Génesis VI espectrometría UV-Visible
- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear BRUKER
- Balanza analítica OHAUS
- Estufa Memmert´
- Hot plate
- Molino de disco

#### **3.9.2. Material de vidrio y/o porcelana.**

- Pera de decantación.
- Vasos de precipitado de 2L, 1L, 500mL, 100mL, 50mL
- Embudo de Buchner.
- Luna de reloj.
- Placas de prueba a la gota.
- Desecador de vidrio.
- Cámara de cromatografía de capa fina.

#### **3.9.3. Materiales de metal.**

- Soporte universal
- Pinzas
- Aros

#### **3.9.4. Materiales de filtración y cromatografía.**

- Algodón
- Papel filtro
- Cromatófolios de silicagel.



### **3.9.5. Materiales de inclusión**

- Óxido de magnesio

### **3.9.6. Reactivos.**

- Cloroformo.
- Diclorometano.
- Etanol.
- Acetona.
- Hidróxido de amonio.
- N-butanol.
- Óxido de magnesio.
- Ácido nítrico
- Clorato de potasio.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido sulfúrico
- Agua destilada

### **3.9.7. Materiales de bioseguridad**

- Máscaras.
- Guantes.
- Mandil

### **3.10. Aspectos éticos.**

La muestra tomada para el estudio no causa ningún impacto ambiental además tampoco se hará pruebas in – vivo con animales ni otras especies viviente.

### **3.11. Procedimiento experimental.**

40 mazorcas se lavan previamente con detergente, se secó sobre periódicos. Las mazorcas libres de humedad se rompieron suavemente y se quitaron las semillas. Se mezclaron con arena blanca para quitar el arilo y las sustancias mucilaginosas.

Se lavó en tamiz 40 ASTM para separar la arena y las semillas libres de arilo y mucilago

Se llevan a secado el exceso de humedad se quitó en la estufa Menmert a 70°C se pesó y se obtuvo 500g.

Se molió en molino de disco y se obtuvo 500g.

Se preparó 10 cartuchos de 50g cada uno y se llevó al equipo soxhlet para su desengrase con éter de petróleo por 20 horas.

Se pesó las semillas molidas y desengrasadas y se obtuvo 480g. Las semillas molidas y desengrasadas se calentaron en 2.5L de mezcla agua alcohol 60:40 v/v por 5 horas a temperatura de 70°C en hot plate regulable.

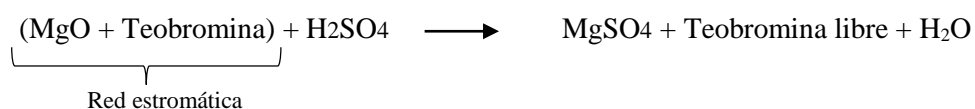
Se dejó enfriar y se filtró, se descartó el afrecho y el extracto alcohólico – acuoso.

Se virtió sobre 50g de óxido de magnesio

Se llevó la mezcla a sequedad en baño de arena a 50°C

Se formó la red estromática en cuyos poros queda retenido la teobromina. En la red cristalina la teobromina es el huésped o incluido y el hospedero o dueño de la casa u hotel es el óxido de magnesio cristalino.

Se rompe la red para dejar libre la teobromina agregando 1/2L de solución de ácido sulfúrico al 10%, en esta etapa se desarrolla la reacción siguiente:



Se filtró para separar el MgSO<sub>4</sub> que se descarta y el filtrado que contiene la teobromina se separó por partición de fases en una pera de decantación, usando como solvente orgánico cloroformo, se agitó la pera muchas veces para llevar la teobromina al extracto clorofórmico, se separó de la fase ácido acuoso y se descartó.

Se destiló la fase clorofórmica en rotavapor a presión reducida y se obtuvo la teobromina que se cristalizó con agua y recristalizó en alcohol.

La teobromina cristalizada se pesó obteniéndose 8.64g.

## Evaluación del rendimiento

Muestra de semillas de <i>Herrania nítida</i> preparada	480g
Teobromina cristalizada obtenida	8.64g

## Rendimiento porcentual de teobromina

$$\text{Rendimiento porcentual de teobromina} = \frac{\text{Teobromina cristalizada obtenida} \times 100}{\text{Muestra de semillas de } \textit{Herrania} \textit{ nítida desengrasada}}$$

$$\text{Rendimiento porcentual de teobromina} = \frac{8.64g \times 100}{480g} = 1.8$$

## 3.12. Elucidación de la estructura química de la sustancia aislada

Se comprobó la estructura molecular de la sustancia aislada utilizando procesos físico-químicos y Espectrométricos.

### 3.12.1. Pruebas físico-químicas

#### 3.12.1.1. Punto de fusión.

Se comprobó en el equipo de Kistatom un equipo modificado de Nalge – Axelrod del laboratorio de Química orgánica de la Facultad de Ingeniería Química de la UNAP, siguiendo los pasos siguientes:

10mg de cristales se llevó a molienda fina y se introdujo en un tubo capilar

Se coloca en el equipo y se observó por el objetivo del microscopio, se observó que los cristales se fundían a un valor de 357°C que comparado con el valor de la literatura es similar<sup>7</sup>.

#### 3.12.1.2. Cromatografía de capa fina.

Se toma 3 microgramos de la sustancia.

Se disolvió en cloroformo se aplica sobre la placa de cromatografía de 3cm X 20cm de silicagel G254. Se corrió en la cámara

cromatográfica sobre una mezcla de acetona: cloroformo: n – butanol: hidróxido de amonio (30: 30: 40: 10 v/v) se obtuvo un RF X 100 = 46,88 comparando con el valor de la literatura el resultado es similar<sup>16</sup>.

$$HRf = \frac{\text{Distancia recorrida del soluto} \times 100}{\text{Frente del solvente}}$$

$$HRf = \frac{7,5 \times 100}{16} = 46,88 \cong 47$$

### 3.12.1.3. Determinación del Peso Molecular por el Método de Rast

Se tomó 500 mg de alcanfor finamente molido y se mezcló con 50 mg de la sustancia aislada. Se midió la depresión del punto de fusión del alcanfor mezclada con la sustancia aislada en el aparato Kistatom luego la temperatura de fusión de la mezcla también en el Aparato de Kistatom.

Se obtuvieron los datos siguientes:

Punto de fusión del alcanfor = 176°C (dato de tabla) (I)

Punto de fusión de la mezcla alcanfor + sustancia problema 154  
(II)

$$\Delta T = I - II$$

$$\Delta T = 176 - 154 = 22$$

$W_1$  = peso de la muestra problema = 50mg = 0,05g

$W_2$  = 500mg = 0,5g

$K$  = 39.7g/mol factor de conversión

### Determinación del peso molecular

$$M = \frac{K \cdot w_1 \times 1000}{\Delta T \cdot w_2}$$

$$M = \frac{39.7 \text{ g/mol} \times 0.05 \text{ g} \times 1000}{22 \times 0.5 \text{ g}}$$

$$M = 180.45 \text{ g/mol}$$

El peso molecular de la teobromina en la literatura es de 180.15 g/mol.

**El porcentaje de error es el siguiente:**

$$\text{Error porcentual} = \frac{\text{valor experimental} - \text{valor de la literatura}}{\text{valor experimental}} \times 100$$

$$\text{Error porcentual} = \frac{180.45 - 180.15}{180.45} \times 100$$

$$\text{Error porcentual} = \frac{0.30 \times 100}{180.45} = \frac{30}{180.45} = 0.166$$

El porcentaje de error no es significativo

$$180.45 \pm 0.166$$

#### 3.12.1.4. Determinación organoléptica

Se tomó un cristal de la sustancia aislada con un estilete, se puso en la punta de la lengua, se pudo sentir un sabor amargo leve.

Prueba positiva para la teobromina.

### 3.13. Prueba espectrométrica para la determinación de la estructura química

#### 3.13.1. Espectrometría UV – Visible.

30 mg de la muestra se disolvió en 30 mL de etanol se coloreo en una celda de cuarzo de 1 cm<sup>2</sup> y se corrió en el Génesis VI de la Facultad de Ingeniería Química de la UNAP (Laboratorio de análisis por instrumentación) el aparato no posee registrador automático, el grafico se observa en el display en el eje de las abscisas aparece un valor  $\lambda_{\text{máx}}$  de 275.3 nm.

Esta longitud de onda máxima es esperada para la teobromina

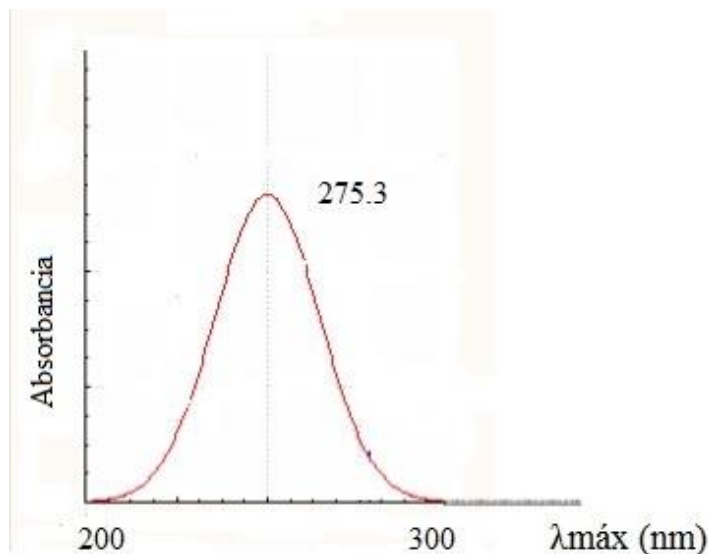


Fig. 07 Espectro UV – Visible de teobromina

### 3.13.2. 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 (300.13MHz). Se toma 5mg de cristales de la muestra problema y se diluye en agua deuterada.

Se realizó un total de 16 adquisiciones utilizando un pulso de 2.70 microsegundos y un ancho espectral (SW = 6,024.10 Hz) de 20.07 ppm, la interpretación de del espectro de RMN H<sup>+</sup>.

### 3.13.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono – 13

El espectro de Carbono - 13 de la muestra problema se realizó en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú, en el espectrómetro Bruker AC - 300 de 75.47 MHz.

20mg de la muestra se disolvió en agua deuterada, se hizo un barrido total de 20 600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y ancho espectral de 245.38 ppm a 1 858.15 Hz.

## **CAPÍTULO IV**

#### 4.1. Resultados.

##### 4.1.1. Rendimiento de la teobromina aislada de las semillas de *Herrania nítida* (Poepp) Schultes.

Peso de los cristales = 8.64g

Muestra de semillas de *Herrania nítida* = 480g

$$\text{Rendimiento porcentual de teobromina} = \frac{\text{Peso de los cristales}}{\text{Peso de semillas procesadas}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento porcentual de teobromina} = \frac{8.64}{480} \times 100 = 1.8$$

##### 4.1.2. Resultado de las pruebas fisicoquímicas

Peso molecular		Punto de fusión		Rf x 100 (TLC)		Prueba organoléptica	Formas de cristales (H <sub>2</sub> O)	
Valor experimental	Valor de literatura	Valor experimental	Valor de literatura	Valor experimental	Valor de literatura	Sabor	Valor experimental	Valor de literatura
180.45	180.18	357°C	357°C	46.88	47	Amargo leve	Agujas sedosas romboédricas	Agujas sedosas romboédricas

##### 4.1.3. Prueba de Espectroscopia UV – Visible

Valor experimental $\lambda$ máx. EtOH	Valor de literatura $\lambda$ máx. EtOH
275.3	275

##### 4.1.4. Prueba de Resonancia Magnética Nuclear

En la figura N° 09 (ver anexo) a 3.301, se observa un singlete correspondiente a un protón solitario correspondiente al grupo metino (CH) del ciclo imidazol en posición 8.



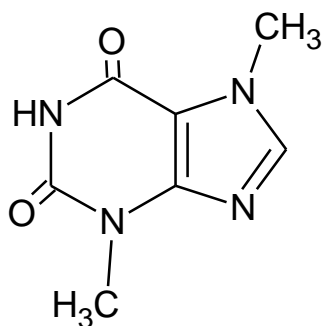


Fig. N° 8. Estructura química de Teobromina. .  
(3,7 – dimetil xantina)

- A 3.769 ppm se observa el singlete correspondiente al grupo imino (NH) del ciclo pirimidina en posición 1.
- El valor de 4.697 ppm corresponde a 2 grupos metilos equivalentes en posición 3 y 7.
- El valor de 6.86 corresponde a los protones del grupo imidazol.
- El valor 7.664 corresponde a la interacción de la molécula heterocíclica pirimidina a imidazol.

#### 4.1.5. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono – 13.

En el espectro de RMN de C-13 se observa 7 señales que corresponden a los 7 carbonos que tiene la molécula de teobromina y que corresponden a los grupos pirimidina - imidazol más los carbono de los sustituyentes metilo en posición 3 y 7  $sp^3$  un carbono metino en posición 8

Se observa un desplazamiento a 159.53 ppm correspondiente al solvente agua

Se observa un desplazamiento del grupo carbono carbono (C = C)  $sp^2$  a 143ppm

Un desplazamiento a 136 ppm del grupo ceto C = O  $sp^2$  en posición 6.

Un desplazamiento a 130ppm del grupo ceto  $sp^2$  en posición 2

Un desplazamiento a 119pmm del grupo C = N

Un desplazamiento a 20.6 ppm del grupo metilo  $sp^3$  en posición 3.

#### 4.1.6. DISCUSIÓN

El método de inclusión o de adsorción selectiva de los alcaloides derivados de las xantinas: teobromina, cafeína y teofilina usando óxido de magnesio (MgO) permitió una fácil separación del principio activo que al purificarse en agua y finalmente en etanol dio varias cosechas de cristales blancos sedosos de estructura romboédrica cuyo punto de fusión es de 357°C similar al valor que reporta la literatura para la teobromina.

La cromatografía de capa fina corrida en cromatófolios G- 254 y usando como reactivos de corrido acetona: n – butanol: cloroformo: hidróxido de amonio al 25% (30: 30: 40: 10) dio un valor de  $R_f \times 100 = 46.88$  cercano al valor de la literatura de 47 para la teobromina.

Con los cristales obtenidos se determinó el punto de fusión en el aparato Kisatom del laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ingeniería Química el valor experimental dio un punto de fusión de 357°C que coincide con el valor de la literatura<sup>17</sup>.

Se diluyó en etanol 30 mcg de cristales y se corrió en el espectrómetro UV – Visible Génesis VI del laboratorio de Análisis por Instrumentación de la Facultad de Ingeniería Química y leyó en el display un valor  $\lambda_{\text{máx}} = 275.3\text{nm}$  valor similar al de la literatura<sup>19</sup>.

La lectura del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones, se realizó comparando los valores de los desplazamientos de protones de la “Tabla para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por métodos Espectrométricos”<sup>36</sup>, los valores se ajustan a los desplazamientos de los protones.

La lectura del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 muestra 7 señales correspondientes a 7 carbonos no equivalentes de la estructura molecular de la teobromina, también muestra la posición de las señales de desplazamiento correspondiente a 2 grupos ceto (C = O) en posiciones 2 y 6 y los desplazamientos de 2 sustituyentes metilos en posición 3 y 7 de la heteromolécula.

Queda confirmado que los reactivos válidos para la identificación de alcaloides derivados de la xantinas son los reactivos cromogénicos que dan como resultado la formación de la murexida.

#### 4.1.7. CONCLUSIONES.

*Herrania nítida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago) del CLADO esterculoideae del orden de las malvales al mismo que pertenece *Theobroma cacao* (Cacao) en base a las pruebas fisicoquímicas y espectrométrica realizadas con la sustancia aislada contiene teobromina, la misma sustancia aislada siguiendo el método de inclusión o de adsorción selectiva para alcaloides derivados de las xantinas con óxido de magnesio.

Biogenéticamente con este hallazgo *Herrania nítida* confirma su parentesco cercano con *Theobroma cacao* y es una valiosa fuente alternativa de fácil procesamiento para la obtención de teobromina para la industria farmacéutica.

La presencia de teobromina en un porcentaje de 1.8 no es desdeñable más aún si se tiene en consideración que no posee sustancias lipídicas en la semilla que alargan el proceso de aislamiento.

#### **4.1.8. RECOMENDACIONES**

El gobierno regional y las empresas farmacéuticas nacionales en alianzas estratégicas deben alentar y promover el cultivo de *Herrania nítida* como una nueva fuente de obtención de teobromina para la industria farmacéutica.

La Facultad de Agronomía de la UNAP debe seleccionar progenies de esta planta para realizar trabajos de fitomejoramiento y conseguir una especie mejorada que aporte mejor cantidad de alcaloide y sea resistente a las plagas de *Phytophthora sp*, que ataca a los frutos de *Teobroma cacao* (cacao)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Winnaeker, K; Weingaertner, E. Tecnología Química. Editores Galisa, España 2001  
Pag. 373 – 374
2. Judd Campbell, Kellogg, Stevens, Donoghue, Plant Systematic. A Phylogenetic Approach 2da Edition Massachusetts. Editorial Sinauer Associates Inc. Publisher 2006  
Pág. 408.
3. WHITLOCK, Barbara A.; BAUM, David A. Phylogenetic relationships of Theobroma and Herrania (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene Vicilin. Systematic Botany, 2012, p. 128-138. [citado 2015-12-22]. Disponible en [http://www.jstor.org/stable/2419544?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/2419544?seq=1#page_scan_tab_contents).
4. Aquije Eljarrate, G. A., y Vásquez Navarro, L. Aislamiento y elucidación estructural de teobromina de semillas de Theobroma subincanum Mart. (Cacao del Varillal), por métodos fisicoquímicos y espectrométricos, Iquitos, 2014. Iquitos. [citado 2015-08-22]. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/handle/unapiquitos/321>
5. Flores J., Armijo J, Medavilla A. Farmacología Humana Editores Mason España 200  
Pág. 177.
6. Spotti, Ignacio Nicolás. "Identificación y valoración de metilxantinas en especies de Ilex autóctonas de América del Sur." (2012). Pág.20 – 20 [citado 2015-12-23]. Disponible en [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/569\\_Spotti.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/569_Spotti.pdf)
7. Harborne, B. Phytochemical Methods. Editores Chapman and Hall (U.K.). Editorial Chapman and Hall 2008 Pág. 203 – 204
8. Schultes Evans R.E De Plantis Toxicariis e mundo novo tropicales commentationes XXII Betanical Museum Leaflect. Harvard 26 N° 6 Pág. 233.

9. Schultes, Richard Evans 2013 *Plantae austro-americanae*, ii: de investigationibus generis *herrania diversae observationes*. *Caldasia*; núm. 9 (1944); 325-336 *Caldasia*; núm. 9 (1944); 325-336 2357-3759 0366-5232. - See more at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/32440/#sthash.1K01rQPS.dpuf>
  
10. Schultes, Richard Evans 2012) *Plantae austro-americanae.- i: novae notiones conjunctionesque generis herrania*. *Caldasia*; núm. 6 (1943); 11-26 *Caldasia*; núm. 6 (1943); 11-26 2357-3759 0366-5232 . - See more at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/32330/#sthash.Uzo0vtiY.dpuf>
  
11. Jibaja Oviedo. Guía para el Análisis de los compuestos del carbono 1era Edición Lima Editorial UNMSM 1977 Pág. 143, 144
  
12. Debenedetti Silvia, Erica Wilson; *Farmacognosia. Clases teóricas y presentaciones* N° 13. Generalidad de alcaloides. Localización para agregar a alcaloides. Resumen. Universidad de Belgrano. Argentina Versión electrónica en la URL <http://repositorio.ub.edu.ar:8080/xmlui/handle/123456789/6139> [Citado 23/12/2015]
  
13. Duke J.A and Vasquez R. *Amazonian Ethno Botanical Dictionary* Editors Press Florida 1994 Pág. 89
  
14. Bernal Yesid Henry, García Martínez Hernando, Quevedo Sánchez Germán Felipe; *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia* Instituto Humboldt, Bogotá D. C., Colombia.2011 Pág. 61 Disponible en [http://www.humboldt.org.co/es/test/item/download/164\\_c9601c2d3098bec45d14e7ff059f320](http://www.humboldt.org.co/es/test/item/download/164_c9601c2d3098bec45d14e7ff059f320)
  
15. Arce Julio Comunicación personal 2015
  
16. SOLÍS SILVAN Rudy, LAINES CANEPA José Ramón y HERNÁNDEZ BARAJAS José Roberto, *Mezclas con potencial coagulante para clarificar aguas superficiales* 2012 Tabasco, México Pág. 231

17. Bruneton Jean Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A 2001.
18. Álvarez Lucero, Mariela Gissela. "Caracterización de la manteca de cacao de tres variedades trinitario (CCN-51), nacional (EET-103) y forastero (IMC-67), Quevedo–Ecuador." 2015 [citado 2015-17-15]. Disponible en <http://repositorio.uteg.edu.ec/bitstream/43000/78/1/T-UTeg-0001.pdf>
19. Alberto Marco J. Química de los productos Naturales Editorial Síntesis 1era Edición Madrid 2010 Pág. 236 – 265.
20. Ringuelet Jorge y Sonia Viña Productos Naturales Vegetales; Universidad Nacional de La Plata, 2013. E-Book. Disponible en <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4812187.pdf>
21. Bohórquez Forero, Yuri A. 2012. *Endorfinas como concepto integrador de Ciencias Naturales y Educación Física* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). <http://www.bdigital.unal.edu.co/7280/>
22. Goya Baquerizo, Mariuxi Jessenia; Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación. [online]. 2013,[citado 2015-17-15], pp. 66-74. Disponible en: <http://repositorio.uteg.edu.ec/bitstream>
23. Misako K. Kovinchim, Mazanari I, Masachika I, Crozier A. IROSHIA . Plant Physiology vol 120 American Chemical Society of Plant Physiologist USA 1999, Pág. 579 – 586.
24. Stahl Egon. Thin Layer of Chromatography Laboratory Handbook. Editorial Springer Verleas New York. Germany 2012.

25. Trease – Evans. Farmacognosia 13ava Edición Madrid Editorial Interamericana Mc Graw Hill 2012.
26. González Eudis, Fernandez Nola; La teobromina estimulante y protector del organismo 2013, Disponible en: <http://lateobromina.blogspot.pe/2013/02/caracteristicas-fisicas-y-quimica.html>
27. Hand book of Chemistry Physics and. Ed. CRC- PRESS – USA 1982
28. Silverstein R.M, Morill T.C, Basler G.C Identificación espectrometrica de compuestos orgánicos Editorial Diana 1era Edición México 2012. Pág. 247.
29. Couto Alves, Romulo, caracterização de gomas extraídas de seis tipos de sementes de leguminosas Universidade Federal de Santa ctarina Departamento de Engenharia química e engenharia de alimentos. Florianópolis 2013. Pág. 30-33
30. Rao C.N Espectroscopia ultravioleta y visible Editorial Alhambra S.A Madrid 1977. Pág. 113 – 120.
31. Wade L. G. Jr. Química Orgánica Vta. Edición Editorial Pearson – Prentice Hall. Madrid 2004. Pág. 540 – 544.
32. Bloch Daniel R. Organic Chemistry Demystified A Self-Teaching Guide. Editorial Mc Graw Hill 1era Edition New York 2005. Pág. 243
33. Barriga Hernández, Carlos Investigación Educativa Editorial UNMSM 2005. Pág. 184 – 186.
34. Carrasco Díaz, S. Metodología de la Investigación Científica. Editorial UNMSM 2006 Pág, 11



35. Pino Gotuzzo, Raúl. Metodología de la Investigación. Editorial UNMSM
36. Clerc T. Tabla para la elucidación de compuestos orgánicos por métodos espectrométricos, Editorial Alhambra 1982 España pág. 29
37. Jaroslav Soukup JDB. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. 1982 Editorial Salesiana Lima – Perú.

# **ANEXOS**



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ  
Centro de Investigación de  
Recursos Naturales

## CONSTANCIA Nº 48

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por las Bachilleres: **OSBALDO TORRES MOZOMBITE** y **PIERO JAIR MURRIETA SILVANO**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: **“AISLAMIENTO DE TEOBROMINA DE SEMILLA DE *Herrania nitida* (Poepp) Schultes (cacahuillo de murciélago), ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL POR ESPECTROMETRIA”**. La cual fue verificado e identificado en este Herbarium Amazonense - AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Código de Herbarium	Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
38188	MALVACEAE	<i>Herrania nitida</i> (Poepp.) R.E. Schult.	“cacahuillo de murciélago”

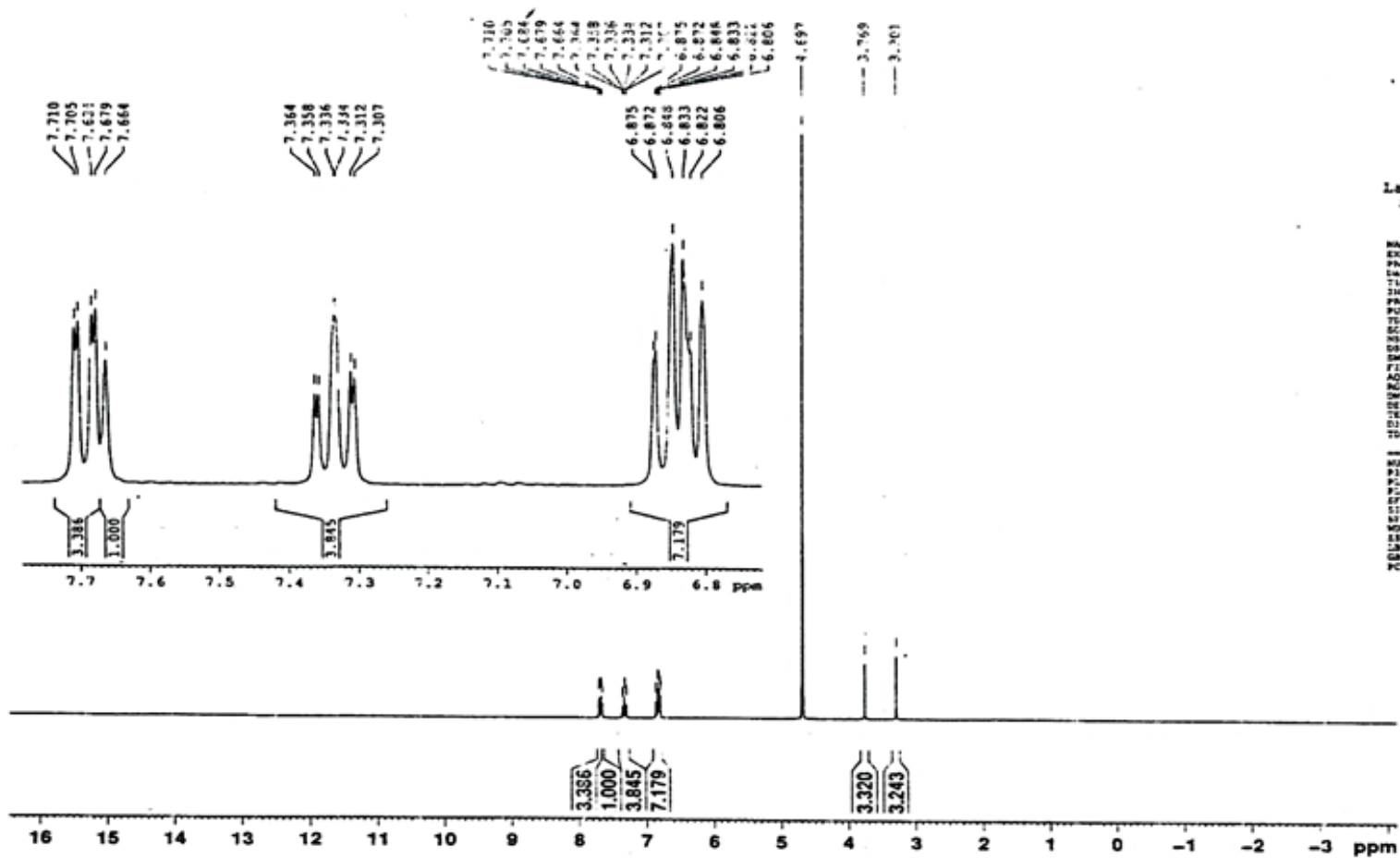
Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 03 de Noviembre del 2015

Atentamente,

**Blgo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.Sc.**  
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP





Laboratorio de RMN  
Sección Química

```

NAME: 2014-09-14_14_241114
EXP NO: 1
PRG: zgpg30
INSTR: spect
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: DMSO
NS: 1024
DS: 4
SWH: 4188.119 Hz
FIDRES: 0.094479 Hz
AQ: 0.258396 sec
RG: 64
AQ: 80.000 sec
TE: 300.2 K
SI: 1.000000 sec
TO: 1.000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 9.00 sec
PC: 2.00 sec
P2: 24.5581743 sec
PC2: 30.0000000 sec
SI: 4.32749
SF: 301.620000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.30 Hz
GB: 0
PC: 1.01
  
```

Fig. Nº 09. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN - H+)





**FOTO N° 01** Planta de *Herrania nitida* (Poepp) Schultes



**FOTO N° 02** Fruto maduro de *Herrania nitida* (Poepp) Schultes



**FOTO N° 03** Fruto con las semillas