

126
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PERFIL DE DISTRIBUCION DE ALCALOIDES
Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS
EN LA PLANTA DE Annona squamosa”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN MORALES RAMIREZ

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.-	INTRODUCCION	1
II.-	OBJETIVOS	5
III.-	ANTECEDENTES	6
IV.-	UBICACION TAXONOMICA	17
V.-	DESCRIPCION ESPECIFICA	18
VI.-	MATERIAL Y METODO	23
VII.-	RESULTADOS Y DISCUSION	33
VIII.-	FIGURAS Y TABLAS	39
IX.-	CONCLUSIONES	51
X.-	BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION

El conocimiento de los seres vivos es el principal objetivo de la Biología por lo que toda contribución que se haga a este conocimiento será de su interés.

El reino vegetal es el aspecto más dominante y esencial del medio ambiente en el que se desenvuelve el hombre. Entre las plantas actuales se pueden distinguir más de un cuarto de millón de especies y el registro fósil pone de manifiesto la existencia de muchas otras especies. (Scagel, 1977)

Esta gran multiplicidad de plantas puede ser estudiada desde muchos puntos de vista, según el centro de interés propio de cada investigador. El estudio puede basar su importancia en aspectos morfológicos, anatómicos, fisiológicos, citológicos o químicos.

Las características químicas de una especie son de interés especial, ya que proporcionan información de los compuestos que sintetiza, como los metabolitos secundarios, algunos de los cuales pueden emplearse como herramienta en el criterio taxonómico, además de darnos una idea de su posible uso en otras disciplinas, como en ecología y en farmacología.

Las anonáceas son una gran familia que comprende 120 géneros y más de 2000 especies. Son árboles aromáticos, arbustos o matorrales y algunas especies trepadoras, los cuales se encuentran distribuidos en regiones tropicales y subtropicales. En los trópicos del viejo mundo son generalmente trepadoras y se encuentran en tierras bajas, casi siempre en zonas de bosques lluviosos, pero en las regiones tropicales de América casi todas las especies son matorrales o arbustos. El único género que se encuentra fuera de zonas tropicales y a otras temperaturas es Asimia, el cual lo encontramos en Norte América, en la región de los Grandes Lagos. (Leboeuf, 1982).

Takhtajan(1969) indica que Asia es la región de origen de las anonáceas debido a la gran diversidad de especies que existen en este continente; mientras que Walker, (1969) y más recientemente Le Thomas(1981), sostienen la hipótesis, basada en datos fitogeográficos y paleontológicos, que es en Africa ó Sudamérica donde se originó esta familia.

Económicamente las anonáceas son una familia muy apreciada, principalmente por sus frutos comestibles; entre sus especies se encuentran: pawpaw (Asimia), la manzana caramelo ó corazón de toro (Annona reticulata) y la ileana, la chirimoya (Annona cherimola) y el remajo dulce (Annona

squamosa), que son ampliamente conocidas en Chiapas. Annona squamosa es también una especie cuyos frutos son característicos del Estado y en la República se le conoce como otra especie de chirimoya.

La fruta de esta especie es de las más estimadas en la India, principalmente en el oeste, en donde se cultiva, ya que en los tiempos de hambre y escasez es una fruta de gran valor alimenticio para el pueblo. También emplean las hojas y los frutos, que tienen usos medicinales, e inclusive producen una sidra hecha a base del jugo de la raíz de Annona cherimola y Annona squamosa. (Hutchinson, 1956).

Los aceites de las semillas de algunas especies se usan en la producción de jabones y aceites comestibles, la madera ha sido empleada para la producción de alcohol, mientras que la capa interna de la corteza proporciona fibra. (Hutchinson, 1956).

Los pétalos de ylang-ylang (Cananga odorata) son muy importantes en la industria de la perfumería Europea, mientras que el Xochinacaztli, barra sagrada, y la flor de los aztecas (Cymbopetalum penduliflorum) de México y Centro América, se utiliza como especie en la fabricación de chocolates y repostería. (Hutchinson, 1956)

Finalmente, la medicina naturista utiliza otros miembros de la familia con fines curativos.

Los estudios químicos sobre la familia Annonaceae se han intensificado en la última década debido a la importancia de algunas especies que tienen compuestos con actividad farmacológica potencial, aunque es quizá una de las familias cuya química no está muy estudiada, la mayoría de las investigaciones se han centrado en los alcaloides y recientemente también las acetogeninas.

Como una contribución al estudio químico del género Annona, se eligió para este trabajo la especie Annona squamosa, con los objetivos que a continuación se señalan.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Hacer un sondeo químico preliminar de la especie en raíz, tallo, hoja y semilla para analizar la distribución de sus metabolitos secundarios.

Objetivos particulares:

a) Obtener extractos hexánicos y metanólicos de las 4 estructuras de la planta arriba mencionadas.

b) Determinar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos.

c) Obtener los perfiles cromatográficos de los mismos.

d) Separar, mediante una extracción alcalina, los alcaloides y caracterizarlos.

ANTECEDENTES

BOTANICOS

Las anonáceas forman parte de la flora de los bosques tropicales, son en general, una familia homogénea, casi todas las especies son árboles o matorrales y algunas trepadoras. Son generalmente de color verde con canales de resina y pequeños poros en los tallos. Las hojas son alternadas, enteras y estipuladas. Se distinguen de otros elementos de la vegetación porque frecuentemente están cubiertas por una pelusilla blanca azulosa o un ligero brillo metálico (Leboef, 1982).

Las flores, generalmente fragantes, abren inclusive antes de que las otras partes de la planta estén completamente desarrolladas. Los frutos son de granos agregados, sin embargo, en el género Annona son grandes y comestibles, por lo que tienen importancia alimenticia.

La familia, . confinada en los trópicos y en bajas elevaciones, es muy abundante en los bosques lluviosos de Africa y en regiones cercanas a las sabanas, excepto a lo largo de los ríos; se pueden encontrar también en campos abiertos y pastizales. (Hutchinson, 1956).

Los ejemplos de distribución intercontinental no son muy

numerosos pero sí muy interesantes. El único género natural común a los trópicos y ambos hemisferios es Xilopía, otros ejemplos son Guatteria y Annona, todos éstos géneros americanos se encuentran también en África. Popowia es también un género común en las dos regiones, pero es menos significativo, pues cuenta con especies que no se pueden clasificar fácilmente por ciertas similitudes morfológicas. En la región Indo-Malaya, en el área oeste, encontramos a Monodora e Isolona, que son géneros con muchas especies y muy estudiados. En algunas regiones de África, especialmente en la Sierra Leona, así como también en Borneo, Nueva Guinea, en las Islas Fidji y en América, en Brasil y México principalmente en el sureste, se encuentran géneros con pocas especies. (Hutchinson, 1956).

Las anonáceas son una familia con características muy primitivas y arcaicas (flores primitivas y con un número indefinido de partes florales libres, estambres con arreglo en espiral, carpelos libres, etc.), y forman parte de lo que Darwin llamara "Fósiles vivientes". (Leboef, 1982).

De acuerdo a Takhtajan (1969), las anonáceas se incluyen dentro del orden de las Magnoliales (Annonales), junto con las familias más primitivas de las Angiospermas, pero a pesar de estar relacionadas con las Magnoliaceae, son más avanzadas. (Leboef, 1982)

Aunque sus límites están bien definidos, las anonáceas son muy difíciles de dividir en grupos naturales de géneros; Mondora e Isolona tienen ovarios sin carpelos y están incluidos en la sub-familia Monodoroidae. La otra sub-familia, las Annonoidae, incluye todos los demás géneros y está dividida en varias tribus y subtribus.

En México se tiene conocimiento de 8 géneros y 23 especies de anonáceas mexicanas, las cuales se reportan en 4 tribus:

- I. Uvaria.
- II. Unonea.
- III. Cimbopétala.
- IV. Xilopia.

Género Annona. A este género pertenecen las chirimoyas, la cabeza de negro, la ilama y otras Annonas.

Existen en México 12 especies indígenas o muy antiguamente naturalizadas:

Annona cherimolia

Annona glabra

Annona involucrata

Annona longiflora

Annona palustris

Annona reticulata

Annona excelsa

Annona globifera

Annona liebmaniana

Annona muricata

Annona purpúrea

Annona squamosa

QUIMICOS

Las anonáceas quedan incluidas dentro de las plantas con alcaloides benzilisoquinolínicos que maneja el grupo "Ranalean", reconocido como el centro de cultivo de plantas con estos alcaloides, por lo que mucho del interés mostrado en la familia se centra sobre este grupo de metabolitos secundarios. Sin embargo, existen también algunos estudios sobre los compuestos no alcaloidicos de ciertas especies de la familia. (Watermann, 1984).

Constituyentes no alcaloidicos de las Anonáceas:

Estos compuestos son: carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas, (metabolitos primarios) y polifenoles, aceites esenciales, terpenos y compuestos aromáticos (metabolitos secundarios). Un gran número de estudios se han hecho sobre los azúcares, lípidos y proteínas en las frutas y semillas de ciertas especies de Annonas, debido a la importancia nutritiva y económica que tienen, pero puesto que nuestro estudio se refiere a metabolitos secundarios sólo a éstos haremos mención (Leboef, 1982).

Aceites esenciales.

Un gran número de Annonas tienen fragancia, debido a la presencia de aceites esenciales. Los constituyentes de éstos aceites son generalmente monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. En Annona squamosa el aceite esencial

de las semillas tiene α -pineno y cariofileno; y en las hojas hay además un sesquiterpeno del tipo del cadaleno. (Leboef, 1982).

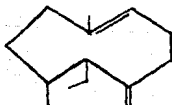
Aceites fijos.

Por lo que se refiere al aceite fijo de la semilla, éste se encuentra en un 23%, del cual 9.8% corresponde al ácido isoricinoleico. (Ansari, 1985).

Terpenos.

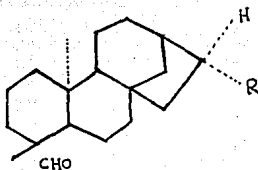
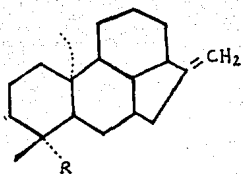
Monoterpenos. El alcanfor y el borneol se han encontrado en la corteza y la raíz de Annona squamosa, además de un monoterpeno oxigenado, que no ha sido caracterizado.

Sesquiterpenos. Bolhmann y Rao aislaron de la raíz de Annona squamosa β -cariofileno, (1), junto con varios diterpenos del tipo del Kaurano. (Leboef, 1982).



(1)

Diterpenos. Cerca de 20 Kauranos se han reportado de las especies de Anonas, de los cuales anotamos los aislados de *Annona squamosa*: Acido (-) -Kaur-16-en-19-oico (1); (-)-Kaur-16-en-19-ol (2); acetato de (-)-Kaur-16-en-19-ilo (3); (-)-Kaur-16-en-19-al (4); (-)-Kauran-17-ol-19 al (5); (-)-Kauran-17-acetoxy-19-al (6). (Leboef, 1982).

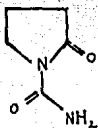


- 1) R=COOH
- 2) R=CH OH
- 3) R=CH OAc
- 4) R=CHO

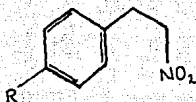
- 5) R=CH OH
- 6) R=CH OAc

Compuestos no alcalóidicos heterocíclicos nitrogenados.

En los frutos de Annona squamosa se encontró la esquamolona cuya estructura se determinó, en 1980 y corresponde a la 1-carbonil-2-pirrolidinona (8); y en las hojas y tallos, el 4-(-2-nitroetil)-fenol y su O primeverósida (9) (Leboef, 1982).



(8)



(9)

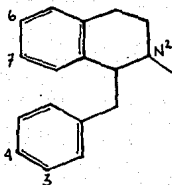
fenol-R=OH

primeverósido-R =-O-primeverosa

Flavonoides. Se han aislado pocos flavonoides de la familia de las anonáceas y una característica de éstos es la ausencia de sustituyentes en el anillo B. También se han encontrado taninos condensados, específicamente taninos procianidínicos. (Watermann, 1986).

Alcaloides. Casi todos los alcaloides son derivados isoquinolinicos y pueden ser: isoquinolinas simples; benziltetrahydroisoquinolinas, bisbenzylisoquinolinas y bisbenziltetrahydroisoquinolinas; protoberberinas y tetrahydroprotoberberinas; ; aporfinoides y aporfinas; y varios otros alcaloides del tipo isoquinolinico (Leboef, 1982).

Entre los benziltetrahydroisoquinolinicos aislados de la Annona squamosa tenemos: higenamina (10), O-Metilarmepavina (11) y reticulina (12). (Leboef, 1982).



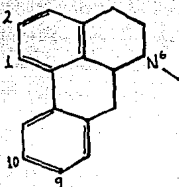
	2	6	7	3'	4'
10	H	OH	OH	-	OH
11	Me	OMe	OMe	-	OMe
12	Me	OMe	OH	OH	OMe

Los alcaloides aporfínicos son: Anolobina y anonaina.

(13 y 14).

Coridina (15), Glaucina (16), Isocoridina (17), Norcoridina (18), Norisocoridina (19), Roemerina (20) y Xilopina (21).

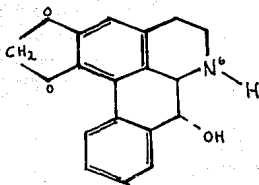
(Leboef, 1982).



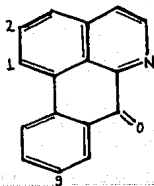
	1	2	6	9	10	11
13	-OCH O-		H	OH	-	-
14	-OCH O-		H	-	-	-
15	OH	OMe	Me	-	OMe	OMe
16	OMe	OMe	Me	OMe	OMe	-
17	OMe	OMe	Me	-	OMe	OH
18	OH	OMe	H	-	OMe	OMe
19	OMe	OMe	H	-	OMe	OH
20	-OCH)-		Me	-	-	-
21	-OCH O-		H	OMe	-	-

Se presentan también:

a) Aporfinas substituidas en -7: Norushinsunina (michelalbina) (22). (Leboef, 1982).



b) Oxiaporfinas: Lanuginosina (oxoxilopina) (23) Lirodenina (24). (Leboef, 1982).



	1	2	9
<u>23</u>		-OCH O-	OMe
<u>24</u>		-OCH O-	-

Algunos de los compuestos, tanto los alcalóidicos como los no alcalóidicos, son farmacológicamente importantes, como las flavonas C-benziladas, que tienen propiedades citotóxicas y antimicrobianas; los diterpenos, que tienen actividad antitumoral; la oliverolina presenta propiedades antiparkinsonianas; la liderolina, con propiedades antitumorales, antibacterianas y fungicidas y algunos más. Diversas partes de la planta Annona Squamosa se emplean en la medicina popular de Africa, India y el Lejano Oriente, para el tratamiento de algunas afecciones, entre ellas las de tipo cardíaco. Wagner en 1980 (en Trease, 1988) señaló el efecto cardio-activo que se ha atribuido al alcaloide higenanina, aislado de esta especie. (Trease, 1988).

UBICACION TAXONOMICA

REINO	Plantae
DIVISION	Magneoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Magnoliidae
FAMILIA	Annonaceae
GENERO	<u>Annona</u>
ESPECIE	<u>Annona squamosa</u> (Linné)

(Cronquist, 1981)

SINONIMIA

Annona glabra (Forsk 1775); Annona cinerea (Dun. 1776);
Annona asiatica (Dun.) Annona forskahlii (D.C. Sist.);
Xylopia frutescens (Sieber y Presl 1828);
Guanabanus squamosus (Gomez de la Maza, La Habana 1897).
(Acta Horti Bergiani, 1928).

DESCRIPCION ESPECIFICA

Arbol pequeño de 5m de altura, ramas grisáceas, hojas con peciolo de 5-12 cm de largo. Lámina membranosa desde luego al lado contrario presenta nervadura, son elípticas ó lanceadas elípticas, el ápice en ángulo agudo, base cuneada, 5-12 cm de largo y 2-5 cm de lado, nervios laterales a ambos lados 8-12 y ángulo agudo en el extremo. Flores opuestas, solitarias o bulbos razópodos de 2 cm de largo, perpendiculares y situados al pie de la base. Pedúnculos más o menos desarrollados 1-2cm de largo, articulados a la base; debajo de las articulaciones se encuentran las ramas y más arriba pequeñas deltoides que permanecen erectas.

Sépalos triangulares, agudos 1,2-5mm de largo. Pétalos oblongos iguales o angostos en la parte superior y con base cóncava; pétalos interiores rudimentarios. Cáliz circular, 1mm de largo, estambres circulares 1mm de largo; filamentos 0,3mm conectados a un apéndice discoideo-dentado. Fruto carnoso ovoide 8-9cm de diámetro, areola prominente con ápice rotundifolio (Revisión der Arten Elniger Annonaceae, 1928).

Nombres comunes:

Anono, chirimoyo, noramuyo, texaltzapotl, Anona blanca (México), pomme cannelle (excolonias francesas), Sugar apple Sweet sop (excolonias inglesas) y Custard apple (India).

Descripción de la Annona en México. Es un árbol de tamaño ligeramente mas pequeño que el chirimoyo y de forma más globulosa, con tronco ceniciento, ramas grises, hojas caducas en los climas que tienen estación fría, aunque éste sea poco marcado; de olor fuerte que hace se usen como insecticida, oblongas glabras o ligeramente velludas en el haz, mientras son jóvenes, de 0.12 a 0.14 cm de largo; los pedúnculos son opuestos a las hojas, con 1-2-3 flores; el cáliz es muy pequeño, con 3 dientes, cóncavo; la corola es de 3 pétalos, verdosos por fuera, blanco amarillentos por dentro, globosa en la base, como de 0.035 cm de largo, delgados, triangulares, con una mancha morada en la concavidad interior. (Foex, 1908).

El fruto recuerda poco más o menos, por su forma, ciertos conos de pinos; está cubierto de mamelones convexos y recargados; está, algunas veces, dividido en varios segmentos; tiene de 8 a 10 cm, raras veces 12cm de diámetro, es decir, que no alcanza el tamaño de las gruesas variedades de chirimoyas; es de color verde amarillento; la cáscara es

fuerte y gruesa, la pulpa es cremosa, de color blanco o muy ligeramente amarillento y contiene un gran número de semillas alargadas, pero pequeñas y muy parecidas a las de la guanábana, de color moreno o negras; es delicioso, igual que la chirimoya cuando ha madurado en el mismo clima, pero no si ésta madura en un clima menos cálido; es más dulce y menos ácida que la guanábana. Antes de estar madura, la fruta es astringente y se usa como antidiarréico. Las semillas, irritantes, sirven para hacer un polvo insecticida, por lo que ha dado lugar a un amplio campo de estudio en esta área.

La especie es mucho más adaptable a los climas cálidos que el chirimoyo; se afecta menos por exceso de calor; necesita una temperatura mucho mas elevada para madurar su fruto; no se le encuentra a grandes altitudes y mientras la chirimoya vive y fructifica bien en varias partes de España e Italia, la Anona blanca no ha tenido ningún éxito en esos países. (Foex, 1908).

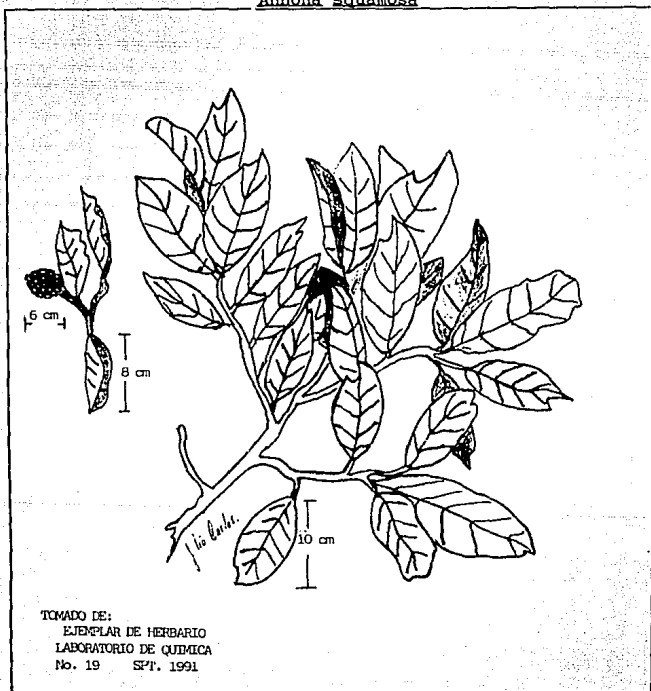
Cuando se hielan, los árboles se secan hasta el nivel del suelo, pero generalmente, retoñan después y pronto alcanzan su tamaño original.

Este anono es muy prolífico; plantas de tres años, desarrolladas en clima y suelo favorables, producen dos o

tres docenas de frutos a los 4 años, una cosecha.

Es cultivado sobre todo en las regiones sur y suroeste de la República. En Chiapas, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz, por la variedad de climas que existen, hay Anonas blancas todo el año, en un lugar o en otro. En el resto de la República, el periodo de escasez queda comprendido entre los meses de Julio, Agosto y Septiembre. (Foex, 1908).

Annona squamosa



Esquema 1

MATERIAL Y METODO

1) Sitio de Colecta:

El material de Annona squamosa utilizado para la realización de este trabajo fue colectado en el rancho "La Candelaria", ubicado en la localidad de Los Llanos, Municipio de Tonalá en el Estado de Chiapas. En septiembre de 1991, al final de la fructificación de la planta.

Se colectaron: a) Hojas.

b) Corteza de raíz.

c) Corteza de tallo.

d) Semillas.

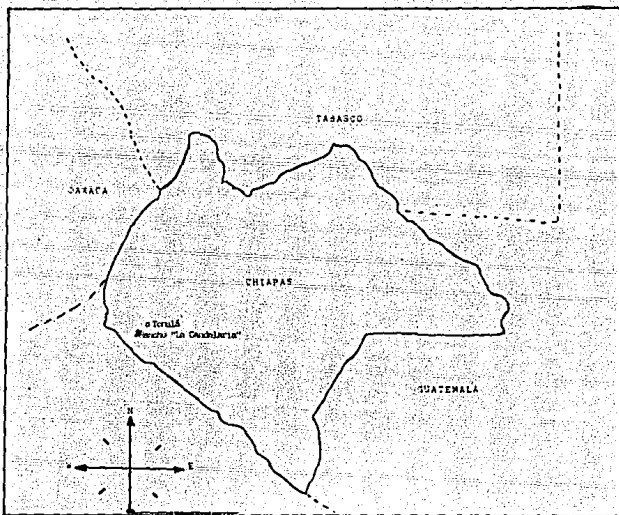
Datos Geográficos de la zona.

Tonalá (5Km NNW) Latitud 16°05'14"N

Longitud 93°45'21"W Altitud 55 (msnm)

Fórmula climática $Aw^{2(w)ig}$

Precipitación promedio anual de 1400 a 1700 mm⁵, de 60 a 89 días con lluvia en los meses de Mayo a Octubre. Isotermas medias máximas de 30° C. Tierras calientes, Sabana y Selvas Altas subdeciduas en las vegas de los ríos (Esquema 2).



MAPA DE LOCALIZACION
Tierras calientes
Sabana y selvas Altas
subdeciduas en las vegas de los Rios
Esquema 2.

2) Preparación del Material.

El material (hojas, raíz y tallo) se secó y posteriormente se trituró lo más finamente posible en molino de mano. Las semillas se separaron en endospermo y testa y se molieron en mortero. Por último, se pesó el material y se guardó por separado en frascos tapados y etiquetados.

3) Preparación de Extractos.

Se realizaron dos tipos diferentes de extracciones:

El primero fué una extracción selectiva a reflujo con dos disolventes de distinta polaridad, hexano y metanol.

El segundo tipo fué una extracción alcalina específica para alcaloides.

Las extracciones consecutivas con hexano y con metanol, se efectuaron utilizando 10 gr de muestra de cada una de las partes de la planta (raíz, tallo, hoja) y 20 gr de endospermo y testa por separado (100 ml/8hr 3 veces).

Los extractos se concentraron a presión reducida,

llevándose a sequedad con un Rotavapor. Posteriormente se pesaron y se calculó su rendimiento.

3.1 Análisis del aceite del endospermo.

Con el aceite obtenido de la extracción hexánica del endospermo se llevó a cabo una transesterificación para obtener los ésteres metílicos a partir de los triglicéridos de los ácidos que lo constituyen.

Se tomó una muestra de 5 gr de aceite de la extracción hexánica y se le agregaron 25 ml de KOH 0.2 N. Se llevó a reflujo y se mantuvo en ebullición durante 4 h hasta que la muestra fué homogénea. Se dejó enfriar y se le agregó un volumen igual de agua destilada, quedando una mezcla opalescente. Los ésteres metílicos se extrajeron con 3 porciones de éter, se reunieron los extractos etéreos y se lavaron hasta pH neutro. Este extracto se secó con Na_2SO_4 anhidrido y se llevó hasta sequedad por eliminación del disolvente.

La mezcla de ésteres metílicos se analizó por cromatografía de gases, empleando una columna OV 225, de 25 m X 0.25 m.

4) Determinación de Grupos de Metabolitos Secundarios.

A los extractos hexánicos y metanólicos se les practicaron pruebas de coloración y precipitación para la caracterización de grupos de compuestos secundarios, para lo cual se pesaron 50mg de muestra de cada extracto, en tubos de ensaye, se disolvieron en 1 ml de su respectivo disolvente y posteriormente se aforaron a 10 ml; los extractos de hoja se decoloraron con carbón activado.

4.1. Pruebas mediante reacciones que generan color.

4.1.a. Prueba de Liebermann-Bouchard (Terpenos y Esteroides).

Se mezclaron 2 ml de anhídrido acético y 2 ml de cloroformo. Se enfrió en hielo y se agregaron 2 gotas de H_2SO_4 concentrado. Se puso en contacto, gota a gota, 1 ml de este reactivo con cada uno de los extractos en solución.

En una reacción positiva hay desarrollo de color azul ó azul verdoso si se trata de esteroides y rojo, rosa ó violeta si se trata de terpenos. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

4.1.b. Prueba de Shinoda (Flavonoides).

A 1 ml de la solución de cada extracto se le

agregó 1 limadura de Mg y 2 gotas de HCL concentrado y se observó la coloración. El desarrollo de un color naranja indica que la prueba es positiva. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

4.1.c. Prueba para glucósidos con el reactivo de Molisch.

Se disolvieron 5 mg de extracto en 0.5 ml de metanol. Se agregaron 2 gotas de solución de α -naftol al 5% en etanol y 1 ml de H_2SO_4 concentrado, dejándolo resbalar poco a poco por las paredes, de tal manera que el ácido y la solución se estratificaran. En la prueba positiva hay formación de un anillo violeta en la interfase. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

4.2. Pruebas mediante reacciones de precipitación.

4.2.a. Prueba para alcaloides con reactivo de ácido Silicotúngstico.

Se tomó 1 ml de la solución de cada extracto y se llevó a sequedad; a continuación se le agregó 1 ml de HCL al 10%. A esta solución se le adicionaron 2 gotas del reactivo de ácido Silicotúngstico. La formación de un precipitado indica la presencia de alcaloides. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

4.2.b. Prueba de alcaloides con reactivo de Dragendorff.

A 5 mg de extracto seco se adicionó 1 ml de HCl al 10% y 2 gotas de reactivo de Dragendorff.

La formación de precipitado indica la presencia de alcaloides. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

5) Perfiles Cromatográficos de los Extractos.

Se determinaron en placa fina de gel de sílice Merck-60 sin activar.

Para determinar el mejor eluyente se hicieron pruebas con mezclas de disolventes de diferente polaridad. Para las placas de los extractos hexánicos, se utilizaron como eluyentes distintas mezclas de hexano-AcOEt. Y para las placas de extractos metanólicos, distintas mezclas de AcOEt-MeOH.

El eluyente que mejor resolución dió para los extractos hexánicos fué hex-AcOEt 8:2 (Fig. 1) y para los extractos metanólicos: AcOEt. (Fig. 2).

6) Extracción de Alkaloides.

Se realizó la extracción en frío y con Na_2CO_3 , empleando la raíz, por ser la estructura que mostró mayor concentración de alcaloides y no tiene clorofila.

6.1. Extracción de Raíz.

A 200g de raíz molida se le agregaron 700 ml de una solución saturada de Na_2CO_3 para humedecerla perfectamente y después se dejó secar a temperatura ambiente.

Ya seca se disgregó en un mortero y se extrajo en 3 lotes con 500 ml de cloroformo y con agitación constante durante 1 hr. Posteriormente se filtró y se lavó 3 veces con agua destilada.

Se extrajo con HCl 1N 3 veces y se alcalinizó con una solución de Na_2CO_3 al 10% hasta que tuvo un pH de 9.5.

Finalmente se extrajo con CHCl_3 y se lavó nuevamente 3 veces con agua destilada. Esta solución se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a baja temperatura.

6.2. Extracción de Alcaloides de Tallo, Hoja, Endospermo y testa.

Se utilizó el mismo procedimiento que para la extracción de los alcaloides de la raíz, pero se utilizaron 10g de muestra molida para cada una de las partes de la planta.

Los rendimientos se encuentran en la tabla 4.

6.3. Cristalización Fraccionada de la mezcla de Alkaloides.

Esta cristalización se realizó con el extracto de alcaloides de la raíz. En un matraz erlenmeyer de 25 ml se dejaron en reposo durante 2 días en refrigeración, 10 ml del extracto clorofórmico (400mg), cristalizando el producto. Se filtraron los cristales y las aguas madres se llevaron a 10 ml, repitiéndose el procedimiento anterior 8 veces. Los cristales obtenidos se pesaron por separado, se determinó su punto de fusión y se realizaron pruebas de solubilidad para cada una de las fracciones con 3 diferentes disolventes; metanol, etanol y cloroformo. Los rendimientos y resultados se encuentran en la tabla 5.

A la muestra 3 se le determinaron espectros en el U.V. e I.R.

7) Perfil cromatográfico del extracto de Alkaloides.

Se determinó en placa fina de gel de sílice Merck-60, sin activar. Se llevaron los extractos a una concentración de 5 mg de muestra por 1 ml de disolvente, se aplicó en la placa una muestra de 10 μ l de cada extracto y se corrió en un eluyente de CHCl_3 -MeOH 9:1 (fig.3).

7.1. Cromatograma de las fracciones de la cristalización
Fraccionada de Alcaloides.

Se determinó en placa fina de gel de sílice Merck-60 sin activar. Se llevaron los cristales a una concentración de 0.5mg/ml, en cloroformo, y se aplicaron en la placa 10 de cada fracción. Posteriormente se corrió la placa con ciclohexano-cloroformo-dimetilamida 4:5:1 (fig. 4).

RESULTADOS Y DISCUSION

El trabajo experimental se dividió en tres partes. En la primera parte se hizo un análisis químico para determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en cada una de las estructuras estudiadas de Annona squamosa. Para esto se efectuaron extracciones con disolventes de distinta polaridad, de tal forma que se lograra una separación de compuestos de acuerdo con su polaridad.

En la segunda parte del trabajo se determinaron los perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos, tanto hexánicos como metanólicos, para hacer una comparación de distribución de compuestos en raíz, hoja, tallo y semilla.

Por último, en la tercera parte se efectuó una extracción específica para alcaloides, con el objeto de separar, purificar y analizar compuestos de éste grupo de metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos se presentan haciendo uso de tablas, gráficas y esquemas.

I. Análisis de los extractos obtenidos.

Los rendimientos de los extractos fueron variables (tablas 1 y 2), siendo en general mayores los de los extractos metanólicos en comparación con los de los extractos hexánicos.

Considerando cada una de las partes de la planta en estudio, encontramos el mayor rendimiento en la hoja (5.5% para el extracto hexánico y 18.48% para el extracto metanólico) y el menor en la semilla, que presentó mayor rendimiento en el endospermo que en la testa. Los extractos obtenidos de estas dos muestras fueron aceitosos.

I.a. Determinación de los Grupos de Metabolitos Secundarios.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 3. La determinación de grupos de metabolitos secundarios para los extractos hexánicos indica la presencia de terpenos en todas las partes de la planta, especialmente en raíz en donde se observa mayor concentración (+++); encontramos flavonoides en pequeña cantidad en raíz, tallo, hoja, pero no en semilla. Se nota también la total ausencia de alcaloides en estos extractos, ya que estos compuestos tienen mayor polaridad.

La determinación de grupos de metabolitos secundarios para los extractos metanólicos indica la presencia principalmente de alcaloides en todas las muestras, notándose una mayor concentración en raíz, tallo y testa (++), la cual disminuye en hoja (+) y en endospermo (lig +), el que sólo presentó una ligera reacción con el reactivo de ácido Silicotungstico, que es más sensible que el de Dragendorff.

Notamos también la reacción positiva que nos indica la presencia de terpenos y esteroides en todas las muestras, siendo más intensa (++) en endospermo y testa.

Hay presencia de flavonoides también en todas las partes estudiadas, encontrándose en mayor concentración en el tallo (++) .

Estos extractos también dieron prueba positiva para glucósidos, especialmente en endospermo, en donde fue más intensa (++) . En raíz la reacción fue negativa.

I.b. Perfiles Cromatográficos.

Los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos presentaron patrones de manchas con diferente resolución según el eluyente empleado, lo que nos permitió elegir el más adecuado para separar sus componentes con mayor definición.

El mejor eluyente para los extractos hexánicos fue la mezcla hexano: AcOET en una proporción de 8:2, y para los extractos metanólicos, AcOET 100% (figs. 1 y 2).

En los perfiles de los extractos hexánicos se observa que la distribución de sus componentes en raíz, tallo y hoja es diferente, en tanto que en las dos partes de la semilla los perfiles fueron prácticamente iguales. (Fig. 1).

En los perfiles de los extractos metanólicos el de la raíz es diferente a los de tallo y hoja que son iguales. Estos tres perfiles tienen dos compuestos con R_f igual, uno en la zona de polaridad alta y el otro en el de la polaridad media.

Los perfiles de testa y endospermo son prácticamente iguales y tienen un componente con igual R_f en la zona de alta polaridad que está también en los de raíz, tallo y hoja, (Fig. 2).

II. Análisis del aceite de la semilla.

El aceite se obtuvo con un rendimiento del 74.10% y su composición en ácidos grasos se encuentra en la tabla 6.

En el estudio hecho en Annona Squamosa de la India, los autores (Ansari y Ahmad, 1985) encuentran un rendimiento de 23%. Esta diferencia con los resultados obtenidos no es de extrañar, pues el clima y la región en donde crecen las plantas tienen influencia sobre el rendimiento y la composición de los aceites.

III. Extracción de Alcaloides.

Para obtener estos compuestos se realizó una extracción en frío en medio alcalino. Se trabajó primero la muestra de raíz en cantidad mayor para poder así separar, purificar y analizar estos compuestos, y posteriormente se realizó la extracción de las otras partes de la planta para ver su distribución en ellas.

Los rendimientos obtenidos de estas extracciones se muestran en la tabla 4, en la cual podemos observar que dichos rendimientos fueron variables. El mayor rendimiento se obtuvo en la hoja, en seguida en la raíz y después en el tallo y el menor en la semilla, tanto en endospermo como en testa.

Respecto a los perfiles cromatográficos, podemos apreciar en la placa comparativa de alcaloides totales (fig. 3) que hay una o dos manchas en la zona de polaridad baja que se encuentran en las 5 partes de la planta, notándose mayor concentración en la raíz. Podemos observar también que hay un mayor número de compuestos en hoja y tallo, cuyos perfiles son iguales y sólo difieren en la concentración de sus componentes, y que los rendimientos obtenidos para alcaloides totales están de acuerdo con el número y concentración de los

compuestos en los perfiles, dada por una mayor o menor intensidad de las manchas.

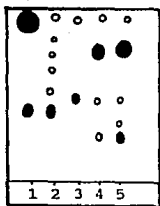
En el caso de endospermo y testa, tienen un perfil muy semejante, pero sólo uno y dos componentes, respectivamente, y son las partes que tuvieron menor rendimiento.

Como se indicó anteriormente, la separación de estos compuestos se llevó a cabo con los alcaloides totales obtenidos de la muestra de raíz, mediante una cristalización fraccionada en CHCl_3 . Los rendimientos de las 8 fracciones obtenidas se encuentran en la tabla 5, así como su punto de fusión y su solubilidad. Las fracciones que presentan el punto de fusión más alto son las No. 1 y 3 con 281° y 283°C , respectivamente.

Todas las fracciones se corrieron en placa delgada, en donde se observa que el producto obtenido corresponde a los dos alcaloides menos polares (fig. 4), mezclados, excepto la fracción 3 que es un solo compuesto y cuyo punto de fusión así lo indica. Esta constante, sumada a los máximos de absorción del espectro en el U.V. y sus coeficientes de extinción permitieron identificarlo como la Liriodenina (Fig. 5), por comparación con los datos reportados en la literatura. (Guinaudeau, 1975).

Figura 1.

PERFIL CROMATOGRAFICO DE EXTRACTOS HEXANICOS



Eluyente: Hexano: AcOET

8 : 2

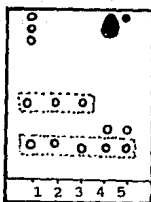
Revelador:

Sulfato Córico

1. Raíz
2. Tallo
3. Hoja
4. Endospermo
5. Testa

Figura 2.

PERFIL CROMATOGRAFICO DE EXTRACTOS METANOLICOS



Eluyente: AcOET 100%

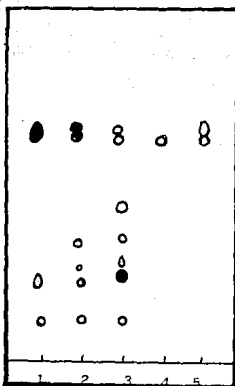
Revelador:

Sulfato Cérico

1. Raiz
2. Tallo
3. Hoja
4. Endospermo
5. Testa

Figura 3.

PERFILES CROMATOGRAFICOS DE ALCALOIDES TOTALES



Eluyente: CHCl_3 -MeOH

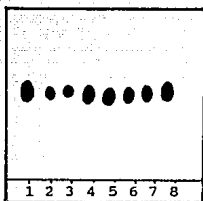
9 : 1

Revelador: Reactivo de
Dragendorff.

1. Raiz
2. Tallo
3. Hoja
4. Endospermo
5. Testa

Figura 4.

PERFILES DE LAS FRACCIONES DE LA CRISTALIZACION FRACCIONADA



Eluyente:

Ciclohexano- CHCl_3 -dimetilamida acuosa

4 : 5 : 1

Revelador: reactivo de Dragendorff.

Tabla 1.

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS HEXANICOS

MUESTRA	PESO g	RENDIMIENTO mg.	PORCENTAJES
RAIZ	10	289.5	2.89%
TALLO	10	297.5	2.97%
HOJA	10	554.1	5.54%
ENDOSPERMO	20	412.7	2.06%
TESTA	10	65.4	0.65%

Tabla 2.

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS METANOLICOS

MUESTRA	PESO g	RENDIMIENTO mg.	PORCENTAJES
RAIZ	10	1248.1	12.48%
TALLO	10	601.7	6.01%
HOJA	10	1876.1	18.76%
ENDOSPERMO	20	1260.9	6.3%
TESTA	10	268.4	2.6%

Tabla 3.

PRUEBAS PARA GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIO:

EXTRACTOS HEXANICOS

EXTRACTOS METANOLICOS

	DRAGENDORFF	SILICO-TUNGSTICO	TERPENOS ESTEROIDES	FLAVONOIDES	DRAGENDORFF	SILICO-TUNGSTICO	TERPENOS ESTEROIDES	FLAVONOIDES	GLUCOSIDOS
RAIZ	-	-	+++ verde	lig+	++	++	+ rosa	+	-
TALLO	-	-	+ verde-azul	lig+	++	++	+ rosa	++	+
HOJA	-	-	+ verde	+	+	+	+ verde	+	lig+
ENDOSPERMO	-	-	lig+ verde	-	-	lig+	++ rosa	-	++
TESTA	-	-	lig+ verde	-	++	++	++ rosa	+	+

- = negativo.

+ = concentración baja.

++ = concentración media.

+++ = concentración alta.

Tabla 4.

RENDIMIENTO DE ALCALOIDES TOTALES

MUESTRA	PESO MUESTRA	RENDIMIENTO mg.	PORCENTAJES
RAIZ	200 g	99.32	0.050%
TALLO	10 g	2.4	0.024%
HOJA	10 g	6.6	0.066%
ENDOSPERMO	10 g	1.5	0.015%
TESTA	10 g	1.38	0.014%

Tabla 5.

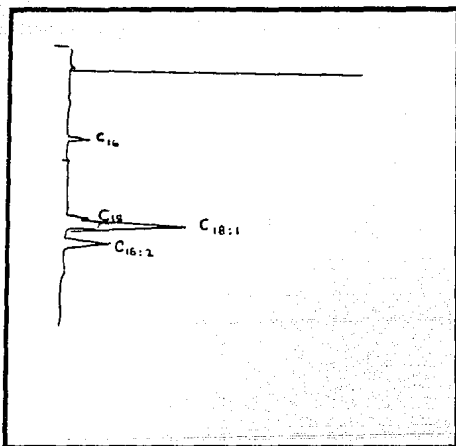
RENDIMIENTO Y CONSTANTES FISICOQUIMICAS DE LAS FRACCIONES DE
LA CRISTALIZACION FRACCIONADA DE LOS ALCALOIDES TOTALES.

SOLUBILIDAD
N/M RENDIMIENTOS METANOL ETANOL CHCl_3 MeOH/CHCl_3 PTO. FUSION
mg

1	20	lig	-	turbio	lig.	279 \circ - 281 \circ
2	21	lig	-	lig.	lig.	276 \circ - 278 \circ
3	19	lig	-	turbio	+	282 \circ - 283 \circ
4	3.3	lig	-	lig	lig	275 \circ - 277 \circ
5	3.5	lig	-	lig	+	275 \circ - 277 \circ
6	1.2	lig	-	lig	+	276 \circ - 279 \circ
7	0.3	lig	-	lig	+	276 \circ - 279 \circ
8	3.4	lig	-	turbio	+	276 \circ - 280

Tabla 6.

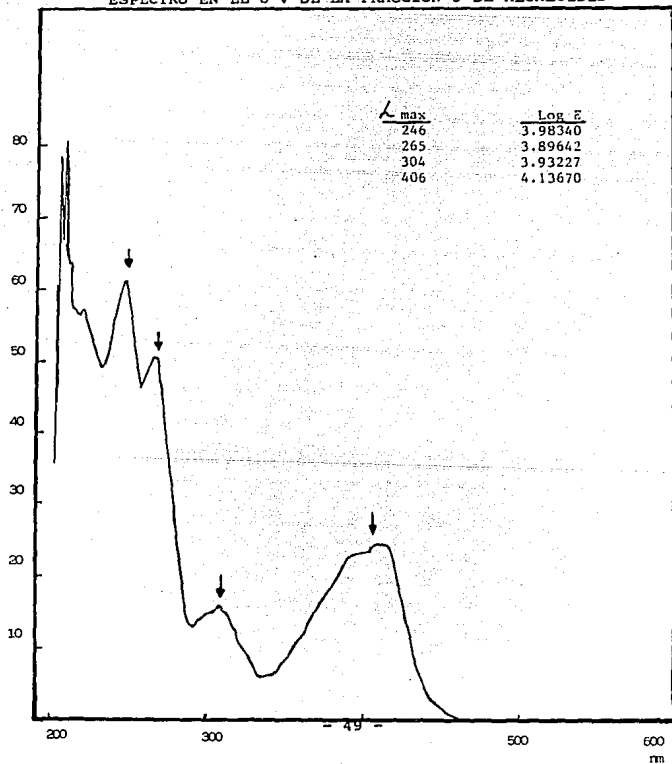
CROMATOGRAMA DEL ACEITE DE LA SEMILLA



ACIDO	%
PALMITICO (C ₁₆)	24.47
ESTEARICO (C ₁₈)	5.71
OLEICO (C _{18:1})	60.92
LINOLEICO (C _{18:2})	8.90

Figura 5.

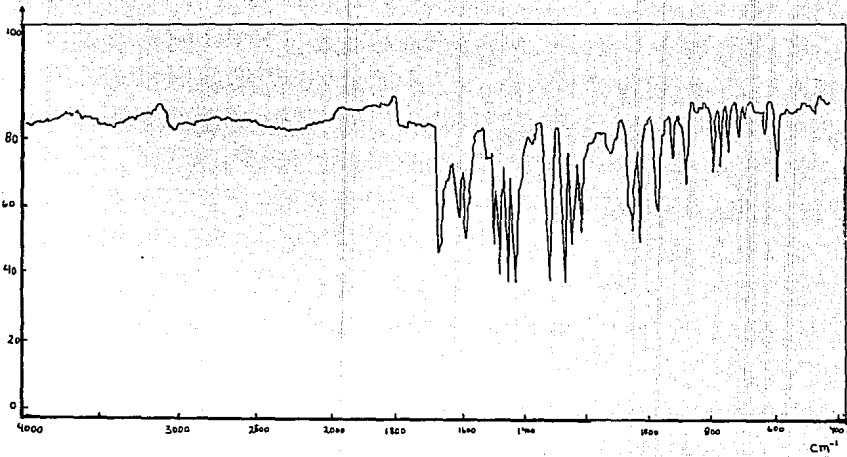
ESPECTRO EN EL U V DE LA FRACCION 3 DE ALCALOIDES



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 6.

ESPECTRO EN EL INFRAROJO DE LA FRACCION 3 DE ALCALOIDES.



CONCLUSIONES

-En las 4 estructuras de la planta analizada se encontraron los 4 grupos de metabolitos secundarios buscados, con distribución diferente para cada una de ellas.

-Los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos fueron todos diferentes en tanto que, de los extractos metanólicos, son iguales los de tallo y hoja, el de semilla es similar a los anteriores y el de raíz es diferente.

-Del extracto de alcaloides de raíz se logró separar la Liriodenina, que se identificó por comparación de sus constantes con las reportadas en la literatura.

BIBLIOGRAFIA

- Ansari, M.H.; Afaque, S. and Ahmad, M. (1985). Isoricinoleic Acid in *Annona squamosa* seed oil. *JAOCS* 62:10.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Clasification of floreaing plants. Columbia University Press. N.Y.
- Foex, F. (1908). *Anonaceas Frutales en México*. Estación Agrícola Central. México.
- Guinaudeau, H; Leboeuf M. and Cave A.; (1975) Aporphine Alkaloids. *Lloydia*, 38, 3.
- Hutchinson, Ll.D. F.R. (1956). *The Genera of flowering* Vol. 1. Oxford.
- Leboef, M. 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 21, 12 (2783-2813).
- Le Thomas, A. (1981) *Pollen Spores*. 23, 5.
- Morrison, R.T. (1976). *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano.
- *Revision Der Arten Einiger Anonaceen-Gattungrn.* (1928) *Acta Horti Bergiani*. Band 10. N:0 2.
- Scagel, R.F. (1977). *El Reino Vegetal*, Ediciones Omega. Barcelona España.
- Takhtajan, A. (1969) *Flowering Plants, Origin and Dispersal*. Oliver & Boyd, Edimburg.

- Trease, G Edward, W. (1988) Tratado de Farmacognosia. Intramericana. México. p.191.
- Watermann, P.G. (1984) Unusual Metabolites from some Africam Annonaceae. Rev. Latinoamer Quim. 15,3 90-96.
- Watermann, P.G. (1986). A phytochemistry in the Africam Rain Forest. Phytochemistry, .25,1-3,17.