

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



"STANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*) PROVENIENTE DE LA SELVA PERUANA"

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

AUTORES : Br.: ESQUIVEL HORNA JOSÉ ARMANDO

Br.: SALAZAR AGUIRRE LUCÍA BEATRIZ

ASESOR : Dr. LUIS MONCADA ALBITRES

TRUJILLO – PERÚ

2011

Miembros del Jurado:

Ing. Ernesto Wong López

Dr. Alberto Quezada Álvarez

Dr. Luis Moncada Albitres

PRESENTACION

Señores miembros del Jurado:

De conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestra ilustrada consideración el presente trabajo de investigación intitulado: “**STANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LA UÑA DE GATO (*Uncaria Tormentosa*) PROVENIENTE DE LA SELVA PERUANA**”, como parte de los requisitos para optar el Título Profesional de Ing. Químico.

Dejamos constancia que la presente investigación constituye un trabajo original, resultado por los autores sin más ayuda que las referencias bibliográficas citadas y las orientaciones del profesor asesor del mismo.

Trujillo, Abril del 2011

Bach. Salazar Aguirre Lucía Beatriz

Bach. Esquivel Horna José Armando

*Gracias a Dios, por estar conmigo en
cada paso que doy, por fortalecer mi
corazón e iluminar mi mente.*

*Por tener conmigo aquellas personas que
han sido mi soporte y compañía durante
toda mi carrera.*

Lucía

*A Dios, por siempre proveerme de
su energía y amor para seguir adelante*

*A las personas que más quiero y con
quienes comparto el día a día en mi
vida, mi familia.*

Armando

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro agradecimiento a los profesores de la Facultad de Ingeniería Química que día a día nos impartieron sus enseñanzas y conocimientos durante nuestra permanencia universitaria que nos sirvió para obtener una buena formación académica y profesional.

Nuestro agradecimiento al Ing. Luis Moncada Albitres, nuestro profesor y asesor de Tesis perteneciente a la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, por su asesoramiento en el desarrollo y culminación de nuestra tesis para optar el título de Ingenieros Químicos.

Lucía Beatriz Salazar Aguirre

José Armando Esquivel Horna

INDICE

PRESENTACIÓN	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE	vi
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN.....	x
CAPÍTULO I : FUNDAMENTO TEÓRICO	1
1.1 ASPECTOS GENERALES.....	1
1.1.1 Origen y distribución del recurso natural	1
1.1.2 Botánica.....	2
1.1.2.1 Clasificación botánica.....	2
1.1.2.2 La familia rubiaceae	2
1.1.2.3 Las especies del género <i>Uncaria</i>	3
1.1.2.4 Nombres vernaculares	3
1.1.3 Morfología.....	4
1.1.3.1 La corteza externa.....	4
1.1.3.2 La corteza interna	4
1.1.3.3 El tallo.....	4
1.1.3.4 Las ramas	5
1.1.3.5 Las hojas	5
1.1.3.6 Las espinas.....	5
1.1.3.7 La inflorescencia.....	5
1.1.3.8 Los frutos	5
1.1.3.9 Las semillas	5
1.1.4 Fenología	8
1.1.5 Propagación	8
1.1.6 Aspectos agroclimáticos.....	10
1.1.6.1 El Clima.....	10
1.1.6.2 El Suelo.....	10
1.1.7 Uso en la medicina tradicional peruana de la “Uña de Gato”	10
1.1.7.1 Preparados y dosificación.....	11
1.1.8 Toxicidad aguda de <i>Uncaria tomentosa</i>	13
1.1.9 Sistema de recolección	14
1.1.9.1 Mateado	15
1.1.9.2 Tumbado y corte	15
1.1.9.3 Limpieza, descortezado y preparación de la carga	15
1.1.9.4 Secado.....	15
1.1.10 Canales de comercialización	16
1.1.10.1 Extractores	16
1.1.10.2 Acopiadores	16
1.1.10.3 Vía de acceso	16
1.1.10.4 Venta al acopiador	16
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CORTEZA DE <i>Uncaria tomentosa</i> .	17
1.2.1 Principios activos.....	17
1.2.1.1 Los alcaloides de <i>Uncaria tomentosa</i>	17
1.2.1.2 Los flavonoides de <i>Uncaria tomentosa</i>	24
1.2.1.3 Otros compuestos de <i>Uncaria tomentosa</i>	27

1.2.2	Identificación.....	30
1.2.3	Preparación de la corteza del tallo para el análisis de alcaloides	31
1.2.3.1	Análisis cualitativo de alcaloides en <i>Uncaria tomentosa</i> por cromatografía en capa fina	32
1.2.3.2	Análisis cuantitativo de alcaloides en <i>Uncaria tomentosa</i> empleando una titulación ácido base en medio acuoso	34
1.2.4	Preparación de la corteza del tallo para el análisis de flavonoides.....	36
1.2.4.1	Análisis cualitativo de flavonoides por cromatografía en capa fina	36
1.2.4.2	Análisis cuantitativo de flavonoides por Espectrofotometría.....	38
1.3	PRINCIPALES OPERACIONES RELACIONADAS CON LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	39
1.3.1	Mecanismo de Extracción Sólido – líquido.....	39
1.3.2	Preparación de Extractos	40
1.3.3	Reducción de tamaño	41
1.3.4	Maceración	41
1.3.5	Concentración.....	42
	CAPÍTULO II : MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1	MATERIA PRIMA	44
2.2	MATERIALES.....	44
2.2.1	Equipos.....	44
2.2.2	Reactivos	44
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	45
2.3.1	Análisis físico químico de la materia prima (Corteza).....	45
2.3.1.1	Humedad.....	45
2.3.1.2	Grasa	45
2.3.1.3	Cenizas.....	46
2.3.1.4	Proteínas	46
2.3.1.5	Fibra.....	46
2.3.1.6	Carbohidratos.....	46
2.3.1.4	pH	46
2.3.1.5	Alcaloides totales.....	46
2.3.1.6	Flavonoides (taninos condensados)	46
2.3.2	Análisis realizados para seleccionar las mejores variables de extracción por maceración.....	47
2.3.2.1	Cuantificación de extracto seco	47
2.3.2.2	Cualificación de alcaloides: TLC	47
2.3.3	Protocolo de análisis para la caracterización del extracto final.....	47
2.3.3.1	Cuantificación de alcaloides totales.....	47
2.3.3.2	Cuantificación de taninos condensados	48
2.3.3.3	Densidad	50
2.3.3.4	Extracto seco.....	50
2.3.3.5	Sólidos solubles	50
	CAPÍTULO III : METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	51
3.1	EVALUACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	51
3.3.1	Acondicionamiento de la materia prima.....	51

a. Recepción.....	51
b. Selección.....	51
c. Lavado.....	51
d. Secado.....	52
e. Molienda y tamizado.....	52
f. Envasado	52
3.1.2 Cualificación y cuantificación de alcaloides y cuantificación de taninos Condensados	54
3.1.3 Estudio de las variables de extracción por maceración de corteza de uña de gato.....	54
3.1.4 Determinación del tamaño de partículas	54
3.1.5 Estudio del disolvente para la extracción	55
3.1.6 Relación materia prima / solvente	56
3.1.7 Influencia de la temperatura de maceración	57
3.1.8 Influencia del tiempo de maceración.....	58
3.1.9 Estudio de la torta residual	58
1.1.10 Descripción del procedimiento final	59
a. Recepción.....	59
b. Selección.....	59
c. Lavado.....	60
d. Secado.....	60
e. Molienda y Tamizado	60
f. Extracción.....	60
g. Filtrado.....	60
h. Elaboración del extracto fluido.....	60
i. Concentración del extracto fluido: extracto final	60
j. Determinación de rendimientos.....	62
3.1.11 Análisis estadístico	62
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1 DE LA MATERIA PRIMA.....	63
4.1.1 Análisis proximal.....	63
4.1.2 Determinación del porcentaje de alcaloides y flavonoides	64
4.1.2 Perfil cromatográfico de la corteza analizada	64
4.2 RESULTADO DE LAS PRUEBAS EXPERIMENTALES	66
4.2.1 Efecto del tamaño de partícula	66
4.2.2 Efecto del tipo de solvente	67
4.2.3 Efecto de la relación materia prima / solvente	69
4.2.4 Efecto de la temperatura	70
4.2.5 Efecto del tiempo.....	73
4.2.6 Estudio de la torta residual	74
4.2.7 Sólidos totales y alcaloides resultantes de la extracción	76
4.3 CONCENTRACIÓN.....	77
4.4 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO FINAL	79
4.5 BALANCE DE MATERIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	79
CAPÍTULO V : CONCLUSIONES.....	82
CAPÍTULO VI : RECOMENDACIONES	83
CAPÍTULO VII : BIBLIOGRAFÍA.....	84

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre la standarización del extracto hidroalcohólico de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) proveniente de la Selva Peruana.

El flujo de las operaciones que se determinó para la obtención del extracto fue el siguiente: materia prima (corteza del tallo de uña de gato); selección y pesado; lavado; secado (50°C por 48 horas); molido y tamizado (partículas de 0.55mm de diámetro); extracción por maceración (a 65°C por 8 horas); filtración al vacío (presión de 4.5 cmHg); concentración al vacío (temperatura 55°C y presión 4.5 cmHg) hasta alcanzar un nivel de 10° Brix; caracterización del extracto final.

De la caracterización físico química del extracto estandarizado, se obtuvo los siguientes resultados:

Alcaloides Totales expresados como mitrafilina = 0.48 mg/ml

Flavonoides Totales expresados como Catequiza = 12.6 mg/ml

Densidad = 0.982 gr/ml

Extracto seco = 16.81gr/100gr de corteza macerada
= 2gr/100ml de extracto final conc.

Sólidos solubles = 10° Brix

El porcentaje de alcaloides y flavonoides presentes en el extracto fue de 62% y 59% respectivamente en relación a un 100% de estos compuestos en la corteza de uña de gato.

ABSTRACT

This work deals with the standardization of hydro-alcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) from the Peruvian Amazon.

The flow of operations was determined to obtain the extract was: raw (stem bark of cat's claw) matter; selection and heavy; wash: drying (50 ° C for 48 hours): ground and sieved (particle diameter 0.55mm); maceration extraction (at 65 ° C for 8 hours); vacuum filtration (pressure 4.5 cmHg); Concentration in vacuo (temperature 55 ° C and pressure 4.5 cmHg) to a level of 10 ° Brix; characterization of the final extract.

The physicochemical characterization of the standardized extract, the following results were obtained:

Total alkaloids expressed as mitrafilina	=	0.48 mg / ml
Total flavonoid expressed as catechizes	=	12.6 mg / ml
Density	=	0.982 g / ml
Dry	=	16.81gr / 100gr bark extract macerated
	=	2 g / 100ml final extract conc.
soluble solids	=	10 ° Brix

The percentage of flavonoids and alkaloids present in the extract was 62% and 59% respectively in relation to 100% of these compounds in the cortex of cat's claw.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la variedad de recursos naturales que posee nuestro país encontramos a la *Uncaria tomentosa*, una liana cuya corteza es comercializada (por poseer propiedades inmunoestimulantes, desinflamatorias, etc.) en forma de micropulverizados, atomizados, liofilizados y extractos con fines curativos restringiéndose así la demanda a personas con diversas dolencias.

Sin embargo es posible masificar el consumo de este recurso natural empleándolo como aditivo en productos alimenticios, cuidando de no alterar el sabor típico del producto final ya que los extractos de uña de gato tienen un sabor amargo.

El presente trabajo busca elaborar un extracto hidroalcohólico, estudiando parámetros de extracción diversos como tiempo, temperatura, tamaño de partícula, tipo de solvente, relación materia prima: solvente y tiempo de extracción, así mismo caracterizar el extracto final mediante protocolos de cualificación y cuantificación alcaloides y taninos condensados. Una vez obtenido el extracto, este podría ser aplicado en diferentes tipos de productos que permitan generalizar el consumo de la uña de gato.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 ASPECTOS GENERALES

Los primeros conocedores de la importancia en el uso medicinal de la *Uncaria tomentosa*, conocida como uña de gato fueron los pobladores de las comunidades nativas de la selva, a través de su valioso conocimiento etnobotánico que durante milenios han ido acumulando generación tras generación. Es en el Perú que esta planta se hace conocida y en donde sólo se ha encontrado dos especies pertenecientes al género mencionado: *Uncaria tomentosa*.

1.1.1 Origen y distribución del recurso natural.

La uña de gato ha sido encontrado en diferentes lugares de América, como Panamá (Bocas de Toro, Valle del Río Gatún), Nicaragua, Venezuela, Guyana, Trinidad y Tobago, Colombia (Choco) y Ecuador (Obregón, 1995). También se le encuentra en Bolivia, Brasil y Centro América (Silva H, et 1995, mencionado por Domínguez, 1997). En todos estos lugares no se reporta necesariamente a las especies *Uncaria tomentosa* o *Uncaria Guianensis*, sino reportándose algunas veces plantas que tienen características físicas similares a la uña de gato.

También otras especies del género *Uncaria* se hallan esparcidas en África y Asia en donde se considera la existencia de 39 especies, (Ramírez, 1992).

La distribución de la “uña de gato” en el Perú se encuentra en la selva baja, seña de selva y selva alta dentro de las siguientes regiones:

- Región Loreto: Iquitos, desembocadura del Río Santiago, Panguana segunda zona, tamishiyacu, Yanamono, Genaro, Herrera, Requena, Mishana, Indiana Contamaná, Río Tahuayo.

- Región Ucayali: Pucallpa.
- Región San Martín: Moyabamba, Rioja, Bellavista, Picota Juanjui, Saposoa, Tocache, Scanchi, Cacatachi, Paujilzapa Alfonso Ugarte, La Morada, Valle del biavo.
- Región Inca: Cuzco (La Convención, Paucartambo, Alto Urubamba); Madre de Dios (Manú, Tauamanú).
- Región los Libertadores Wari.
- Región Andrés Avelino Cáceres: Junín (Chanchamayo, La Merced), Pasco (Oxapampa, Pozuzo, Villa Rica, Satipo); Huanuco (Tingo Maria, Aucayacu). (Domínguez, 1997).

1.1.2 Botánica.

1.1.2.1 Clasificación Botánica.

El genero *Uncaria* fue descubierto en 1789 por Shuller. En 1819 Willdenow describe la especie tormentosa y la denomina científicamente como *Naucleata tormentosa*. Es recién en 1830, que el botánico de Candolle, registra su actual nombre científico *Uncaria tormentosa*.

1.1.2.2 La familia Rubiaceae.

La familia RUBIACEAE, a la que pertenecen ambas especies de “uña de gato” *Uncaria tormentosa* (Willd) DC. y *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel, presenta 94 géneros, y sólo el género *Uncaria* se presenta 2 especies importantes en América, además de las 50 especies diseminadas en Europa y Asia.

Esta familia comprende numerosas especies de gran valor medicinal: una de las más conocidas en todo el mundo es la *Cinchona officinalis* (quina) que, gracias al contenido de alcaloides como la quinina, es el remedio más eficaz para el tratamiento del paludismo (Cabieses, 1994). El género *Uncaria*, que actualmente en el Perú es objeto de varios estudios de investigación por su valor medicinal, también pertenece a esta familia.

1.1.2.3 Las especies del género *Uncaria*.

Zavala y Zevallos (1996) describen las siguientes especies del género *Uncaria* existentes en el Perú:

El género *Uncaria* fue descubierto en 1789 por Shuller. En 1819, Willdenow describió la especie tormentosa y la denominó científicamente como *Nauclea tormentosa*. Su nombre actual fue registrado por el botánico De Candolle, en 1830, como *Uncaria tormentosa*.

a) *Uncaria tormentosa*, (Willd D.C).

Sinónimos botánicos:

- *Nuclea aculeata* Humboldt, Bonpland & Kuntze (1819).
- *Nuclea tormentosa* Willdenow ex Roemer & Schultes Schumann (1819).

La especie tormentosa requiere de menor iluminación, por lo que es típica de bosques primarios y/o ligeramente intervenidos, también se la encuentra en bosques secundarios y grandes claros.

b) *Uncaria guianensis*. (Aublet) Gmelin (1796).

Sinónimo botánico:

- *Ouoparia guianensis* Aublet 1775.

La especie *guianensis*, requiere de un alto grado de iluminación para regenerarse, siendo típica del bosque secundario y grandes claros, la gran diseminación de sus semillas, hace posible que se la encuentre en bosques primarios.

1.1.2.4 Nombres vernaculares.

Zavala y Zevallos (1996) enumeran los siguientes nombres comunes para *Uncaria tormentosa*. Uña de gato, garabato amarillo, samento, toroñ, tsachik, paotimosha, misho-mentis, jipostatsa, unganangui.

Para *Uncaria Guianensis* los mismos autores mencionan los siguientes nombres: uña de gato, uña de gavilán, garabato colorado,

garabato casha, auri huasca, tambor huasca, toroñ, unganangui, acajsillo, ancayacu.

1.1.3 Morfología

La uña de gato es una gran liana trepadora que se le encuentra con mucho desarrollo en longitud y diámetro en los bosques primarios y como parra o arbusto rastroso en bosques secundarios.

1.1.3.1 La corteza externa.

Es una superficie fisurada longitudinalmente de color marrón oscuro, y que puede limpiarse fácilmente.

1.1.3.2 La corteza interna.

Es de color amarillento en *Uncaria tormentosa*. En estado seco, al arrancarse en láminas, desprenden un polvillo característico, más notable en *Uncaria tormentosa*.

1.1.3.3 El tallo

Es exclusivamente trepadora por la forma de espinas semicurvas que facilitan su adherencia a las ramas por donde trepan, llegando habitualmente a la copa de los árboles de 20 a 30 m de altura.

Tiene una textura interna leñosa y además tienen la propiedad de almacenar un líquido acuoso que es más abundante en el caso de *Uncaria tormentosa*. La cantidad de agua está ligada a la estacionalidad, esta es mayor después del periodo de lluvias.

No se han encontrado reportes sobre las características de este líquido en cuanto a su composición química, pero es bebido frecuentemente como agua natural cuando se realizan labores en el bosque, se le atribuye un efecto reconstituyente. (Zavala y Zevallos, 1996).

Actualmente se busca aprovechar el líquido que se almacena en el tallo. Se va recolectar el agua al momento de extraer la corteza, para lo cual se va a iniciar con los estudios

de su contenido de principios activos así como la forma de preservarlo (Congreso Fito 2000).

1.1.3.4 Las ramas.

De menos de 1 año son de color verde amarillento y forma cuadrangular.

1.1.3.5 Las hojas.

Son las partes más diferenciables entre la *Uncaria tormentosa* y la *Uncaria guianensis*. La primera posee hojas opuestas, de corto peciolo y elípticas, alcanzando entre 7,5-17cm de longitud y 5-12cm de ancho (Zavala y Zevallos, 1995). La diferencia principal se encuentra en el tomento, que se describe como finos pelos blancos en el envés de la hoja de *Uncaria Tormentosa*, distribuidos principalmente en las nervaduras (Domínguez, 1997).

Actualmente se ha iniciado la producción comercial de las “Hoja de la Uña de gato” en plantas cultivadas abierto a partir de los 12 a 18 meses de su siembra. En su estado natural las lianas de la “Uña de gato” poseen pocas hojas, confundidas y enmarañadas con los árboles a los que se trepa y, a una altura de 15 a 20 metros sobre el nivel del suelo (Congreso Fito 2000).

1.1.3.6 Las espinas.

En *Uncaria tormentosa* éstas son puntiagudas, de consistencia leñosa y de forma ligeramente encorvada, de tamaños variables tanto en el largo como en el ancho. Zavala y Zevallos (1996) menciona longitudes que están entre 8 a 10 mm de longitud y de 3 a 6 mm de ancho.

1.1.3.7 La inflorescencia.

Está compuesta de racimos, dispuesta en partes axilares y terminales, son órganos de la planta que se presentan en periodos cortos, en *Uncaria tomentosa* la longitud alcanza de 1,5 – 3,5 cm., con un diámetro entre 0,10 – 0,15 cm, no tienen pedicelo, son sésiles, y la corola de color amarillo.

1.1.3.8 Los frutos.

En *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* son arracimados en cabezuelas, con numerosas cápsulas fusiformes y deshiscentes. Cada cápsula presenta dos cavidades en donde se insertan las semillas.

1.1.3.9 Las semillas.

Son imbricadas, poseen testa alada y alas bipartidas. Para *Uncaria tomentosa* las semillas tienen entre 2 – 4mm de longitud.

Figura 1: La uña de gato (*Uncaria tomentosa*)



Fuente: Zavala y Zevallos (1996)

Cuadro No 1: Características descriptivas de la *Uncaria tomentosa*

Órgano	<i>Uncaria tomentosa</i>
Flores	Sésiles
Color:	Amarillas
Pétalos	
Estambres	Sésiles
Inflorescencia	Cabezuelas globosas
Diámetro	1.5 – 2.5 cm
Fruto	5 – 8 mm long.
Hojas: Haz	Verde opaco
Envés	Tomentoso
Nervaduras	Pinatinervada – oblicua, 8 a 10 pares
Espinas	Curvo – rectas, puntiagudas, de par en par Color verde – pálido.
Ramitas terminales	

Fuente: Zavala y Zevallos (1996)

1.1.4 Fenología de la Planta.

La fenología relaciona los cambios fisiológicos (floración, fructificación, cambio de hojas) que ocurren en la planta durante el año, influenciado por los cambios climáticos propios de una determinada zona, Domínguez (2006).

Para el caso de la *Uncaria tomentosa* la fenología nos permite conocer la época de producción de semillas, para tener un abastecimiento oportuno de material de propagación y para el establecimiento de áreas de manejo de regeneración natural.

En el congreso de Fito 2000 el Dr Juan de Dios Zuñiga y colaboradores dieron a conocer el calendario fenológico de la *Uncaria tomentosa* cultivadas a campo abierto en la Universidad Nacional Agraria de la Selva de Tingo María, es decir su floración, fructificación y producción de semillas. Este logro es importante resaltar, ya que en condiciones naturales la obtención de las semillas es difícil por cuanto la floración y las semillas se encuentran de 15 a 20 metros sobre el nivel del suelo, inclusive en la copa de los árboles. La semilla es el elemento más importante para todo programa de cultivo de la Uña de Gato.

1.1.5 Propagación.

Hasta ahora se han desarrollado tres formas de propagación.

1) Propagación por semillas.

Las semillas de uña de gato requieren de un tratamiento pregerminativo. Flores, (1995) ha logrado 65 – 85% de germinación es un lapso de 10 a 25 días aplicando un tratamiento de remojo en agua con CUPRAVIT O TECTO 60 (0.1g/lt), a temperatura ambiente. Dentro de esta solución se introduce 1 gr de semillas por litro que equivale a 5000 – 7000 semillas.

Entre 15 – 18 días las semillas quedan liberadas de la cubierta seminal, con los cotiledones y la radícula libres. Se remueve y

distribuye cuidadosamente en la solución y se aplica a las camas de almácigo previamente preparadas a razón de litro por metro cuadrado (m^2) de almácigo, tratando de no maltratar las plántulas germinadas. El sustrato recomendable para las camas de almácigo es una mezcla 1:1 de arena gruesa con tierra agrícola.

2) **Propagación vegetativa.**

La propagación vegetativa o asexual es una técnica de obtención de nuevos individuos a partir de porciones vegetativas de una planta como pedazos de ramas, hojas, raíces e inclusive porciones más pequeñas como yemas, meristemos y células. Estas últimas son utilizadas aplicando técnicas de cultivo in Vitro que últimamente es una de las aplicaciones más promisorias en el campo de la biotecnología (Domínguez, 1997).

3) **Cultivo in Vitro.**

Esta técnica consiste en cultivar órganos vegetales o fragmentos de tejidos en un medio sólido o líquido que contiene una solución nutritiva de sales minerales, azúcar, vitaminas y hormonas vegetales. El cultivo se desarrolla en condiciones rigurosas de asepsia para evitar la proliferación de poblaciones de hongos o bacterias.

Antes de realizar esta técnica es necesario determinar el tipo de fragmento de la planta que se someterá al cultivo, al que se llama explante, este explante debe estar libre de patógenos y el medio debe estar estandarizado.

1.1.6 Aspectos agroclimáticos

1.1.6.1 El clima

Zavala y Zevallos (1996) menciona que las dos especies del género *Uncaria* reportadas en el Perú, se desarrollan en las

siguientes condiciones de clima: temperatura media anual mínima de 17°C y media anual máxima de 25.7°C. Promedio de precipitación media anual mínima de 1200 mm y máximo de 6000 mm; reportando límites inferiores menores para *Uncaria guianensis*.

1.1.6.2 El suelo

Zavala y Zevallos (1996) mencionan las siguientes clases de suelos donde se reporta su desarrollo:

- Acrisoles órticos
- Cambisoles dísticos
- Fluvisoles

De acuerdo a la clasificación de suelos empleada por la FAO, en el Bosque Nacional Alexander Von Humboldt, la uña de gato se encuentra distribuida preferentemente en suelos arcillosos mal drenados, con características de suelos Gleysols y también en suelos Cambisols con características de buen drenaje y aparentes para la agricultura (Flores, 1995).

1.1.7 Usos en la medicina tradicional peruana de la uña de gato.

Obregón (1995) señala que dentro de las patologías tratadas con las plantas denominadas Uña de gato se hallan:

- a. Procesos inflamatorios de diversa índole.
- b. Asma
- c. Úlcera gástrica.
- d. Diabetes
- e. Diversas tumoraciones.
- f. Enfermedades degenerativas: cáncer
- g. Procesos virales

1.1.7.1 Preparados y Dosificación

Obregón (1995) señala los siguientes aspectos relacionados con los preparados para el consumo humano y la dosificación frecuente que se emplea.

A) Partes utilizadas. Para la elaboración de diferentes preparados se utiliza las siguientes partes de la planta: corteza, hojas y raíz.

B) Preparados de las concentraciones más frecuentes.

Existen diversos preparados a partir de las diferentes partes de la planta. Así tenemos:

Cocimiento.

Popularmente se usa un aproximado de 20 a 30 gr de la corteza cortada en pequeños fragmentos, los mismos que son hervidos en un litro de agua durante 20 ó 30 minutos (a bajo fuego), este líquido se enfría al medio ambiente. En algunas zonas se prefiere la maceración de los trozos de corteza previa al hervido (aproximadamente dos horas antes). El líquido obtenido se ingiere en tres partes durante el día, aproximadamente cada ocho horas y alejado de las horas de comida (un litro por cada día).

La corteza en cocimiento es usada dentro de la medicina popular peruana principalmente en el tratamiento de procesos degenerativos (cáncer) e inflamatorios, úlceras gástrica, diabetes, asma, etc; siendo esta parte de la planta la de mayor empleo. A esta corteza en maceración alcohólica también se le asigna propiedades antiartríticas y afrodisíacas.

Infusión.

Colocando 10gr aproximadamente de hojas en un recipiente, se agrega 200 ml de agua hirviendo, se cubre y deja reposar por 10 minutos, luego este líquido es ingerido tres veces al día (total 600 ml) este preparado es usado con menor frecuencia.

Las cosas en infusión son utilizadas como medicamento antialérgico (etnia ashaninka peruana) y como preventivo

para diversas afecciones, ya que algunos grupos étnicos les confieren las mismas propiedades de la corteza pero atenuadas.

Tintura

Se prepara con alcohol de 10% al 70% o más. Usualmente se combina con otras plantas como: “Chuchuhuasi”, “Ayahuasca”, “Sangre de grado”, para los casos de convalecencia o debilidad general, confiriéndose propiedades reconstituyentes. También se usa este preparado en patologías respiratorias.

Cápsula

Es una forma convencional que sale al mercado generalmente informal: su contenido es de 0.5gr, se usa un polvo de corteza. Otros autores recomiendan entre 2 a 6 gr. Se debe notar que las preparaciones no han sido estandarizadas. No se conoce el proceso biológico que produce la ingesta especialmente de este tipo de cápsulas (Ramírez, 1992). En todo caso lo más recomendable son las cápsulas que contienen un producto atomizado con el que se debe tener cuidado de no estar adulterado con materia prima pulverizada (Domínguez, 1997).

Pastillas o grageas

Concentrados como producto atomizado o liofilizado. Estudios farmacológicos de diferentes productos comerciales de uña de gato, realizados por Gómez, E. y Rengifo, D. (1997), han demostrado que aquellos productos que han seguido procesos de atomización y liofilización, han presentado mayores contenidos de alcaloides que los productos pulverizados. Si se tiene en cuenta que los alcaloides son los principales compuestos

que tienen efectos curativos, en este caso hay una base científica que puede diferenciar la calidad de los productos.

Otros productos

Últimamente se ha introducido al mercado otras formas de presentación de la uña de gato, como por ejemplo caramelos y pomadas. Mayormente estos son productos exclusivamente comerciales que básicamente aprovechan de la imagen del producto natural.

En la uña de gato se encuentra un líquido especial que se obtiene al cortar transversalmente el tallo fresco el líquido es transparente, semejante en sus características externas al agua fresca, que al beberlo deja un discreto sabor amargo en la boca, y es utilizado por algunos grupos étnicos porque quita el cansancio y el hambre, en otras comunidades indígenas es usado como refresco, sin otra particularidad.

1.1.8 Toxicidad aguda de *Uncaria tomentosa*

El IMET del IPSS en el año 1996, realizó estudios de toxicidad para la *Uncaria tomentosa* que consta de las siguientes fases:

a) Fase preliminar:

- Se utilizó 4 grupos de ratones albinos *Mus musculus* (ratón común) cepa BALB/c, conformado por 3 animales cada uno.
- Peso promedio 28.5 g.
- Extracto liofilizado de corteza seca, administrada VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo)

Dosis administrada	% de mortalidad
19.4737 g/kg	100%
9.7368 g/kg	100%
4.8684 g/kg	100%
2.4342 g/kg	100%

Es decir para iniciar la fase definitiva, se empleó una dosis inferior a 2.4342 g, puesto que originaba 100% de mortalidad.

b) Fase definitiva:

- Se utilizó 6 grupos de ratones albinos *Mus musculus* cepa BALB/c conformada por 6 animales cada uno.
- Peso promedio 25.5 g.
- Extracto liofilizado de corteza, administrada VIP.

Dosis administrada	% de mortalidad
2.0 g/kg	100%
1.5 g/kg	100%
1.0 g/kg	100%
0.75 g/kg	100%
0.50 g/kg	100%
0.25 g/kg	100%

Dosis Letal 50 (DL₅₀) se determinó a las:

24 hrs: 1.214221 g/kg

48 hrs: 0.4671644 g/kg

72 hrs: 0.431801 g/kg

La DL a las 72 horas, se consideró definitiva.

Roberto Capcha; Percy A. Rojas y José Aguilar referidos en el Congreso Fito 2000, realizaron otro ensayo para evaluar la dosis letal media de dos extractos estandarizados de *Uncaria tormentosa* Willd DC (Uña de gato) con 3% y 5% de alcaloides oxinodólicos totales en ratones. La DL₅₀ para el extracto de UG al 5% (Uncitolina EA5) fue de 10,799g/kg de peso corporal. Para ambos extracto de uña de gato fue asignada la categoría de “prácticamente no tóxico”.

1.1.9 Sistema de recolección de la uña de gato.

Las operaciones de extracción de la Uña de gato iniciadas desde el bosque hasta el acopiador, comprende las siguientes actividades:

1.1.9.1 Mateado.

Consiste en la exploración del bosque para ubicar la precia de lianas; normalmente el extractor ubica ambas especies y muchas veces las extrae para incrementar su oferta de producto, a pesar de que puede realizar la diferenciación entre *Uncaria tormentosa* y *Uncaria guianensis*. Esta actividad no necesariamente es sistemática, la puede desarrollar aprovechando los desplazamientos hacia los sitios de caza o cuando realizan otras actividades productivas.

1.1.9.2 Tumbado y Corte.

Consiste en cortar la liana en la base, tratando de aprovechar al máximo posible, la longitud que permitirá obtener los mayores espesores de corteza. Luego se troza en pedazos de aproximadamente 1 m de longitud.

1.1.9.3 Limpieza, Descortezado y Preparación de la Carga.

La limpieza consiste en la eliminación de la corteza externa hasta descubrir una coloración rojiza. Esta es más oscura en el caso *Uncaria Guianensis*. El descortezado es la separación de la corteza de la parte leñosa. Esta se desprende en hebras anchas a manera de cintas del mismo largo que el trozo de liana, las que son atadas en paquetes de 40 a 50 kg para su traslado.

1.1.9.4 Secado.

Normalmente se realiza en la vivienda del extractor extendiéndola sobre el suelo, plástico o calamina expuesta al sol, no siempre en condiciones adecuadas de higiene.

Durante la época seca, el secado de corteza puede demorar de 3 a 5 días. Opcionalmente, antes de su venta, puede dimensionarse la corteza a longitudes variables de acuerdo al pedido del acopiador.

En todas las zonas de producción de uña de gato, el producto comúnmente extraído es la corteza, las otras partes de la planta (leño, ramas delgadas, follaje) quedan generalmente como desperdicios en el bosque ya que comercialmente no son demandadas, principalmente por el desconocimiento de sus características (Domínguez, 1997).

1.1.10 Canales de comercialización.

La extracción de corteza de “uña de gato” se realiza a gran escala, y su acopio tiende a realizarse en forma organizada, siendo los componentes involucrados en esta actividad, los siguientes:

1.1.10.1 Extractores

Son principalmente agricultores migratorios y en menor cantidad colonos forestales.

1.1.10.2 Acopiadores

Son principalmente colonos forestales que compran corteza a los extractores y posteriormente la comercializan.

1.1.10.3 Vía de acceso

La carretera marginal es la principal vía de comunicación entre extractores y el recurso forestal, así como también entre acopiadores y extractores.

1.1.10.4 Venta al acopiador

Existen 2 formas de venta: El extractor vende la corteza limpia y seca en el lugar de acopio, implicando gasto de transporte; o el acopiador transita la carretera en busca de ofertantes de corteza. En ambos casos, el precio es variable e influenciado por los siguientes factores: contenido de humedad, estado de limpieza, presencia de hongos, peso, el extractor acepta el precio que impone el acopiador. La constatación de los 3 primeros factores se hace en forma ocular, el peso de la carga se determina con balanza romana; se pudo notar que al vender el producto, el extractor no verifica el peso marcado por la balanza del

acopiador, pudiendo ser sorprendido, y acepta, por lo general, el precio que el acopiador le propone (Carrasco, 1996).

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

En el análisis realizado a la corteza de *Uncaria tomentosa* en el INIA en el 2003 citado por Cueva (2004) se detectó la presencia de materia curtiente o tánica, alcaloides y azúcares. El análisis químico se presenta a continuación:

Cuadro No 2: Análisis Químico Proximal de la corteza Uña de Gato

Humedad	9%
Proteína	4.29%
Extracto etéreo	3.52%
Ceniza	2.57%
Fibra	52.09
Extracto libre de Nitrógeno	78.25%
Manganeso	8 ppm
Calcio	6 ppm
Hierro	40 ppm
Zn	18 ppm
Ca	0.94%
Na	0.041%
K	0.816%
Aceites esenciales	0.5%

Fuente: INIA (2003) citado por Cueva (2004)

1.2.1 Principios activos

Según Keplinger mencionado por Montesinos (1994) en la especie *Uncaria tomentosa* existen tres variedades que se pueden diferenciar

al practicarle un corte transversal al tallo en estado fresco, a cada variedad le corresponde un color que puede ser blanco, marrón o rojo oscuro.

En la corteza del tallo y de la raíz de la *Uncaria tomentosa* se encuentran los siguientes grupos activos principales:

- En el primer grupo, se menciona el estudio realizado por H. Wagner, donde encontraron 6 alcaloides Oxindólicos: mitrafilina, isomitrafilina, teropodina, isoteropodina, rincofilina e isorincofilina.
- En el segundo grupo, encontraron 7 glucósidos del ácido quinóvico, a los que los autores ha asignado nombres, enumerándolos del 1 al 7.
- En el tercer grupo, tres triterpenos polihidroxiados (Montesinos, 1994).
- En el cuarto grupo, una catequiza cuya presencia es indispensable para la acción de los principios activos.

1.2.1.1 Los alcaloides de *Uncaria tomentosa*

Los alcaloides en la naturaleza se encuentran principalmente en las raíces, corteza, hojas y semillas de las plantas.

En su gran mayoría, los alcaloides se encuentran en la forma de sales de ácidos orgánicos, pueden estar asociados a un ácido formando glicósidos de ácidos orgánicos o ésteres. Se consideran como poco solubles en agua, pero al reaccionar con los ácidos forman sales que pueden ser muy solubles en este líquido.

Obregón (1995) explica que los alcaloides son metabolitos secundarios, muchos de ellos extraídos de plantas medicinales, si bien no existe una exacta definición del concepto alcaloide, generalmente se considera en este grupo a las sustancias que poseen uno o más átomos de nitrógeno y forman un sistema cíclico, por ello se

consideran sustancias orgánicas nitrogenadas. El nitrógeno puede formar parte de una amina primaria, secundaria o de una amina terciaria. Muy rara vez se puede hallar formando parte de una amina cuaternaria.

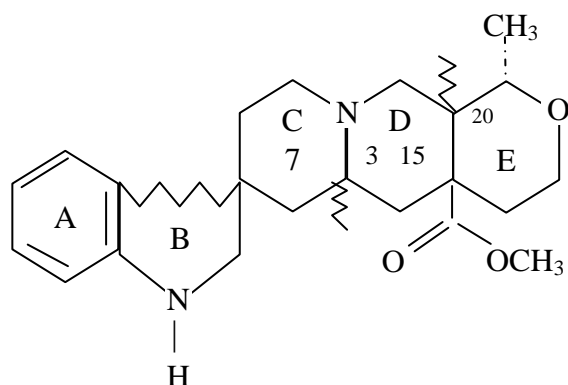
Cuadro No 3: Algunas propiedades de los alcaloides aislados de

Uncaria tomentosa

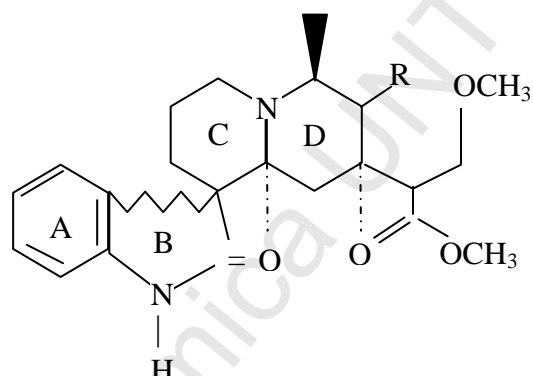
Alcaloides	PM	p.f	[α]	λ	Acc. Farm.	Rr
Isoteropodina	368	204 / 209	-85.1	208 - 243 - 283	Fagocítica	073
Pteropodina	368	214 / 219	-	208 - 243 - 283	Fagocítica	072
Isomitgrafilina	368	96 / 105	14.5	208 - 243 - 283	Fagocítica	071
Migtrafilina	368	264 / 268	-4.3	208 - 243 - 283	Hipotensor.	055
Uncarina F	368	amorfo	85	-----	-----	
Uncarina D	368	183 - 184	-91	-----	-----	
Rinchofilina	384	-----	-----	-----	-----	
Isorinchof.	384	-----	-----	-----	-----	

Fuente: Lock. (1991)

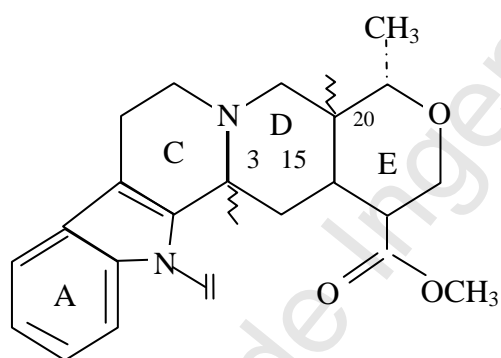
Figura 2: Estructura de algunos alcaloides de la uña de gato



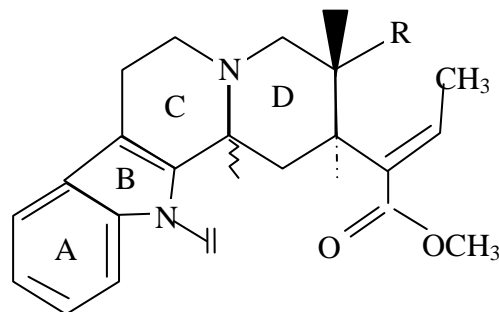
Pteropodina 3S, 7R, 15S, 19S, 20S
 Isopteropodina 3S, 7S, 15S, 19S, 20S
 Mitrafilina 3S, 7R, 15S, 19S, 20R
 Isomitrafilina 3S, 7S, 15S, 19S, 20R
 Especiofilina
 Uncaria F



Rinchofilina 3S, 7R, 15S, 20S
 Isorinchofilina 3S, 7S, 15S, 20S
 Corinoxeina
 Isocorinoxina



Akuammigina
 Tetrahydroalstonina
 Isoajarnalcina



Hirsutita
 Dihydrocorinanteina
 Hirsuteina
 Cornanteína

Fuente: Laús G, 1997

Cuadro No 4: Propiedades farmacológicas de algunos componentes químicos

Componente	Acción específico	Fuente
Alcaloides	A dosis de 3.8, 3.4 y 1.7 mg/kg de alcaloides crudos tiene efecto en el sistema nervioso central en ratas pérdida de reflejos de enderezamiento ataxia (falta de coordinación muscular), estiramiento involuntario del miembro inferior. Además disminuyen la temperatura corporal.	Ramírez, 1992
Alcaloides aislados	Aumento de la fagocitosis.	Lock, 1991
Isopteropodina + HCl Pteropodina.	Incremento de la actividad fagocítica inhibitoria del tumor de células in vitro e in vivo.	
Procianidinas diméricas y Epicatequina	Posibles causantes de la actividad antitumoral.	Montenegro et al citado por Obregón (1994)
Rincofilina	Disminuye la sensibilidad táctil Antifebril.	Ramírez (1992)
Isorincofilina e Hirsutita	Efecto bloqueador ganglionar y elevación de la transmisión parasimpática de la sensibilidad.	
Glucósidos del Acido quinóvico Triterpenos	Acciones antiinflamatorias, antivirales, de mutagenicidad y antimutagenicidad y antitumorales	Obregón, 1994

Fuente: Domínguez (1997)

Obregón (1995) refiere el trabajo realizado en 1974 por S.R. Heminway y J. D. Phillipson, quienes afirman que al encontrar oxindol alcaloides también se encuentra a los indol alcaloides; sin embargo Wagner en su trabajo de 1985, titulado “Los alcaloides de *Uncaria tomentosa* y su efecto multiplicador sobre los fagocitos”; refiere haber encontrado sólo oxindol alcaloides, esto lo atribuye a los tiempos de cosecha o la presencia de modificaciones químicas.

Wagner mencionado por Obregón (1995) se abocó a realizar pruebas con los alcaloides por separado y en conjunto, a fin de dilucidar el efecto de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Para estas pruebas se empleó el Test de Granulocitos, que sirve para medir la actividad defensiva de los glóbulos blancos, observando que los extractos etil acetato de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC, luego de su alcalinización, tenían una mejor acción fagocítica que aquellos extractos de etanol sin previo tratamiento. En esta prueba la isopteropodina – HCl tuvo el más alto índice de efectividad respecto a los otros alcaloides puros aislados.

Otra prueba de las aplicadas en este estudio por los investigadores mencionados, fue la prueba de aclaración del carbón, realizada en ratas, esta prueba es utilizada para determinar la velocidad con que el sistema retículo – endotelial reacciona frente a determinadas sustancias extrañas al organismo. Observaron una significativa acción fagocitósica en aquellas ratas a las que se aplicó un macerado acuosa con contenido alcaloide en una concentración de 10 mg/kg; una mínima acción tuvo aquellos macerados con baja concentración de alcaloides, lo cual indica una directa proporcionalidad entre la concentración de alcaloides y su efecto. Por otro lado no tuvieron eficacia los alcaloides puros mezclados; y curiosamente volvían a presentar el efecto fagocítico, al agregarse catequizas al 10%.

Sobre la base de los resultados encontrados por H. Wagner y colaboradores detallados hasta aquí, estos estudiosos concluyeron que la eficiencia del extracto de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. depende decisivamente de la coexistencia de tres factores importantes:

- a) Concentración de alcaloides
- b) Tipos de alcaloides
- c) Presencia de sustancias adicionales

Percy A. Rojas, Roberto C. Capcha; Willian de la Cruz, referidos en el Congreso Fito 2000 evaluaron la actividad antiinflamatoria de dos extractos estandarizados de *Uncaria tomentosa* Hill DC con concentraciones diferentes de alcaloides oxindólicos:

- a) Uncitolina EA5, rico en alcaloides pentacíclicos y muy pobre en alcaloides tetracíclicos;
- b) Extracto B, rico en alcaloides pentacíclicos pero con alta concentración de alcaloides tetracíclicos;
- c) Un extracto liofilizado de *Uncaria tomentosa* Hill DC.

Se utilizó la técnica del edema de la pata, inducido por Carragenina en ratones contra un control positivo que recibió Indometacina (un conocido antiinflamatorio de síntesis) y un grupo control negativo que no recibió ni UG ni Indometacina.

Los resultados mostraron una potente actividad antiinflamatoria que fue significativamente mayor con Uncitolina E5% sobre los otros dos extractos, incluso superior al efecto de Indometacina a dosis mayores. Estos investigadores concluyeron que la actividad antiinflamatoria de los alcaloides pentacíclicos de la “uña de gato” constituyen una alternativa natural en la terapia antiinflamatoria.

1.2.1.2 Los Flavonoides de *Uncaria tomentosa*

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos de diversa estructura química y características, se hallan en plantas, y hacen parte de la dieta humana.

Se encuentran en la naturaleza en frutas, vegetales, nueces, flores y corteza. De ellos se tienen reportes que muestran un amplio rango de efectos biológicos, incluyendo la acción antibacterial, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica y vasodilatadora.

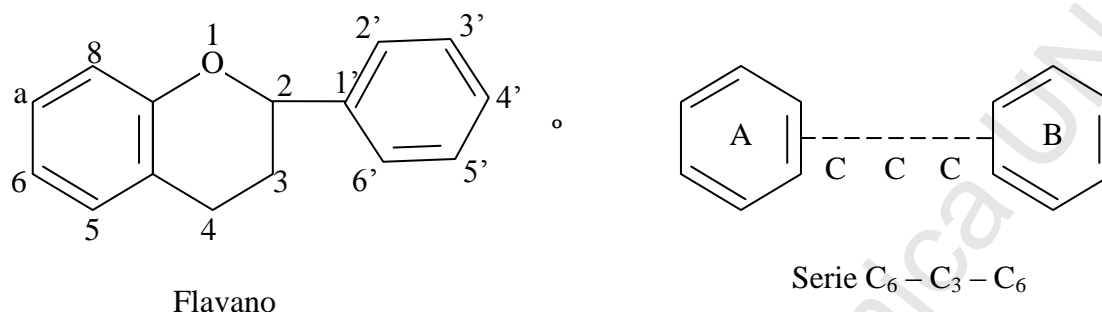
Son absorbidos en el tracto digestivo de los humanos y animales o son excretados sin cambio alguno como metabolitos secundarios en la orina y heces. Estudios realizados en las dietas de Netherlands y U.S.A., reportaron dosis de flavonoides de 23mg/día y 170mg/días respectivamente, siendo las principales fuentes de flavonoides en ambas dietas: la manzana, el té, los ajos y el vino rojo (Cook y Samman, 1996).

Los flavonoides son antioxidantes, capturadores de radicales libres, queladores de metales e inhibidores de la peroxidación de lípidos. La estructura requerida para capturar radicales libres y actuar como antioxidante en los flavonoides se debe al grupo hidroxilo en la posición del carbono 3, al doble enlace entre el carbono 2 y 3, al grupo carbonil en la posición del carbono 4 y los polihidroxiolos de los anillos A y B. estudios epidemiológicos muestran una razón inversa entre la dieta de flavonoides y la mortalidad por causa de las enfermedades del corazón, producidas en parte por la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de alta densidad. Aún es necesario más estudios para elucidar el mecanismo de absorción, el metabolismo y la acción bioquímica de flavonoides.

Klinar B. Silvia; Chang C. Artemio, referidos en el Congreso Fito 2000 realizaron un trabajo que les permitió comprobar el efecto analgésico periférico de un extracto hidroalcohólico de corteza de *Uncaria tomentosa* (Hill) D.C. “uña de gato”, empleando el ensayo de contorsiones abdominales en ratones, inducidas por ácido acético.

Los investigadores mencionados en el párrafo anterior, también estudiaron la actividad antioxidante “in Vitro” de un extracto hidroalcohólico de corteza de uña de gato, demostrando que dicho extracto tiene una actividad antioxidante 318% mayor que la vitamina C.

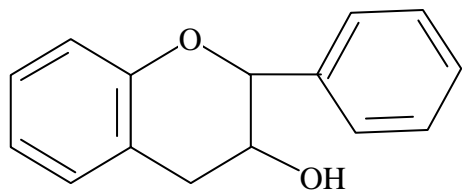
Figura 3: Estructura del esqueleto para flavonoides



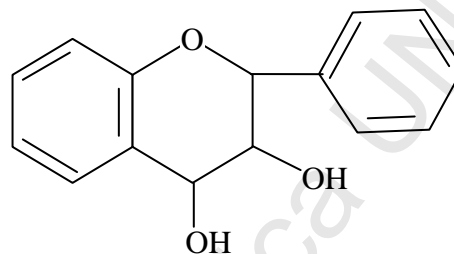
Los flavonoides están frecuentemente en las plantas en forma de glicosidos. Se conocen aproximadamente 750 de estos compuestos, de los que el más simple es la flaona, que se encuentra en la superficie de hojas y tallos de muchas especies.

Los flavonoides se dividen en varias clases, de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano. Las dos clases más importantes son los flavonoles o 3 - hidroxiflavonas, y las antocianidinas. Al ir del anillo más reducido al más oxidado, se tienen las siguientes clases de flavonoides:

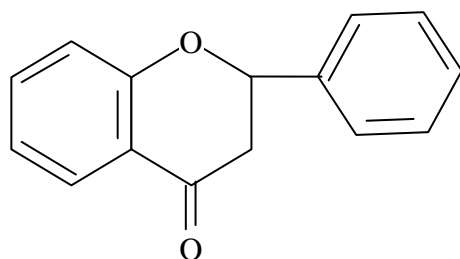
Figura 4: Estructura de algunos flavonoides



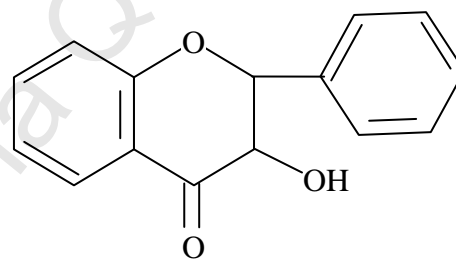
Catequinas



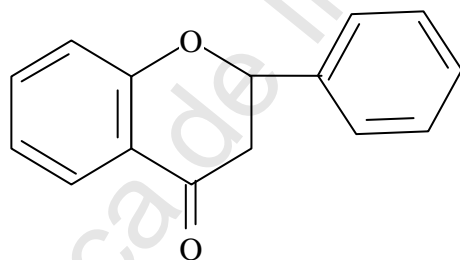
Leucoantocianidinas



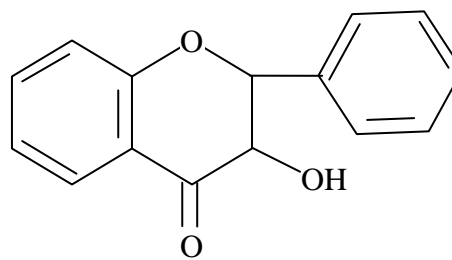
Flavanonas



Flavanonoles



Flavonas



Flavonoles

Fuente: Valencia, 1995

Los flavonoides, a diferencia de los alcaloides, son un grupo relativamente uniforme en sus estructuras, aunque a veces hay derivados más complejos como flavonas sustituidas por alcaloides o terpenoides.

1.2.1.3 Otros compuestos de la *Uncaria tomentosa*.

En la mayor parte de trabajos químicos y bioensayos practicados con el extracto de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, realizados en los constituyentes no alcaloides: glicosidos del ácido quinóico, triterpenos polioxigenados y otros, se han efectuado técnicas semejantes a las utilizadas en la identificación de los alcaloides como: transformaciones químicas, técnicas cromatográficas y espectroscópicas entre otras, principalmente en Italia, en la Universidad de Nápoles y Salerno.

Igualmente se han utilizado diversos bioensayos dentro del marco de una investigación sistemática de los diferentes componentes bioactivos de la *Uncaria tomentosa*.

Otro estudio realizado para conocer los compuestos existentes en la corteza de “uña de gato” además de los alcaloides y su efecto antiinflamatorio, fue llevado a cabo por los bachilleres Mirian Peralta y Hernán Zambrano de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. En el trabajo de tesis se utilizó una muestra micropulverizada de esta especie, la que fue tratada con éter de petróleo y cloroformo-metanol en proporción de 9:1, posteriormente se examinó la muestra con técnicas cromatográficas, identificando: esteroides, triterpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y taninos.

A fin de detectar estos metabolitos secundarios Peralta y Zambrano (1992) trabajaron las siguientes técnicas cromatográficas:

Detección de Esteroides y/o triterpenos

Técnica: cromatografía en capa fina

Fase estacionaria: gel de sílice 60F-254 (0.2mm de espesor)

Fase móvil : Benceno – Acetato de etilo 9:1

Revelador : Reactivo de Liebermann-Burchard

Detección de saponinas

Técnica : Prueba de la espuma

Prueba de la hemólisis

Obregón (1995) menciona que en 1987, Ricardo Cerri, Rita Aquino, Francesco de Simone y Cosimo Pizza, del Departamento de Química de sustancias naturales de la Universidad de Nápoles, Italia, ya habían iniciado sus investigaciones acerca de los metabolitos, en relación a los constituyentes no alcaloides.

Los glicósidos y terpenos, como compuestos químicos también han constituido motivo de investigaciones debido a sus acciones farmacológicas (Obregón, 1995).

Obregón 1995 menciona el trabajo publicadco por R. Aquino y colaboradores titulado: Plant Metabolites New compounds an Antiflamatory Activity of *Uncaria tomentosa*, en su búsqueda sistemática de metabolitos farmacológicamente activos de esta rubiacea peruana. De acuerdo a todas sus experiencias, este grupo de investigadores asume la siguiente hipótesis para explicar la intensidad de la actividad antiinflamatoria de nuestra planta nativa *Uncaria tomentosa*.

- a) Posiblemente la presencia de estructuras químicas combinadas en los extractos y fracciones de esta especie estaría ocasionando el significativo efecto antiinflamatorio.
- b) Es posible que determinadas estructuras químicas, como por ejemplo el glicósido 7, posean intrínsecamente una acción antiinflamatoria.

- c) Es probable que la actividad biológica sea potenciada por acción de otros compuestos con características sinérgicas o que actúen en calidad de vehículo.
- d) No se puede descartar que la actividad observada de los extractos y sus fracciones, por medio de los bioensayos efectuados podría ser ocasionado por otro compuesto menor (aún no aislado).

Obregón (2004) concluye en base a las investigaciones realizadas en el Perú y en el extranjero, hasta el presente, donde se han hallado evidencias de laboratorio en el sentido que *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC posee las siguientes acciones biológicas, que deben continuar investigándose para su confirmación y reconocimiento científico:

- Inmunoestimulante
- Antimutagénica

1.2.2 Identificación.

La identificación de la planta, es relativamente simple por las uñas características que posee: las de la especie tormentosa son grandes de 1 a 1.5cm de largo, ligeramente curvadas; las de la especie guianensis son más pequeñas y más curvadas.

La corteza de *Uncaria tomentosa* es delgada, fibrosa y muy dura requiere molino de martillo o de bolas para ser pulverizada; no se ha dado a conocer reacciones de laboratorio para identificarla; el ensayo que actualmente se practica, es por cromatografía en capa fina frente a un patrón de mitrafilina, que es uno de sus alcaloides componentes, obteniéndose manchas con igual RF. La determinación cuantitativa de alcaloides totales se lleva a cabo siguiendo la técnica de Keplinger (Montesinos, 1994).

De acuerdo a los conocimientos que se tiene de las estructuras químicas de aquellos, debemos suponer que todos tienen un espectro de absorción propio y característico tanto en la zona UV, como IR.

Según las múltiples experiencias realizadas en la zona UV, empleando el extracto alcohólico del polvo, a una elevada dilución, muestra una notable absorción en las longitudes de onda 210 y 280mm, como se menciona a continuación.

Se ha analizado cerca de 40 muestras de cortezas empleando el siguiente método: peso 90 mg de polvo de corteza, maceró durante 24 horas en 100 ml de alcohol de 65%, filtrando el sólido hasta obtener un líquido completamente transparente, del líquido se tomó 0.5ml y se mezcló con 25ml de alcohol de 65%, finalmente leyó esta solución en la región del U.V. Observándose dos picos de máxima absorción a 210 y 280mm en todas las muestras con pequeñas variaciones. No se sabe que sustancias de las innumerables que posee esta planta produce estos picos.

1.2.3 Preparación de la corteza del tallo de *Uncaria tomentosa* para el análisis de alcaloides.

Antes de realizar una valoración o una cualificación de alcaloides la muestra debe acondicionarse teniendo en cuenta que la mayoría de los alcaloides son ligeramente solubles en el agua, pero solubles en ciertos solventes orgánicos inmiscibles con el agua, tales como cloroformo, éter, alcohol amílico y benceno o mezcla de ellos.

Las sales de los alcaloides sin embargo, son usualmente solubles en agua, pero en la mayoría de casos muy ligeramente solubles en casi todos los solventes orgánicos.

El proceso de ensayo por solventes inmiscibles, generalmente conocido como el proceso de extracción por agitación, se basa en la propiedad de partición de los alcaloides. Es llevado a cabo mediante el tratamiento de la droga o un extracto concentrado líquido, con un solvente inmiscible con el agua en presencia de un exceso de álcali que libera el alcaloide. El alcaloide libre es disuelto por el solvente inmiscible del cual es posteriormente removido por medio de un

exceso de ácido acuoso diluido. Las soluciones ácidas son alcalinizadas, luego extraídas con un solvente inmiscible, para finalmente evaporar el solvente y obtener los alcaloides puros.

Para ensayos cualitativos no se requiere un peso exacto mientras que para los ensayos cuantitativos si es necesario, esta muestra se macera en medio alcalino con solvente orgánico, donde se liberan una serie de compuestos, de los cuales por diferentes cambios de pH y solventes se extrae y purifica los alcaloides, los que son cuantificados por titulación o son cualificados en cromatofolio de aluminio. Para el análisis cualitativo de los alcaloides en la muestra se emplea el sistema reportado por Keplinger.

1.2.3.1 Análisis cualitativo de alcaloides en *Uncaria tomentosa* por cromatografía en capa fina.

Para el análisis cualitativo de los alcaloides en muestras de corteza de “uña de gato” se emplea técnicas cromatográficas.

La cromatografía en capa fina es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas por medio de un disolvente que se mueve sobre una capa delgada de un absorbente idóneo; este absorbente, generalmente con un adhesivo, se deposita sobre una hoja de vidrio o de otro material que actúa como soporte inerte de la capa (Smith, 1979).

Para preparar la capa se hace una masa o pasta de materias finamente divididas, con un líquido apropiado, como el agua, se coloca sobre la lámina de vidrio, extendiéndola como una cubierta fina y lisa, y se seca. El absorbente, una vez seco, se adhiere a la lámina (Smith, 1979).

Como el método para hacer la pasta y el líquido de suspensión que se utiliza depende, en cada caso, del material de la capa que se emplea, varían los detalles de revestimiento.

Sin embargo, a partir de este punto, la técnica es la misma que la de la cromatografía ascendente en papel; es decir, se aplica la muestra y se deja secar, se coloca la placa en posición vertical o muy próxima a ella, en un disolvente apropiado, de manera que éste ascienda durante el tiempo preciso, después de lo cual la placa es retirada de la cubeta y secada de nuevo. Entonces se observan las sustancias, ya sea directamente, o si son incoloras, pulverizando la placa con un revelador o por tratamiento con radiación UV. Para la cromatografía bidimensional se seca la placa después de realizado el proceso monodimensional, se gira 90° y se somete a la acción del segundo disolvente, secando otra vez y revelando con el spray los componentes incoloros.

Un sistema ensayado por Peralta, M. y Zambrano, H. (1992) para alcaloides en uña de gato (*Uncaria tomentosa*) es el siguiente:

Detección de Alcaloides

Técnica: cromatografía en capa fina

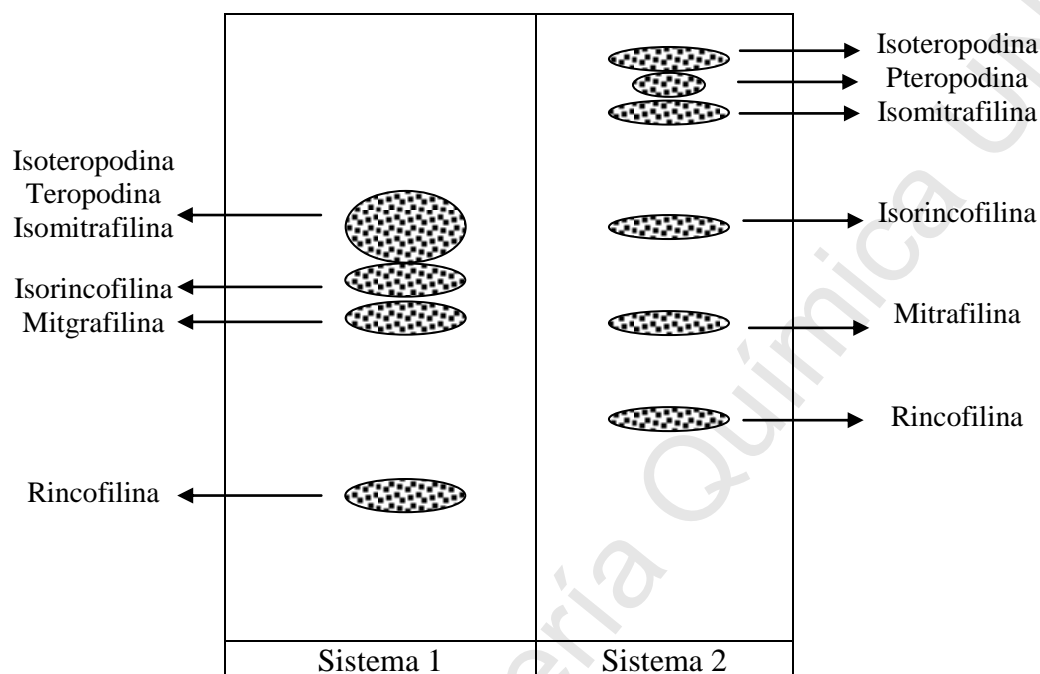
Fase estacionaria : gel de sílice 60F – 254 (0.2 mm de espesor)

Fase móvil : acetato de etilo – metanol 70 : 30

Revelador : Dragendorf

Para los alcaloides de la uña de gato se conoce dos sistemas, muy utilizados para determinar los alcaloides, estos sistemas, estos sistemas se presentan a continuación.

Figura 5: Perfil cromatográfico para algunos alcaloides de la *Uncaria tomentosa*



Fase móvil para el sistema I: Cloroformo-etanol (95:5)

Fase móvil para el sistema II: Etilacetato-Isopropanol-Amoniaco (100:2:1)

Revelador: UV corta 254 nm (manchas violetas)

Fuente: Keplinger (2004)

1.2.3.2 Análisis cuantitativo de alcaloides en *Uncaria tomentosa* empleando una titulación ácido base en medio no acuoso con ácido perclórico.

Tiene por objetivo, determinar el porcentaje de alcaloides totales, expresados como mitrafalina (ATM).

Para el ensayo de cuantificación de alcaloides es posible emplear titulaciones en medio no acuoso.

No es necesario que las titulaciones y otras reacciones de utilidad para el químico analista se efectúen empleando agua como disolvente.

Existen muchos disolventes orgánicos que pueden emplearse en vez de agua. Para titular un compuesto se puede disolver en algún disolvente no acuoso apropiado y titularlo con algún ácido o base fuerte, que también esté disuelto en disolvente orgánico.

El punto final de la titulación en soluciones no acuosas podrá detectarse empleando algún indicador visual o un potenciómetro. La exactitud de las titulaciones ácido-base en disolventes no acuosos es tan buena como la de titulaciones en agua, y en ciertos casos es mejor.

Existen dos razones principales para efectuar las titulaciones ácido-base en disolventes no acuosos.

Una de ellas se refiere a la solubilidad. Muchos ácidos y bases son compuestos orgánicos de escasa solubilidad en agua, pero que se disuelven fácilmente en el disolvente orgánico apropiado. Otra razón es que muchos compuestos tienen un grado muy bajo de acidez o basicidad para poder ser titulados en agua, pero pueden titularse con gran exactitud en disolventes orgánicos apropiados. Por ejemplo, una base débil cuya K_b sea menor de 10^{-7} ($pK_b = 7$) no podrá titularse con exactitud en agua. En ácido acético glacial, se puede titular una base cuyo pK_b (en agua) sea de 11, con gran exactitud. Los ácidos débiles, cuyo pK_a sea menor de 7, no podrán titularse en agua, pero es posible determinarlos con exactitud titulándolos con una base fuerte en el disolvente no acuoso apropiado.

En la valoración de un compuesto básico, se prefiere una solución volumétrica de ácido perclórico en ácido acético glacial, si bien en casos especiales se usa también el ácido perclórico en dioxano. Para la valoración de un compuesto, se prefiere una solución volumétrica. El final de la reacción puede determinarse visualmente por un cambio del color o por potenciometría (Farmacopea Internacional, 1970).

En el trabajo de tesis realizado por Buitrón y Coronado (2000), se empleó como método de cuantificación de alcaloides el siguiente:

La cantidad de muestra analizada fue 2g, la cual se disolvió en 50ml de H₂O acidificada (HCl), se calentó a 40°C y se agitó por 20 min. se filtró y realizaron 4 veces. La fase orgánica se concentró y el residuo fue diluido en 10 ml de ácido acético glacial, empleando como indicador cristal violeta al 0.1%. La titulación se realizó con ácido perclórico 0.03 N (viraje de violeta a verde), los alcaloides totales se expresaron como mitrafilina % ATM con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ATM} = \frac{N \times G \times M \times 100}{W}$$

Donde: N = normalidad M= P.M de mitrafilina (360)

G = gasto W = peso de la muestra

En el Congreso de Fito 2000, Juan de Dios Quiroz y colaboradores dieron a conocer las cuantificaciones de alcaloides realizados a plantas cultivadas a campo abierto, aunque la metodología no se conoce los resultados son interesantes:

- Planta proveniente de Pucallpa (154 m.s.n.m), se analizaron hojas de *Uncaria tomentosa* encontrándose 1.24 g%.
- Planta proveniente de Tingo María (670 m.s.n.m), se analizaron hojas de *Uncaria tomentosa*, encontrándose 1.59%, observándose variabilidad genética y ecológica.
- El contenido de alcaloides oxindólicos totales en las diferentes partes de la planta de la *Uncaria tomentosa* fue: Flores: 2.10%; Hojas: 1.5%; Corteza: 0.5% y Ramas con espinas 0.32%.
- El porcentaje de alcaloides totales en el extracto de Hoja de *Uncaria tomentosa* fue de 4.20%.

1.2.4 Preparación de la corteza del tallo de *Uncaria tomentosa* para el análisis de flavonoides.

Para la cuantificación de flavonoides en productos ricos en taninos no condensados, es importante trabajar con partículas de 1.2 mesh, para lo cual la molienda y el tamizado es el primer paso, realizado esto se extraen los taninos con metanol acidificado, y es con este extracto con que se prepara la curva.

1.2.4.1 Análisis cualitativo de flavonoides por cromatografía en capa fina.

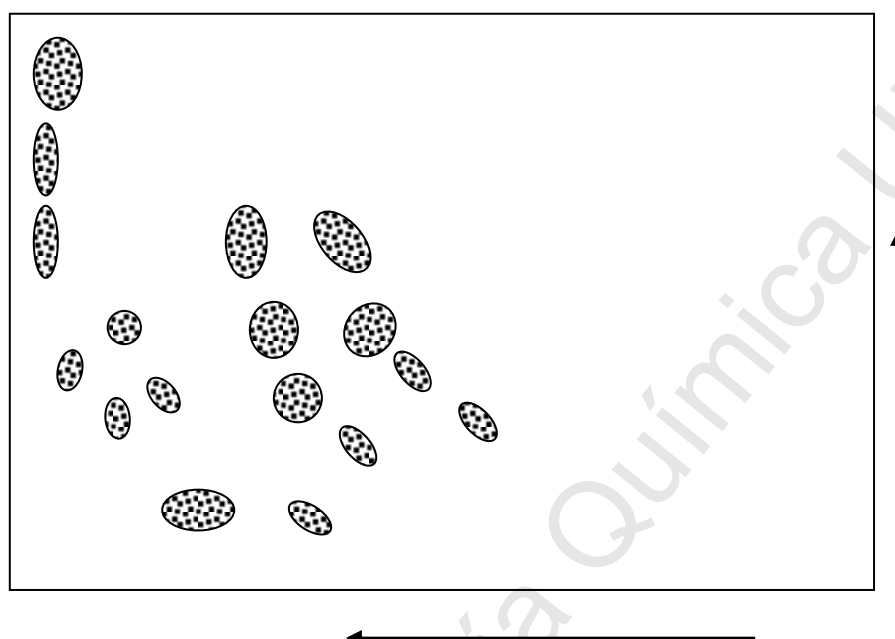
Para examinar flavonoides en extractos alcohólicos de plantas; Harbone (2004) menciona una típica separación de flavonoides en dos dimensiones en un cromatograma de papel.

Para esto se emplea una fase móvil conocida como BAW (Butanol, ácido acético y agua) además se agrega 5% de ácido acético adicional a la mezcla final. El revelado del cromatograma puede ser simple si pueden verse las manchas inmediatamente, pero la mayoría solamente aparece durante la examinación con luz ultravioleta, además de requerir vapores de amoníaco concentrado, para detectar el color.

La relativa diferencia en las posiciones de las manchas en el cromatograma da buena indicación de la naturaleza del flavonoide presente.

A continuación se presenta el cromatograma

Figura 6: Perfil cromatográfico de algunos flavonoides



Flaona y glicoflavona	
Metil-flavona, flaona, Flavonoles-3 glicósidos	
Antocianinas	

Peralta, M. y Zambrano, H. (1992), ensayaron una técnica de taninos APRA ña de gato muy parecida a la mencionada por Harbone (1973), con la diferencia en el revelador empleado.

Detección de taninos

Técnica: cromatografía en capa fina.

Fase estacionaria: gel de sílice 60F – 254 (0.2mm de espesor)

Fase móvil: n - Butanol – ácido Acético – agua (BAW) 4:1:5

Revelador: Tricloruro de Hierro al 1% en agua.

Otros sistemas ensayados para compuestos de tipo flavonoides.

Detección de compuestos fenólicos, flavonoides y cumarinas

Técnica: cromatografía en capa fina.

Fase estacionaria: gel de sílice 60F–254 (0.2mm de espesor)

Fase móvil: n – Butanol – Acido acético – agua (BAW) 4:1:5

Revelador: Luz ultravioleta 366 nm tricloruro de aluminio (para flavonoides y cumarinas), tricloruro de hierro (ara compuestos fenólicos).

Detección de flavonoides

Técnica: cromatografía en capa fina

Fase estacionaria: gel de sílice 60F-254 (0.2mm de espesor)

Fase móvil: Cloroformo – metanol 9:1

Revelador: Luz ultravioleta 366nm/tricloruro de aluminio

1.2.4.2 Análisis cuantitativo de flavonoides por espectrofotometría.

A continuación se describe el método utilizado por Price et al (2006) para cuantificar taninos condensados en frijoles, empleando el ensayo modificado de la vainillina.

Una diferencia de este método en relación con otros métodos de cuantificación de flavonoides es la especificad para un limitado grupo de flavanoles y dihidrochalconas que tienen un enlace simple entre las posiciones 2,3; un grupo alcohólico en posición 3 y un hidroxil libre en posición meta del anillo B, a diferencia de otros métodos que detectan cualquier fenol presente.

Consiste en hacer reaccionar los polifenoles (flavonoides) con el reactivo vainillina en medio ácido para formar una solución de color salmón. La cantidad de flavonoides en la muestra será determinada usando una curva patrón de catequina.

1.3 PRINCIPALES OPERACIONES RELACIONADAS CON LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.

1.3.1 Mecanismos de extracción sólido – líquido.

Los mecanismos de extracción y su importancia relativa varían ampliamente según la naturaleza del producto tratado. Sin embargo, el desarrollo de la extracción puede esquematizarse del modo siguiente:

- **Porción del Solvente en la Fase Sólida**

Se observa el hinchamiento de las partículas o de los fragmentos sólidos, lo que evidencia la porción del solvente en la fase sólida. Dicha porción está provocada por fuerzas osmóticas, de capilaridad y de solvatación de los iones de las células.

- **Lavado**

Cierto porcentaje del soluto contenido en las células dañadas durante el corte o la molturación del producto se extrae directamente por lavado. Dicho porcentaje varía entre un 10% y un 20% en función de la naturaleza del producto.

- **Disolución de los componentes solubles**

A la anterior disolución de los componentes solubles, se le añade la solubilización de una fracción naturalmente insoluble, mediante hidrólisis. La hidrólisis puede ser solamente química: Este es el caso de la degradación de las hemicelulosas del café en oligosacáridos, que tiene lugar alrededor de los 180°C en medio naturalmente ácido (pH cercano a 5).

El pH del medio de extracción interviene principalmente en la disolución de los compuestos solubles y en la solubilización de la fracción hidrolizable.

- **Rendimiento**

La palabra rendimiento es entendida de diferentes formas, dependiendo del tipo de proceso llevado a cabo, en la industria cervecera esta palabra refiere a la masa de extracto seco obtenida en el mosto respecto a la masa bruta de harina de malta empleada. Mientras que para la industria del café o té se trata de la masa de extracto seco obtenida respecto a la masa de extracto seco soluble inicial de la fase sólida.

Para determinar el rendimiento, basta con conocer:

- Masa del sólido tratado.
- Su contenido en el componente deseado y su extracto seco soluble.
- Volumen del extracto obtenido, concentración del extracto en el componente deseado y su extracto seco total.

- **Selectividad**

En algunas industrias, la preocupación por la selectividad se limita a no extraer ciertos componentes indeseables (cervecera, café, té, etc.). por el contrario, en otras se pretende extraer un solo componente (azúcar) o una fracción muy bien definida.

1.3.2 Preparación de extractos.

Las manipulaciones que se requieren para preparar extractos incluyen temas como: maceración, expresión, lixiviación, decocción, infusión, evaporación, aplicación de calor de vapor, aparatos de vacío, etc.

El disolvente o menstro que se ha de emplear en la preparación de un extracto depende de los caracteres físicos de la droga y de la naturaleza de sus componentes. Los disolventes más usuales son el agua y el alcohol, o las mezclas de éstos en las proporciones que se especifican en las fórmulas respectivas. Para extraer una cuantas drogas se requiere añadir al disolvente un ácido o álcali.

1.3.3 Reducción de tamaño.

La reducción de tamaño es aquella operación unitaria en la que el tamaño medio de los alimentos sólidos es reducido por la aplicación de fuerzas de impacto, compresión o abrasión. A la pulverización y formación de partículas de muy pequeño tamaño se le denomina también trituración. La reducción de tamaño se aplica también a la disminución del tamaño de glóbulos de líquidos a pequeñas gotitas.

Una de las ventajas de la reducción de tamaño en el procesado de alimentos es la siguiente:

- Aumento de la relación superficie/volumen: Con ello se incrementa la velocidad de deshidratación y la de calentamiento o enfriamiento y se mejora la eficacia y la velocidad de extracción de compuestos solubles.

1.3.4 Maceración.

La maceración consiste sencillamente en remojar la droga o sustancia, debidamente fragmentada, en un menstruo, hasta que éste penetre muy bien en la estructura celular y se ablande y disuelvan las porciones solubles. Se pone la droga en un frasco con el disolvente, se tapa bien aquel y se agita de cuando en cuando por un periodo de dos o catorce días; luego se decanta el líquido, se exprime el residuo para evitar la pérdida. Se requiere cierto tiempo para la maceración, y para preparar algunas tinturas se recomienda la agitación.

Luego se separa el líquido por coladura o exprimiendo el residuo insoluble, y después que se deja asentar, se filtra. Se ha de evitar cuanto sea posible la evaporación durante la filtración. La maceración no tiene ninguna ventaja sobre la lixiviación para confeccionar gran número de preparados líquidos de drogas.

Para realizar este proceso de maceración no requiere ninguna destreza ni criterio alguno.

1.3.5 Concentración.

La concentración, también definida como evaporación es la operación de concentrar una disolución por ebullición y la separación del solvente utilizado en la extracción.

La concentración de los líquidos se efectúa con el fin de ayudar al secado posterior. Para reducir el riesgo de deteriorar los productos sensibles al calor durante la evaporación se debe mantener baja la temperatura de ebullición y utilizar tiempos de residencia cortos, de la solución en la zona de calefacción.

Las temperaturas de concentración son menores cuando la presión de evaporación es reducida.

La concentración consiste en la eliminación del agua de los alimentos líquidos por ebullición. En contraste con otros métodos de concentración (por ejemplo: concentración por membranas en los que el agua se elimina haciendo uso de las diferencias existentes entre las velocidades de difusión a temperatura ambiente, o a la concentración por congelación, en la evaporación la separación del agua se consigue aprovechando las diferencias existentes entre la volatilidad de esta y la de los solutos.

Los principales objetivos de la concentración son los siguientes:

- 1) Reduce su peso y volumen. La evaporación permite un ahorro energético en operaciones de elaboración subsiguientes y reduce los gastos de almacenamiento transporte y distribución.
- 2) Aumenta el contenido en sólidos totales (por ejemplo: mermeladas y melazas) y mejora su conservación por reducción de su actividad de agua.
- 3) Suministra un producto de uso más cómodo para el consumidor (concentrados de frutas para diluir, sopas y pastas de tomate).

La concentración, también definida como evaporación es la operación de concentrar una disolución por ebullición y la separación del

solvente utilizado en la extracción. La concentración de los líquidos se efectúa con el fin de ayudar al secado posterior.

Para reducir el riesgo de deteriorar los productos sensibles al calor durante la evaporación se puede mantener baja la temperatura de ebullición y utilizar tiempos de residencia cortos, de la solución en la zona de calefacción.

Las temperaturas de ebullición se disminuyen reduciendo la presión de trabajo del evaporador.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIA PRIMA

Para la caracterización del extracto elaborado y la optimización de los parámetros de extracción por maceración se trabajó con cortezas del tallo de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) procedentes de la localidad de Semuya (Dist. De Honoria) Departamento de Huánuco, las cuales tenían 2 años de antigüedad.

2.2 MATERIALES

En general material de vidrio (matraces, buretas, fiolas, embudos, pipetas, termómetro, vasos de precipitado, baguetas, pignómetro, embudos, micropipeta, etc.).

2.2.1 Equipos

- Equipo de destilación de Kjeldahl
- Agitador magnético. Sargent. Hot plate. Model H
- Bomba de vacío. Welch Vacuum pump. Model 1410
- Bortex (agitador de tubos)
- Baño María Memmert W350r
- Balanza de platillo. Sauter S2000
- Balanza analítica. MIM labor. TIPE LB – 105
- Batería de Soxhlets con cocinillas
- Campanas desecadoras
- Cocinilla eléctrica GLH N° 933987. Type CT – 10
- Espectrofotómetro, rango de U.V. Perkin Elmer α
- Estufa. Thelco. Serie N° 15 – Y - 5
- Juego de tamices. Tyler (60, 30, 16,9)
- Lámpara manual UV λ corta y λ larga
- Molino de cuchillas. Wiley Mill. Model N° 3
- Mufla. Labor Muszeripari Muvek.

- Potenciómetro. Hanna. Instruments 8520
- Rotavapor. Buche. N 374765. Type: W240W
- Termómetros.

2.2.2 Reactivos

- Alcohol etílico, 96° GL (Montana)
- Ácido acético glacial 100% (Merck)
- Ácido perclórico 0.1 N (Merck)
- Ácido clorhídrico 37% (Merck)
- Ácido sulfúrico 95 – 97% p.a (Merck)
- Ácido cítrico (Baker Analyzer)
- Catequina (Sigma)
- Cloroformo G.R (EM)
- Cromatofolio de aluminio – sílica gel 60 F254 (Merck)
- Cromatofolio de aluminio – celulosa 20x20 (Merck)
- Hidróxido de amonio al 25% Q.P. (Merck)
- Indicador cristal violeta
- Metanol Q.P. (Merck)
- Sulfato de sodio anhidro (Merck)
- Vainillina (Sigma)

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.1 Análisis físico – químico de la materia prima

(Corteza de uña de gato – *Uncaria tomentosa*)

2.3.1.1 Humedad

Se determinó utilizando el método gravimétrico porcentual donde un peso exacto es sometido a calentamiento en estufa a 105°C por 6 horas hasta obtener un peso constante (HOAC, 930-04, 1990).

2.3.1.2 Grasa

Se utilizó el método Soxhlet empleando hexano para la extracción siguiendo la norma técnica peruana (NTP 206.017, 1987).

2.3.1.3 Ceniza

Se utilizó el método de la A.O.A.C, 930.05, (1990), la muestra fue incinerada a 550°C hasta quemar todo el material orgánico.

2.3.1.4 Proteína

Se utilizó el método Semimicro Kjeldahl, considerando 6.25 como factor de conversión, (A.O.A.C, 920.87, 1990).

2.3.1.5 Fibra

Este análisis se determinó con la muestra previamente seca y desgrasada según metodología propuesta por FAO (1986) Vol 14/7.

2.3.1.6 Carbohidratos

Se obtuvo por diferencia después de la composición porcentual de la humedad, ceniza, proteína, grasa y fibra cruda.

2.3.1.7 pH

Para la determinación del pH se utilizó el método de la (HOAC, 970.21, 1995), utilizando para ello un potenciómetro.

2.3.1.8 Alcaloides totales. (% de ATM)

Para la cuantificación de alcaloides se desarrolló el método propuesto por Cueva, 1998. Este método consiste en tomar un peso exacto de muestra (si es sólido) o un volumen conocido si es un extracto para someterla a una extracción por maceración, purificación por extracciones en medio ácido-base y titulación en medio no acuoso con ácido perclórico.

2.3.1.9 Flavonoides (Cuantificación de taninos condensados)

Se empleó el método espectrofotométrico de la vainillina modificado por (Price et al, 1978). Este método permite cuantificar taninos condensados empleando una curva patrón de catequiza, la vainillina forma un cromóforo con este tanino, permitiendo leer las muestras (corteza y extracto de uña de gato) a 500 nm.

2.3.2 Análisis realizados para seleccionar las mejores variables de extracción por maceración.

2.3.2.1 Cuantificación de extracción Seco.

La finalidad de este proceso fue evaluar los sólidos presentes en el extracto hidroalcohólico de uña de gato. Por este método se conoce el total de sólidos presentes en un volumen de extracto.

Para ello luego de obtenido el extracto se toma 0.5ml del volumen final del filtrado y se calienta en la estufa a 80°C por 4 horas, luego de este tiempo se verifica que el peso sea constante. Método de la Farmacopea Internacional, 1970.

2.3.2.2 Cualificación de alcaloides – cromatografía en capa fina (TLC).

Sembrar una pequeña cantidad (5 uL) de los extractos obtenidos en los ensayos para la selección de parámetros de extracción, en cromatofolios de aluminio de silicagel F – 254.

Se empleó como la fase móvil: etanol/cloroformo (5/95) con una corrida de 14cm. para la separación de los alcaloides (incolores), al final de la corrida se observó el cromatofolio al U.V – 254 revelándose manchas violeta, por la presencia de alcaloides.

2.3.3 Protocolo de análisis para la caracterización del extracto final.

2.3.3.1 Cuantificación de alcaloides totales.

Para cuantificar alcaloides se debe tener en cuenta la naturaleza de la muestra, es así que para analizar la corteza se toma un peso exacto (10 g) de muestra y para un extracto se toma un volumen exacto (25ml), posteriormente los pasos del método son los mismos, a continuación se describe el método de cuantificación de alcaloides aplicado a un extracto.

Se macera 25 mL de extracto con 25ml de cloroformo y 8mL de solución de amoníaco al 25%. Luego de 14 horas de tratamiento, se

filtra y se procede a extraer por partición los alcaloides, empleando peras de separación.

Primero se acidifica (pH=3) con un volumen de ácido sulfúrico 0.5N, realizándose 3 extracciones ácidas, donde los alcaloides se hallan bajo la forma de sales. Luego de la cuarta extracción ácida se alcaliniza con una solución de amoniaco al 10%, hasta alcanzar un pH = 11.

Una vez alcalinizado se realizan 4 extracciones con cloroformo (25ml), los que son desecados con sulfato de sodio anhidro. Se filtra y se concentra al rotavapor hasta dejar un residuo sólido, el cual se disuelve con ácido acético glacial y se titula con ácido perclórico (0.1 N) empleando cristal violeta como indicador. Para la titulación se emplea una microbureta.

Finalmente para hallar el porcentaje de alcaloides en la muestra se aplica la siguiente fórmula:

$$\% ATM = \frac{G \times N \times 360}{V} \times 100$$

Donde: N = normalidad del ac. Perclórico

M = 360g (P.M de mitrafilina)

G = gasto de ac. Perclórico

V = volumen de extracto analizado

2.3.3.2 Cuantificación de taninos condensados.

Para la cuantificación de flavonoides en el extracto se empleó el método modificado de la Vainillina de Price et. al 2003, mencionado por Del Pino, 2004.

Conociendo la cantidad inicial de flavonoides en la corteza de uña de gato, se procedió a cuantificar este principio activo en el extracto.

Este extracto se preparó a partir de 5gr de corteza y empleando los parámetros encontrados para optimizar el proceso de extracción por

maceración (8 horas de maceración a 65°C, con alcohol de 50°GL, se maceró con 60ml del solvente y con un tamaño de partículas de 0.5mm.

Procedimiento para el extracto

Luego de elaborado el extracto, se procede a su filtración empleando vacío a fin de obtener mayor volumen filtrado. De este volumen final medido se toma 1 ml del extracto y se enrasa a 10 ml con metanol acidificado al 1%.

De este se toman alícuotas de 100,200 y 300 UI. en tubos de ensayo, agregándoles metanol puro hasta completar el volumen de 1ml en todos los tubos. A todos ellos se les agrega 5 mL de vainillina, produciendo una coloración salmón.

Para elaborar el blanco se sigue el mismo procedimiento pero no se agrega la vainillina sino el metanol acidificado al 4% (5ml), el tubo para el blanco corresponde a la concentración intermedia de las diluciones hechas para la muestra.

Se agitan los tubos, (utilizando un vortex) y se calienta a baño maría a 30°C por 20 min. Luego proceder a medir las absorbancias.

Procedimiento para la curva patrón:

Esta se elaboró con catequiza en concentraciones de 0.2mg hasta 1mg a partir de una solución de 2mg de catequiza/ml de metanol. Se agrega metanol puro hasta alcanzar 1ml en todos los tubos y 5 ml de vainillina, agitar (empleando un agitador de tubos), calentar a baño maría por 20 min a 30°C. Luego se mide las absorbancias de los tubos.

El reactivo de la vainillina se trabajó a 30°C y rápidamente. Este fue preparado mezclando en partes iguales de una solución de vainillina al 1% en metanol y de una solución de ácido clorhídrico al 8% (v/v) en metanol.

Las lecturas se realizaron rápidamente a 500 nm en un espectrofotómetro UV WINLAB (Software package for UV/Vis/Nir) Espectroscopy - Perkin Elmer.

2.3.3.3 Densidad

Se realizó con el pignómetro en volumen de 25ml y empleando una balanza analítica.

2.3.3.4 Extracto seco

La finalidad de este proceso fue evaluar los sólidos presentes en el extracto concentrado de uña de gato. Por este método se conoce el total de sólidos presentes en un volumen de extracto.

Para ello luego de obtenido el extracto se toma 0.5ml del volumen final del filtrado y se calienta en la estufa a 80°C por 4 horas, luego de este tiempo se verifica que el peso sea constante. Farmacopea Internacional, 1970.

2.3.3.5 Sólidos solubles

Se empleó el refractómetro manual, obteniendo el porcentaje de sólidos expresados como grados brix.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación se dividió en 3 etapas:

1. Evaluación en la Materia Prima: Cualificación, cuantificación de alcaloides y cuantificación de flavonoides.
2. Ensayos preliminares en la optimización de parámetros de extracción por maceración de la corteza del tallo de uña de gato: tamaño de partícula, relación materia prima/solvente, tiempo y temperatura, número de extracciones.
3. obtención del extracto final seleccionado – caracterización del extracto concentrado.

3.1 EVALUACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.

Para realizar los análisis del estudio se acondicionó la materia prima a fin de uniformizar el punto de partida para todos los ensayos.

3.1.1 Acondicionamiento de la materia prima.

A continuación se describe cada una de las operaciones realizadas. Resumidas también en la Figura 7.

a. Recepción

La materia prima fue pesada, y luego se tomaron muestras para realizar el análisis proximal, cualificación, cuantificación de alcaloides y cuantificación de taninos.

b. Selección

En la selección se separaron las cortezas que presentaban contaminación por hongos.

c. Lavado

Esta operación se realizó a fin de eliminar tierra, contaminantes, y restos orgánicos con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1%.

d. Secado

Esta operación se realizó a fin de llegar a una humedad de 10% la que no permita el crecimiento de hongos y facilite la molienda. El secado duró 48 horas a 50°C.

e. Molienda y Tamizado

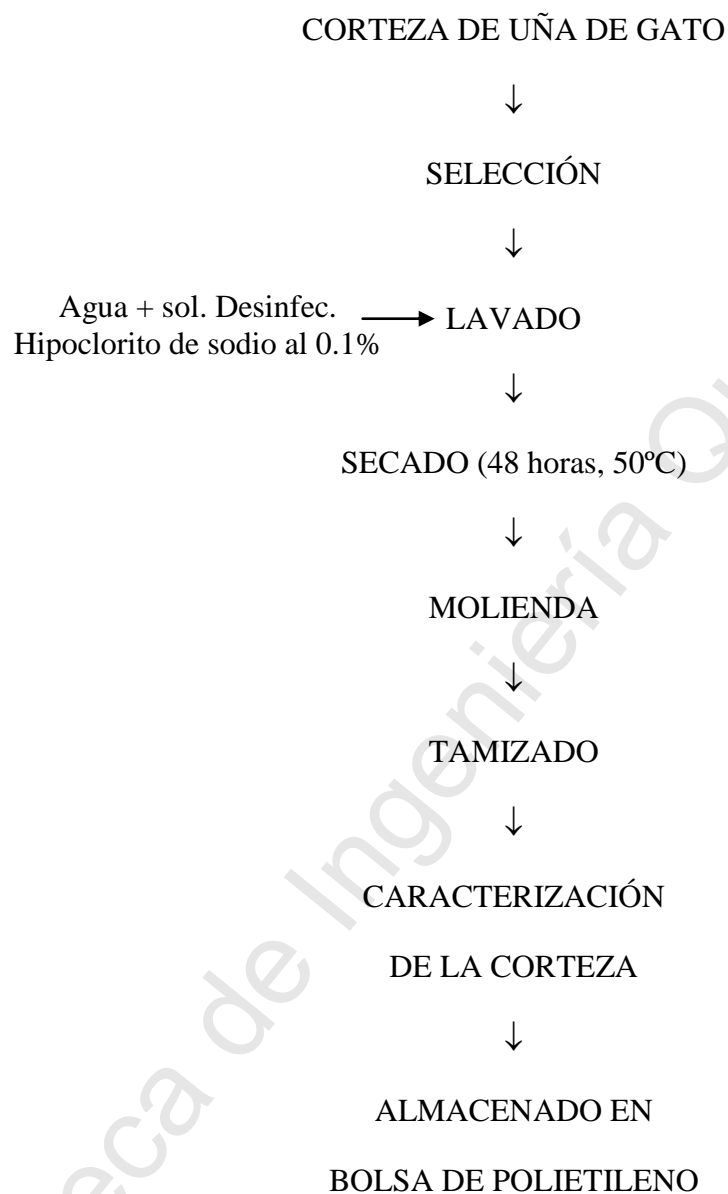
Esta operación se realizó en un molino de cuchillas con las respectivas mallas para reducir el tamaño de la corteza a pequeñas astillas y partículas, las que fueron pasadas por un juego de tamices Tyler (N° 60, 30, 16,9) a fin de seleccionar 4 tamaños para ensayos preliminares.

f. Envasado

A fin de proteger la corteza molida y seca de contaminación por insectos y roedores se guardó en bolsas de polietileno.

Figura 7:

Flujo para el acondicionamiento de la materia prima – uña de gato



3.1.2 Cualificación y cuantificación de alcaloides y cuantificación de taninos condensados.

- f1. La muestra fue sometida a diferentes análisis a fin de conocer su composición centesimal.
- f2. Para la cuantificación de alcaloides se empleó un método de extracción continua, la purificación de los principios activos se realizó por extracción con agitación y variación de pH, para finalmente cuantificar por titulación ácido-base en medio acuoso. Cueva (1998).
- f3. Para la cuantificación de taninos no hidrolizables expresados como catequizas se empleó el método de la vainillina modificado, empleado por Del Pino M. 1992.
- f4. Para la cualificación de alcaloides se empleó la cromatografía en capa final y el sistema cromatográfico N° II de Kepliger (2004).

3.1.3 Estudio de las variables de extracción por maceración de la corteza de uña de gato.

En esta etapa del trabajo se utilizó la corteza de uña de gato proveniente del departamento de Huanuco. Se evaluaron los parámetros de extracción para optimizar el rendimiento en extracto seco. Cada uno de los ensayos se describe a continuación:

3.1.4 Determinación del tamaño de partícula.

Para este ensayo se emplearon cuatro tamaños de partículas: P1 (0.25mm), P2 (0.5mm), P3 (1mm) y P4 (2mm), que corresponden a los siguientes N° de malla 60, 30, 16,9 respectivamente. Con estos tamaños se obtuvieron extractos por maceración con agitación a temperatura ambiente (6 horas), donde la relación materia prima solvente es 1:12. En este ensayo se cuantificó el extracto seco (sólidos totales) y se realizaron cromatografías de estos cuatro extractos para comparar los sólidos totales y sus perfiles cromatográficos. Fig (5).

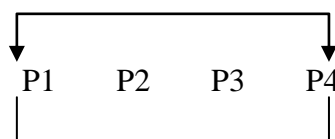
Figura 8: Esquema experimental para evaluar el tamaño de partícula

MATERIA PRIMA ACONDICIONADA



PESADO

Cuatro tamaños de partículas



MACERACIÓN



FILTRADO

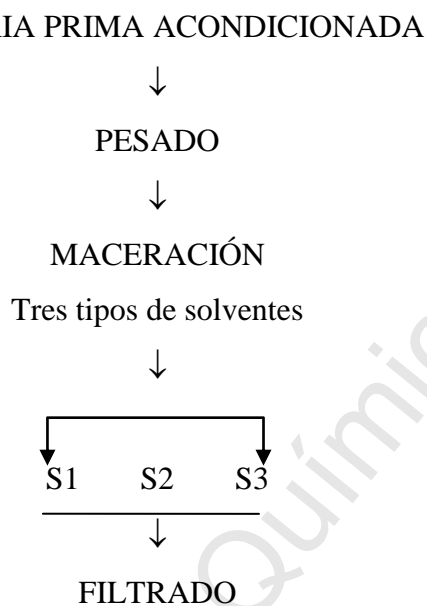
3.1.5 Estudio del Disolvente para la Extracción.

Con el tamaño de partícula elegido se estudiarán los siguientes solventes:

- Alcohol al 10°GL
- Alcohol al 50°GL
- Alcohol al 95°GL

Para elaborar los extractos por maceración se tendrá en cuenta la relación materia prima: solvente (1:12) encontrada en el ensayo anterior, el tamaño de partícula anteriormente seleccionado, el tiempo de extracción de seis horas y la temperatura ambiental. Figura 9.

Figura 9: Esquema experimental para evaluar el tipo de solvente



3.1.6 Relación Materia Prima Solvente

Habiendo seleccionado el tamaño de partícula y el solvente adecuado se procede al análisis de la relación materia prima – solvente.

1:8 1:10 1:12 1:15

Las condiciones de extracción, serán similares a las anteriores, maceración a temperatura ambiente por 6 horas y de acuerdo a los parámetros seleccionados anteriormente.

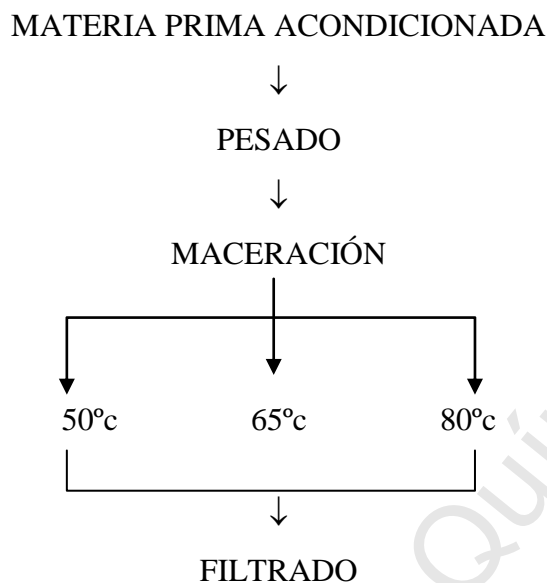
Figura 10: Esquema Experimental para Evaluar la Relación Materia



3.1.7 Influencia de la Temperatura de Maceración

Para seleccionar la temperatura de maceración se preparó una muestra con los parámetros ya encontrados, macerándose por 6 horas a las siguientes temperaturas: 50°C, 65°C y 80°C.

Figura 11: Esquema experimental para evaluar la temperatura

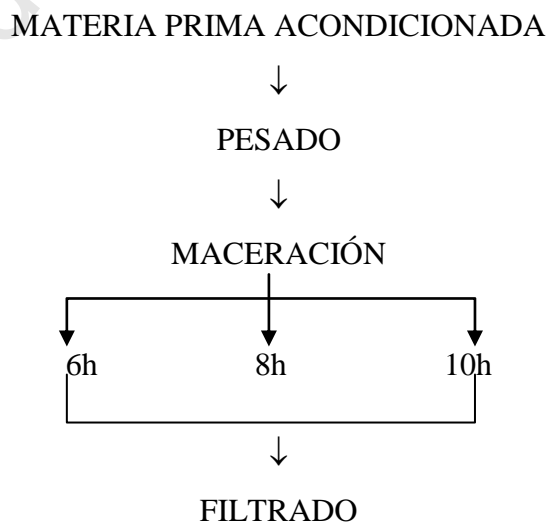


3.1.8 Influencia del Tiempo de Maceración

Para seleccionar el tiempo de maceración, se preparó una muestra con los parámetros ya encontrados y con los siguientes tiempos: 6h, 8h y 10h.

Figura 12:

Esquema experimental para evaluar la temperatura



3.1.9 Estudio de la Torta Residual

A fin de conocer si existe una cantidad significativa de sólidos que justifique una extracción adicional. Se realizó una segunda extracción empleando las variables encontradas de tamaño de partícula, solvente de extracción, relación materia prima: - solvente, influencia del tiempo y temperatura.

Figura 13:

Esquema experimental para evaluar la torta residual de extracción



3.1.10 Descripción del Procedimiento Final

El procedimiento final se describe en la Figura 14:

- **Recepción de la Materia Prima**

La materia prima fue pesada, a fin de realizar el balance de materia del proceso.

- **Selección de la Materia Prima**

Se selecciona las cortezas que no presenten contaminación por hongos.

- **Lavado**

Esta operación se realiza a fin de eliminar tierra, contaminantes, y otros. Empleándose una solución desinfectante de 0.1%.

- **Secado**

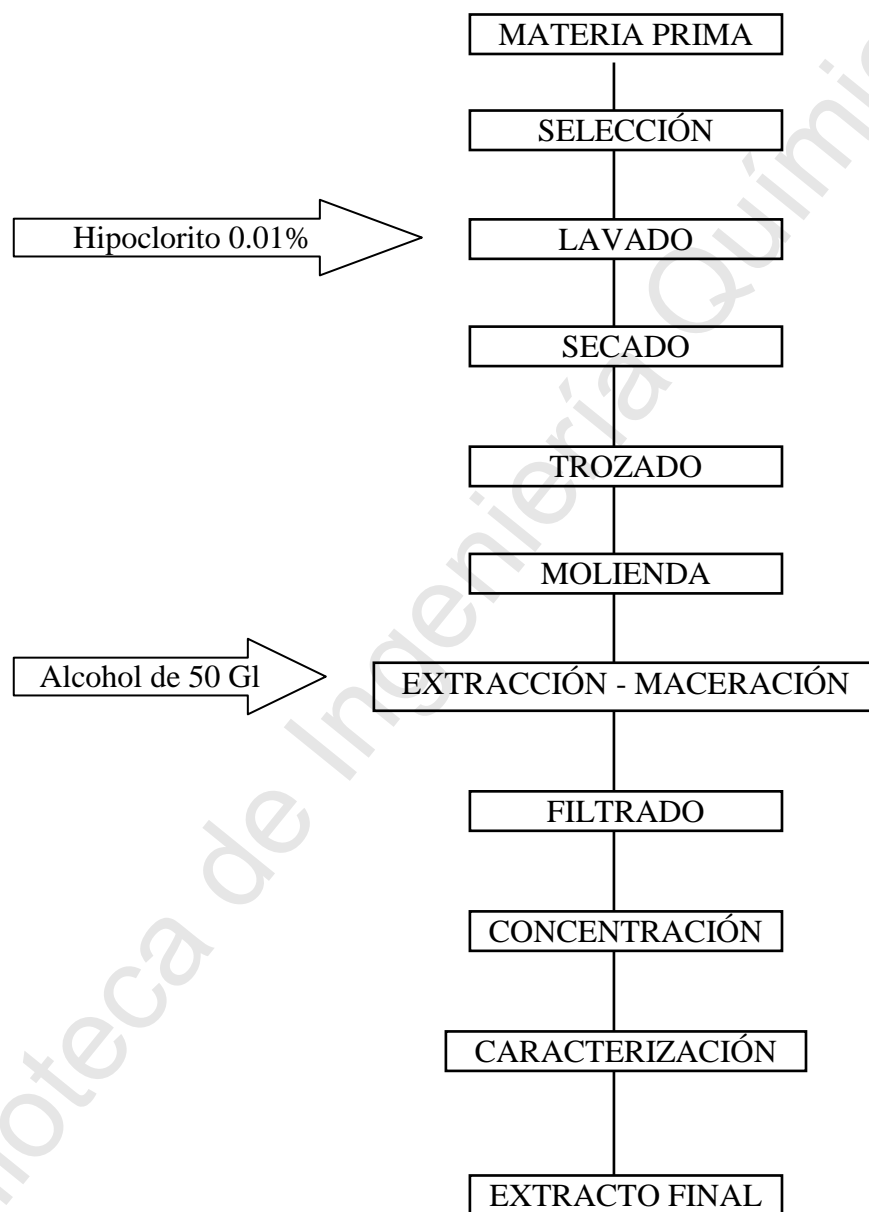
Esta operación se realiza a fin de llegar a una humedad de 10% la que no permita el crecimiento de hongos y facilite la molienda. El secado se realiza por 48 horas a 50°C.

- **Molienda y Tamizado**

Esta operación se realiza en un molino de cuchillas para reducir el tamaño de la corteza a pequeñas astillas y partículas, las que serán pasadas por un tamiz N° 30 a fin de emplear en la extracción el tamaño seleccionado de 0.5mm.

Figura 14:

Diagrama de Flujo para la Obtención del Extracto Hidroalcohólico de *Uncaria*
tormentosa



- **Extracción**

Se extraen dejándolos en reposo con calentamiento (65°C) por 8 horas a fin de extraer los principios activo de la corteza de uña de gato.

- **Filtrado**

A fin de separar el sólido del extracto y analizarlo se realizó filtraciones al vacío (4.5 cmHg).

- **Elaboración del extracto**

El extracto elegido se elabora con 30 gr de muestra (0.5mm) y 360 ml de alcohol de 50°Gl, se macera a 65°C por 8 horas.

- **Concentración del extracto fluido: extracto final**

El equipo utilizado fue un rotavapor con un baño regulador de temperatura conectado a un sistema de vacío. La temperatura de concentración fluctuó entre los 55-60°C y una presión de vacío de 4.5 cmHg mediante la evaporación se recuperó la mezcla hidroalcohólica.

- **Determinación de rendimientos**

Se hizo en función al cambio de peso entre una operación unitaria y otra operación.

3.1.11 Análisis Estadístico.

Para la determinación del tamaño de partícula, relación materia prima: solvente, elección del solvente, elección del tiempo y la temperatura se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones, los ensayos se realizaron por triplicado. Posteriormente se utilizó la prueba de comparación de Duncan.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DE LA MATERIA PRIMA

4.1.1 Análisis proximal

La composición química de la corteza del tallo de la uña de gato, se muestran en el cuadro 6. Se observa que la fibra constituye el mayor porcentaje de la corteza, lo cual también ha sido reportada en una muestra de *Uncaria tomentosa* analizada en el I.N.I.A, citada por Cueva (2004). La humedad de la corteza empleada es muy próxima a la humedad (9%) de la corteza encontrada en la bibliografía antes mencionada.

Cuadro No 5: Análisis proximal de la uña de gato

Característica	Resultados (%)
Humedad	8
Grasa	4.7
Proteína	3.3
Carbohidratos	31.7
Fibra	45.6
Cenizas	6.7
pH	4.9

Se observa que las proteínas constituyen un porcentaje muy bajo de la corteza empleada en el presente trabajo, esto también se observó en la corteza analizada en el INIA citada por Cueva (1998), donde dicha muestra contenía 4.29% de proteínas. en cuanto a las cenizas si se observa mucha variación, la bibliografía antes citada encontró 2.57% de cenizas mientras la muestra trabajada contiene 6.7gr%, esto se debe a que ambas plantas no provienen del mismo lugar, ya que el suelo, el clima, y otros factores del medio influyen en la composición química de la corteza.

4.1.2 Determinación del porcentaje de alcaloides y flavonoides.

Al aplicarse las tecnologías descritas en los ítems 1.2.3.2 y 1.2.4.2, se obtuvieron los resultados presentados en el cuadro 6 para la corteza del tallo de la uña de gato (materia prima).

Cuadro No 6:

Alcaloides totales y flavonoides en la corteza de *Uncaria tomentosa*

Principio Activo	g/100g de corteza
Alcaloides (exp. Mitrafilina, ATM)	0.52
Taninos condensados (exp. Catequiza)	10.62

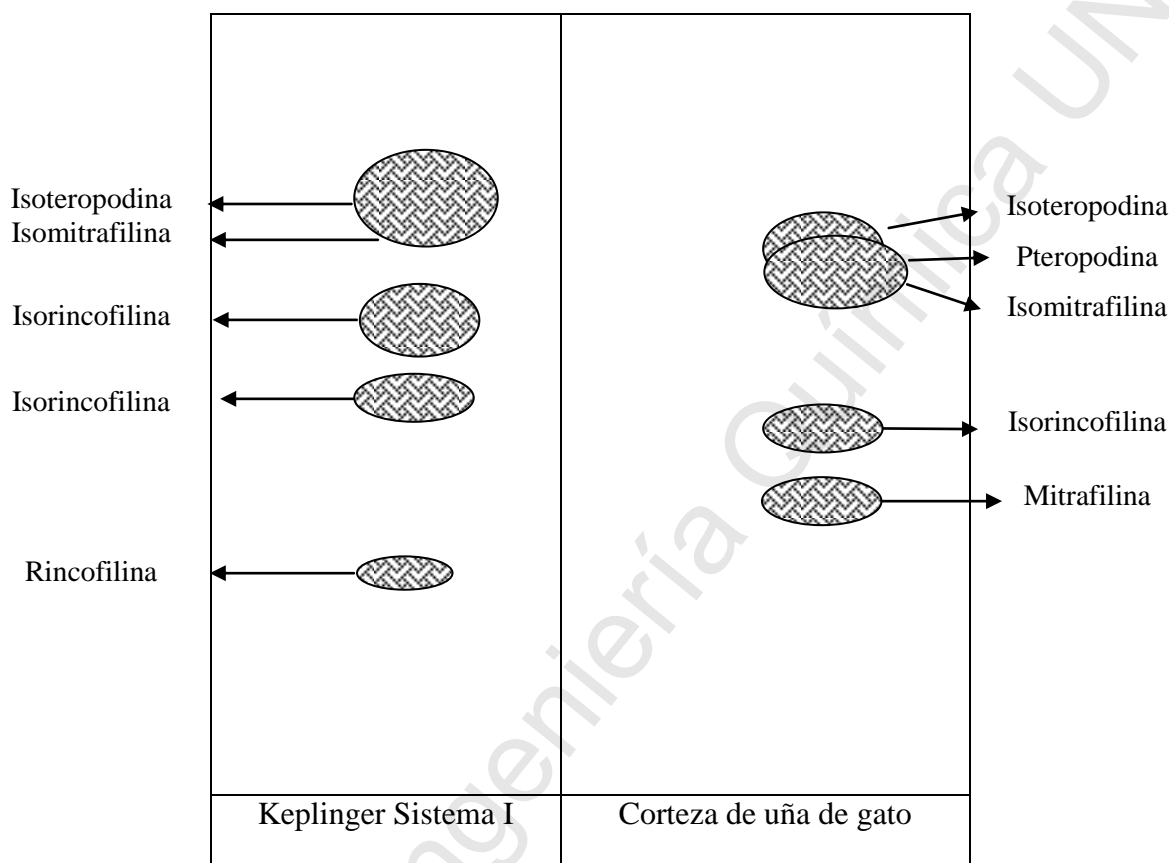
El resultado obtenido para alcaloides se encuentra dentro de los rangos de valores de % ATM de las distintas muestras de corteza de uña de gato analizadas por laboratorios de análisis químicos. Sin embargo la corteza empleada por Buitrón y Coronado (2000) para su trabajo de investigación contiene un porcentaje menor de alcaloides, esto se explica por la variabilidad del recurso, esta es la conclusión a la que llegó G. Laus (2004), luego de analizar diferentes muestras de cortezas, hojas y raíces de diferentes edades y lugares, observando que el contenido de alcaloides varía con el tiempo y lugar.

4.1.3 Perfil cromatográfico de los alcaloides presentes en la corteza.

A fin de conocer y comparar el perfil cromatográfico de la corteza, se realizó, el presente ensayo:

Figura 15:

Cromatografía de la corteza analizada



Fase móvil para el sistema I : Cloroformo – etanol (95:5)

En la Figura 15, Se observa un perfil cromatográfico similar al reportado por Keplinger (1992), las distancias recorridas son próximas, pero no iguales, esto se debe a que el cromatofolio no estaba uniformemente preparado, así como a una falta en la purificación del extracto sembrado, por lo que otras sustancias presentes pueden interferir en la corrida. Este perfil servirá para comparar los perfiles de los diferentes ensayos posteriores.

También se observa la ausencia de un alcaloide (rincofilina) y la presencia de su isómero (isorincofilina) esto pudo ser consecuencia de la edad de la planta, ya que de acuerdo a los estudios de Laus (2004),

los alcaloides sufren cambios en el tiempo, encontrándose cambios (transformaciones) en la presencia de estos en las diferentes estaciones del año.

4.2 RESULTADO DE LAS PRUEBAS EXPERIMENTALES.

Para realizar las pruebas preliminares se maceraron las muestras por 6h a temperatura ambiente (20°C) con alcohol de 96°GL

4.2.1.1 Efecto del tamaño de partícula.

Condiciones del ensayo:

Relación materia prima / solvente	:	1/5
Solvente	:	Alcohol de 96°GL
Temperatura de maceración	:	20°C
Tiempo de maceración	:	6 horas

De los resultados se observa, en el cuadro 7, que la mayor cantidad de extracto seco se obtiene macerando con el tamaño de partícula P2 (0.5 mm) de diámetro, esto coincide con lo mencionado por Fellows (2006), quien menciona que la reducción de tamaño aumenta la relación superficie/volumen, con lo que se incrementa la velocidad de extracción de compuestos solubles. El tamaño de partícula P1 (0.25mm), también obtuvo una alta cantidad de extracto seco, pero el tamaño muy reducido dificultó la filtración por lo que el volumen final fue menor al 75% del volumen inicial de solvente. Esto redujo el rendimiento del extracto seco expresado en corteza.

Cuadro No 7: Efecto del tamaño de partícula en la extracción.

Tamaño de Partícula	Extracto seco (g)
P1 (0.25 mm)	7.16
P2 (0.5 mm)	7.93
P3 (1 mm)	2.86
P4 (2 mm)	1.68

Buitrón y Coronado (2000) en sus ensayos para optimizar el proceso de extracción de la uña de gato, ensayaron diferentes tamaños de corteza desde un chipeado (tiras de 2 cm) hasta tamaños de 1cm y 0.5cm, concluyendo que el tamaño más pequeño es el que permite extraer mayor cantidad de sólidos totales empleando alcohol como solvente de maceración. Aunque el tamaño de corteza de este ensayo no es similar al encontrado en la presente investigación, coincide con nuestra experiencia, al encontrar que cuanto más pequeño (0.5cm) es el tamaño de corteza, se favorece la extracción de sólidos y alcaloides empleando alcohol como solvente.

4.2.2 Efecto del tipo de solvente

Condiciones del ensayo

Tamaño de partícula : 0.5 mm

Relación materia prima / solvente : 1/5

Temperatura de maceración : 20°C

Tiempo de maceración : 6 horas

Para la instalación del solvente se tuvo en consideración el alcohol y el agua por su naturaleza polar, ya que muchos de los compuestos (principios activos) identificados en la uña de gato presentan estructuras afines con estos solventes.

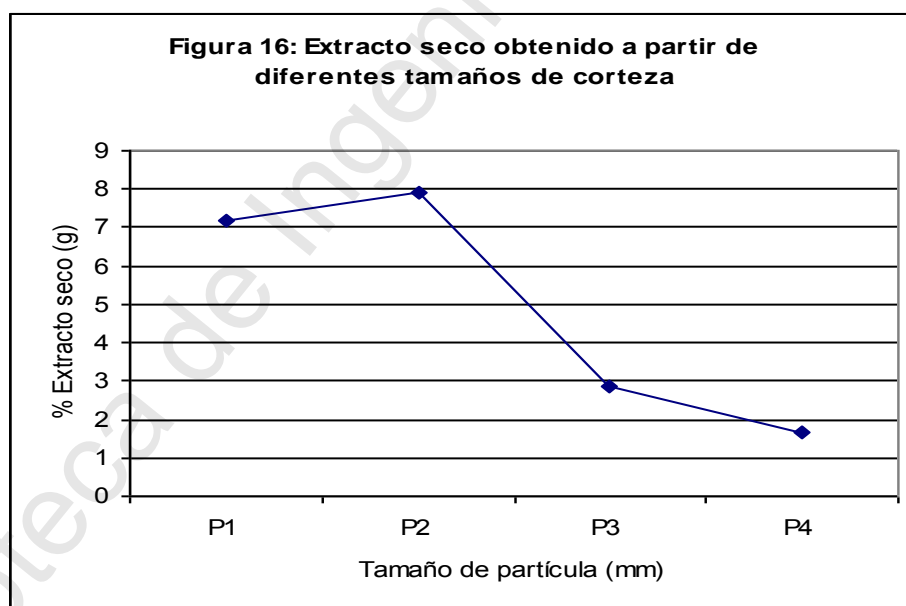
También se puede emplear otros solventes, pudiendo ser de naturaleza orgánica como el cloroformo o el éter, ya que estos también poseen estructuras más afines con los principios activos (objetivo de la extracción). Sin embargo estos solventes no son para el consumo humano, siendo el etanol el solvente ideal para la extracción.

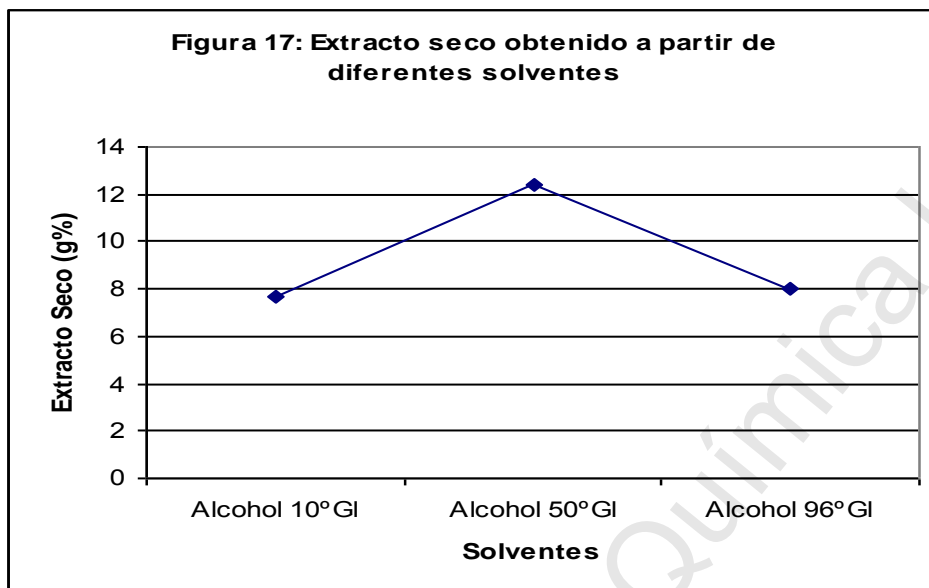
El mejor solvente encontrado para este ensayo fue el alcohol de 50°GL, ver cuadro 8, esto coincide con el trabajo de Buitrón y Coronado (2000), estas autoras prepararon extractos de diferentes

grados alcohólicos, cuantificando en ellos la cantidad de alcaloides presentes, encontrando que el alcohol de 50° extrae mayor cantidad de alcaloides que cualquier otra concentración de alcohol de 50°GL extrae mayor cantidad de alcaloides que cualquier otra concentración de alcohol, así como un alta cantidad de extracto seco. Esto también se observó en el presente trabajo.

Cuadro No 8: Efecto del tipo de solvente en el extracto

Tipo de Solvente	Extracto Seco (g)
Alcohol 10°GL	7.661
Alcohol 50°GL	12.376
Alcohol 96°GL	8.043





4.2.3 Efecto de la relación materia prima / solvente (P/V)

Condiciones del ensayo

Tamaño de partícula : 0.5mm

Solvente : Alcohol de 50 Gl

Temperatura de maceración : 20°C

Tiempo de maceración : 6 horas

La mejor relación encontrada materia prima / solvente fue 1:12, con esta relación se obtiene mayor contenido de extracto seco, esto no coincide con el trabajo realizado por Buitrón y Coronado (2000), donde la relación seleccionada fue 1/8, esto probablemente se debió a que en el trabajo mencionado se empleó para la selección de este parámetro, un tamaño de corteza de 2 cm, reduciendo así el área de contacto entre el solvente y la materia prima, por lo que un volumen menor es suficiente para extraer los principios activos disponibles.

Cuadro No 9: Efecto Relación MP/Solvente en el Extracto.

MP/Solv. (P/V)	Extracto seco (g)
1:8	3.64
1:10	5.94
1:12	12.22
1:15	11.9

Para elegir la mejor relación materia prima / solvente, también se tuvo en cuenta el mayor número de manchas en el perfil cromatográfico de la Figura 15.

4.2.4 Efecto de la temperatura

Condiciones del ensayo

Tamaño de partícula : 0.5mm

Solvente : Alcohol de 50°GL

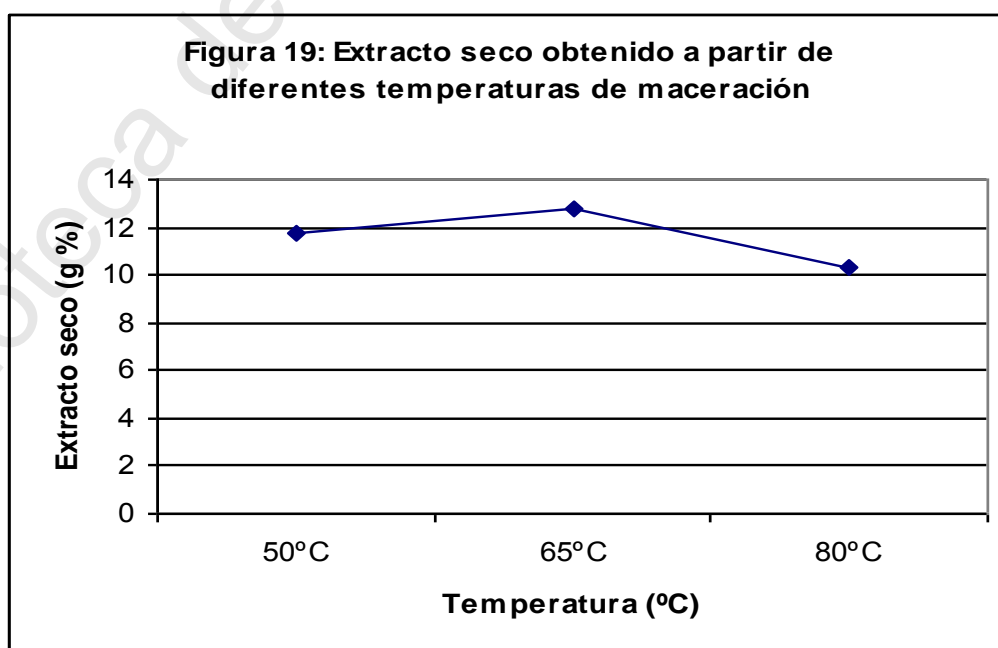
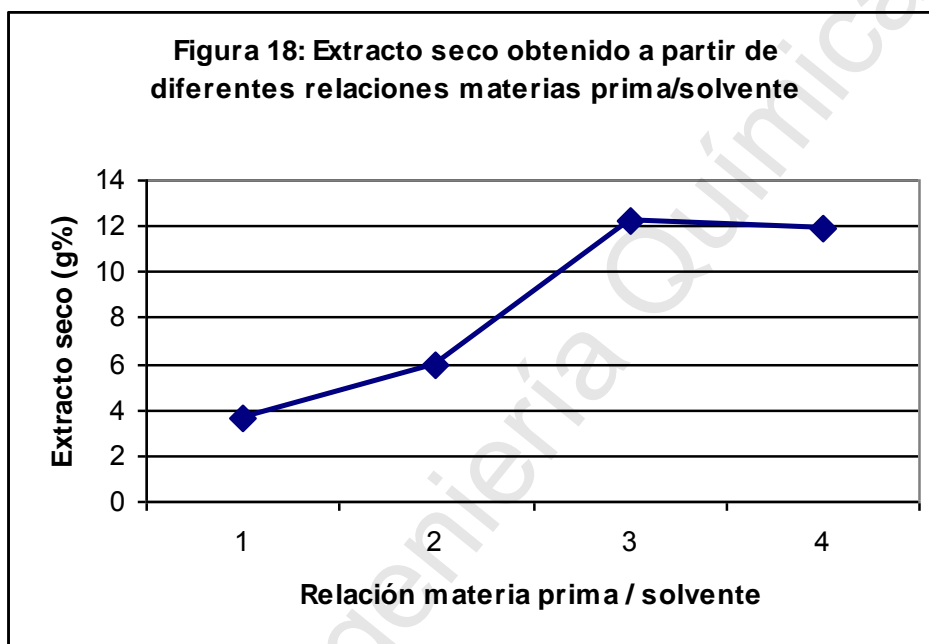
Tiempo de maceración : 6 horas

Relación mp / solvente : 1/12

De los resultados se observa, en el cuadro 10, que la mayor cantidad de extracto seco (12.81g/100g de corteza) se obtiene macerando a la temperatura de 65°C. Este valor se halla en el rango de temperaturas (60 – 70°C) que Buitrón y Coronado encontraron en sus ensayos preliminares de extracción propuesto. Estos autores obtuvieron 10.378g de sólidos totales/100g de corteza ensayando sus parámetros mientras el presente trabajo obtuvo 12.81g de sólidos/100g de corteza, esta variación se pudo deber a que Buitrón y Coronado (2000) emplearon corteza en virutas de 2cm, mientras el presente trabajo empleó partículas de 0.5mm de diámetro, esto facilita la salida de un mayor porcentaje de sólidos.

Cuadro No 10: Efecto Temperatura de Maceración en el Extracto.

Temperatura	Extracto seco (g)
50°C	11.79
65°C	12.81
80°C	10.315



4.2.5 Efecto del tiempo

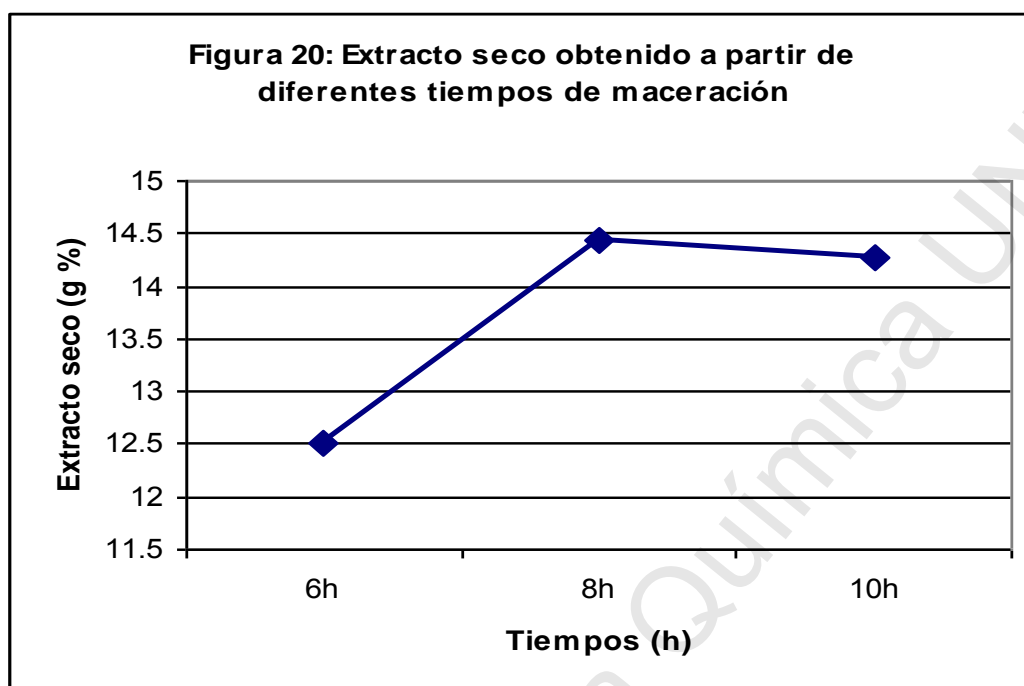
Condiciones del ensayo

Tamaño de partícula	:	0.5mm
Solvente	:	Alcohol de 50°GL
Temperatura de maceración	:	65°C
Relación mp / solvente	:	1/12

El tiempo de maceración encontrado en el presente ensayo, con el que se obtiene la mayor cantidad de extracto seco es de 8 horas, obteniendo 1.41g de sólidos totales por 100ml, sin embargo el trabajo de Buitrón y Coronado (2000) obtiene 1.79g de sólidos totales por 100ml de extracto empleando 20 minutos de calentamiento directo, con agitación a 75 – 80°C, la diferencia en el extracto seco (sólidos totales) se puede deber al empleo de alcohol de 96°GL (nosotros empleamos 50°GL) y al tipo de calentamiento, lo que permite que al final del proceso se tengan un promedio de sólidos totales elevado en corto tiempo. Ver el siguiente cuadro.

Cuadro No 11: Efecto del tiempo de Maceración en el Extracto.

Tiempo	Extracto seco (g)
6h	12.52
8h	14.436
10h	14.28



4.2.6 Estudio de la torta residual

Se realizaron cuantificaciones de taninos condensados y alcaloides a la torta resultante de la primera maceración, a fin de conocer la cantidad de principios activos que no se extrajeron con el ensayo, encontrándose cantidades mínimas de ambos compuestos.

Efecto del tiempo

Condiciones del ensayo

Tamaño de partícula	: 0.5mm
Solvente	: Alcohol de 50°GL
Temperatura de maceración	: 65°C
Tiempo de maceración	: 8 horas
Relación mp / solvente	: 1/12

Cuadro No 12: Cuadro comparativo de los principios activos en la torta de extracción y en la corteza de uña de gato

Principio activo	gr/100gr de torta	gr/100gr de corteza
Alcaloides (expo. mitrafilina, ATM)	0.18	0.52
Taninos condensados (exp. catequina)	4.3	10.6

No se reporta estudios a tortas de extracción pero se observa en el cuadro anterior que el solvente elegido extrae un buen porcentaje de principios activos.

4.2.7 Sólidos totales y alcaloides resultantes de la extracción

A continuación se comparan los resultados obtenidos por el trabajo de Buitrón y Coronado, con los resultados obtenidos por el presente trabajo.

Se observan en los siguientes cuadros la cantidad de alcaloides y sólidos totales por 100ml de extracto fluido (no concentrado) y por 100 gr de muestra.

Rendimiento en extracto seco (sólidos totales) y alcaloides el trabajo de Buitrón y Coronado (2000):

Sólidos expresados en función del extracto = 1.799gr/100ml

Alcaloides expresados en función del extracto = 0.03653 gr/100ml

Sólidos expresados en función de la corteza = 11.573 gr/100gr

Alcaloides expresados en función de la corteza = 0.22284gr/100gr

El presente trabajo obtuvo:

Sólidos expresados en función de 100ml de extracto = 1.41 gr/100ml

Alcaloides(ATM) expresados en función del extracto = 0.030gr/100ml

Sólidos expresados en función de corteza = 14.13gr/100gr

Alcaloides expresados en función de corteza = 0.32gr/100gr

De los resultados expuestos se puede observar que el extracto fluido encontrado en el presente trabajo tiene menor cantidad de sólidos totales por ml esto se debe a que la relación materia prima solvente empleada en este trabajo es mayor (1/12) a la utilizada por Buitrón y Coronado (2000). Esto explica el mayor rendimiento en el presente trabajo.

También se observa que el extracto obtenido con el presente trabajo, contiene mayor cantidad de alcaloides, esto tiene dos causas, la primera es que la corteza empleada por Buitrón y Coronado contiene menor cantidad de alcaloides, en comparación con la corteza empleada para el extracto preparado en este trabajo. La otra causa es que el tamaño de corteza empleada por Buitrón y Coronado fueron mayores a los empleados en el presente trabajo, limitando así la extracción de estos principios.

4.3 CONCENTRACIÓN

Para tener una referencia de las características iniciales del extracto fluido de comparación con el extracto concentrado final.

Antes de iniciar la concentración se realizaron a este los siguientes análisis:

Caracterización del extracto fluido:

Densidad	: 0.938gr/ml
Extracto seco respecto a la corteza	: 14.43gr/100gr de corteza
Extracto seco respecto al extracto	:1.41 gr/100ml de extracto
Alcaloides totales expresados en mitrafilina	:0.3076 mgr/ml
Taninos condensados expresados en catequina	:6.322 mgr/ml
Grados brix	:15.5°

Con estos resultados iniciales se procedió a la concentración del extracto. Para esto se empleó un rotavapor con vacío a fin de emplear temperaturas bajas. Se prefirió dejar el extracto en forma líquida y no sólida ya que estudios efectuados anteriormente por Gómez (2004) concluyeron que los

extractos líquidos son más activos que los extractos secos (atomizados, liofilizados, secados a presión y temperatura reducida).

Durante la concentración se midieron los grados brix para conocer su relación con la presencia de precipitados, además se tomó 0.5ml del extracto para conocer la relación entre la concentración y el extracto seco. Se midieron los grados brix a diferentes tiempos, mostrándose en el cuadro 13 los resultados.

Cuadro No 13 : Parámetros de Concentración

Temperatura : 60°C

Presión de vacío: 4.5 cmHg

Tiempo	°Brix	Volumen	Extracto seco
0	15.5	1000	14 mg/ml
5	14	960	14.5 mg/ml
10	13	800	17 mg/ml
13	10	700	20 mg/ml
15 *	8	640	21.88 mg/ml

* Tiempo en el que se observa precipitados

Se observa del cuadro 13 que a mayor tiempo de concentración los sólidos solubles se reducen, lo que es inverso en otros tipos de preparados, esto se debe a que un porcentaje de los sólidos presentes en la corteza de uña de gato son más solubles en alcohol que en agua y al concentrar el extracto lo primero que se elimina es el alcohol, incrementándose así el contenido de agua en el extracto por que los sólidos solubles en el alcohol precipitan, disminuyendo así los grados brix.

En el mismo cuadro se puede observar que el volumen del extracto fluido se reduce en un 40% aproximadamente, esto nos da una idea de cuanto de solvente se elimina en la concentración y cuanto de extracto concentrado se obtendrá.

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO FINAL

Una vez concentrado el extracto se procedió a caracterizarlo, para compararlo con el extracto fluido, los resultados fueron los siguientes:

Densidad	: 0.982 gr/ml
Extracto Seco respecto a la corteza	: 16.81 gr/100gr de corteza macerada
Extracto Seco respecto al extracto concentrado	: 2gr/100ml de extracto
Alcaloides totales expresados como mitrafilina	: 0.48mg de alcaloides/ml de extracto
Taninos condensados expresados como catequina	: 12.6 mg/ml
Grados brix	: 10°

Se observa que la densidad del extracto es ligeramente mayor (4%) al extracto fluido inicial. Así también este extracto concentrado contiene mayor cantidad de alcaloides por ml, por lo que se reducen los volúmenes a emplear.

Datos publicados por Buitrón y Coronado (2000) para un extracto acuoso de uña de gato, reportaron valores de alcaloides en corteza *Uncaria tomentosa* (0.222 ATM), pero no reportaron valores de taninos condensados por lo que no se tiene una referencia de comparación.

Además, la obtención de un extracto líquido permite una fácil aplicación en la elaboración de otros productos diversos. En este trabajo en su etapa final se desarrollaron diversas formas aplicativas entre ellas se elaboraron gomas con sabores cítricos, a fin de conocer la aceptación de un producto derivado del extracto de uña de gato, comprobándose que durante la preparación de las gomas, la naturaleza líquida del extracto facilitó el mezclado, obteniéndose un producto homogéneo y de gran aceptación.

4.5 BALANCE DE MATERIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Para conocer la relación extracto final/materia prima (rendimiento), se preparó el extracto hidroalcohólico de uña de gato empleando las variables de extracción encontradas. Para esto se toman los pesos y volúmenes que se detallan en la Figura 21.

Para este balance se empleó 2kg de corteza de la que se separaron las cortezas contaminadas por hongos. Para el lavado de la corteza se empleó hipoclorito de sodio al 0.1%, tal como hace el IMET para sus ensayos in Vitro.

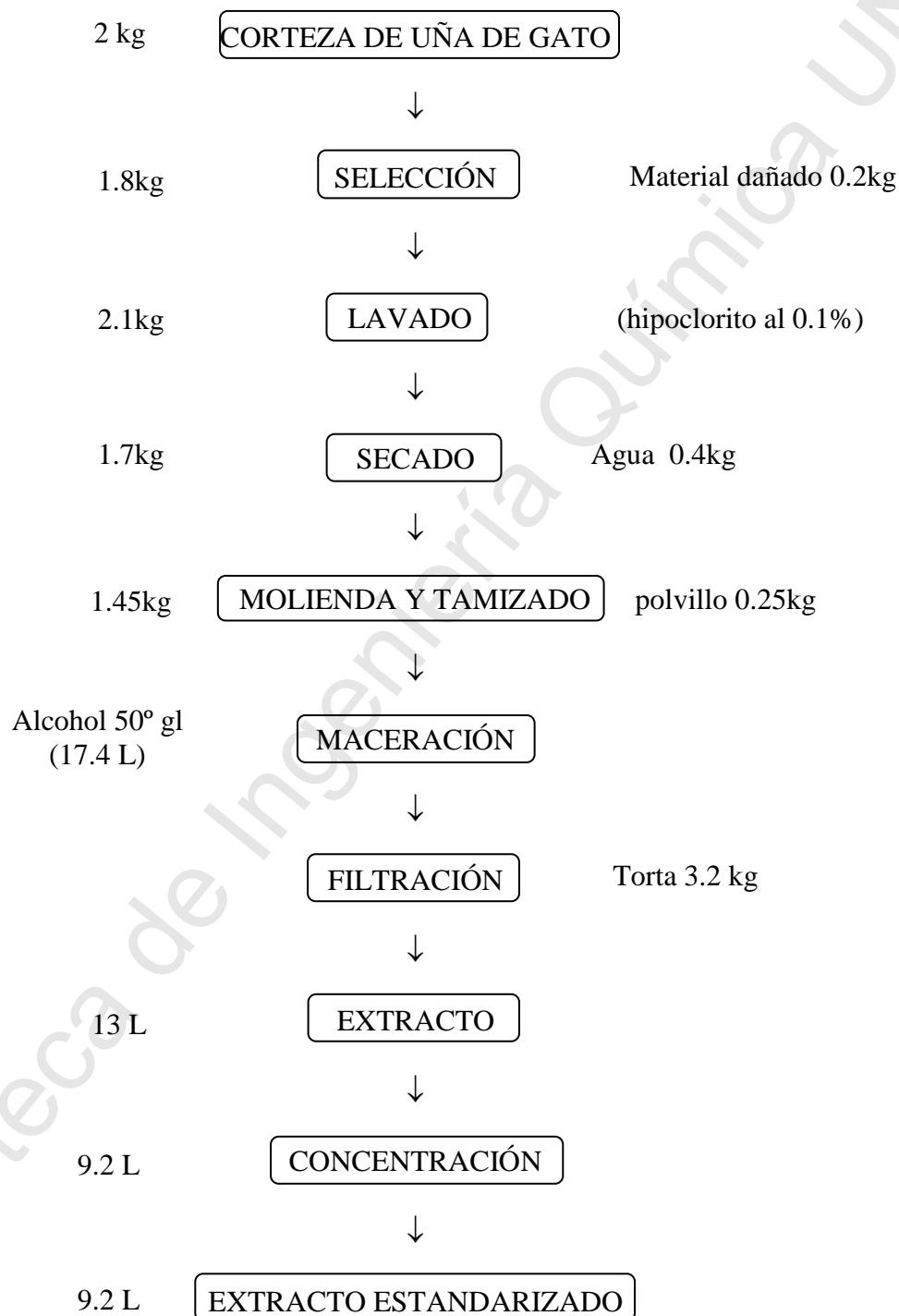
La corteza seca (1.7 kg) se trozó con la ayuda de una hacha, hasta obtener las dimensiones apropiadas para el trabajo del molino.

La molienda se realizó en un molino de cuchillas donde las cortezas ingresaron en tamaños de 2cm de largo por 1cm de ancho aproximadamente. Durante este trozado y molienda se observó la salida continua de un polvo fino, siendo esta la causa probable de la baja de rendimiento obtenido (85.29%). Esto no sucedió en el trabajo de Buitrón y Coronado (2000), pues su molienda fue más grosera (2cm) y su rendimiento alcanzó 93.897%.

Se observa que al final del proceso se obtiene 9.21 L de extracto estandarizado a partir de 2kg de corteza, esta relación nos permite estimar la cantidad de extracto que se puede obtener a partir de una cantidad de corteza.

Figura 21:

Balance de materia para la obtención de un extracto hidroalcohólico de uña de gato
por maceración



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Aunque los grados brix son medidas prácticas para controlar la concentración, las lecturas son muy variables, por lo que el extracto seco es el mejor indicador del avance de la concentración.
- Al reducir el volumen en la concentración del extracto hidroalcohólico existe relación directa entre el extracto seco y el tiempo de concentración.
- Las proporciones de alcaloides y taninos condensados encontrados en la corteza de uña de gato estudiada son variables, siendo mayor la cantidad de taninos condensados presentes.
- Es importante conocer la cantidad de principios activos presentes en la materia prima, antes de someterla a un proceso de extracción, debido a la gran variabilidad en el contenido de los metabolitos de una corteza a otra.
- Las variables encontradas para mejorar una extracción por maceración son: tamaño de partícula: 0.5mm, relación materia prima/solvente: 1/12, solvente empleado: alcohol de 50°GL, temperatura: 65°C y tiempo de maceración: 8 horas.
- La cantidad de alcaloides extraída durante el proceso de extracción por maceración fue 62%, y la cantidad de taninos condensados 59%.
- De los resultados encontrados concluimos que a menor tamaño de corteza, la extracción de sólidos y principios activos (alcaloides y taninos condensados), es mayor; pero también, que un tamaño muy pequeño dificulta la filtración del extracto.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- A fin de completar el proceso de estandarización, se recomienda la evaluación del tiempo de vida para los extractos que se preparen.
- Ensayar otros métodos de extracción como lixiviación, y cuantificar sus principios activos, a fin de evaluar la eficiencia de otro método.
- Buscar aplicaciones diversas al extracto estandarizado en bebidas y golosinas en general.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. (2006). Gobierno prohibió la Exportación de Uña de Gato – Perú
Búsqueda en Internet. Dirección electrónica:
<http://www.impactoeconomico.com/1999/Marzo/31/impacto>.
- A.O.A.C. (2002). Official methods of análisis. Ed. AOAC. Official methods of analysis. Ed. AOAC. Virginia. USA.
- BRENNAN. (2006). LAS Operaciones De la Ingeniería de los Alimentos. Editorial Acribia. Segunda Edición. Zaragoza – España.
- Zavala, C.C.A. & P.P.A. Zevallos. (1996). Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Uncaria* en el Perú. 1ra. edición. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima-Perú.
- Buitrón, G. Coronado, N. (2000). Estudio de Prefactibilidad para la Instalación de un Planta Liofilizadora del Extracto de *Uncaria tormentosa*. Facultad de Ingeniería Química. Tesis de la Universidad de Ingeniería. Lima – Perú.
- Cabieses, F. (2005). La uña de gato y su entorno. Vía lactea editores. Lima – Perú.
- Carrasco, L. (2006). Diagnóstico Preliminar de la Extracción y Producción de Corteza de “Uña de Gato”. Curso Teórico – Práctico de Identificación, Producción, Propagación y manejo de “Uña de gato”. Lima.
- Cook, N.C y Samman, S. (2006). Flavonoides – Química, Metabolismo, Efectos Cardioprotectores y Fuentes Dietarias. Rev. Nutritional biochemistry, abril, pp, 66 – 76.
- Congreso Internacional FITO (2008). Publicación del congreso, realizado del 27 – 30 setiembre. Lima – Perú.
- Cueva, P. (2006). Alcaloides en Uncarias: Cualificación y Cuantificación Separata de Fotoquímica. Departamento de Química de la UNALM. Lima.

- Del Pozo, A. (2005). Enciclopedia Farmacéutica. Tomo II. Editorial Científico – Médica. Barcelona - España.
- Del Pino, M. (2007). Interacción de Procianidas con la *faciolina nativa* y Desnaturalizada. Efecto en la digestibilidad (in Vitro). Tesis de Doctorado. Universidad de Sao Paulo. Brasil.
- Domínguez, G. (2008). Uña de Gato y Producción Sostenible. Editado por Publiflor. Primera edición. Lima – Perú.
- El Peruano (2008). Normas legales. Decreto Supremo N° 009 – 98 – AG. 29 de marzo.
- Gómez, E; Rengifo, D. (2006). Estudio Comparativo del efecto Antiinflamatorio de Varias Muestras de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Tesis de UNMSM.
- IMET. (2004). *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Publicación del Instituto de Seguridad Social. Lima – Perú.
- Keplinger. (2004). Krallendorn – Medikamente. Fachinformation für Ärzte und Apotheker. Immodal Pharmaka. Alemania.
- Laus, G; Brossner, D; Keplinger, K. (2007). Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. Phitochemistry.
- Lees, R. (2000). Análisis de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Segunda Edición.
- Lock, O. (2005). La Uña de Gato. Editorial de la Universidad Católica del Perú Primera edición. Lima – Perú.
- Ramírez, E. (2003) Separata del Curso Introducción a la Etnobotánica, Facultad de Ciencias y Filosofía; Universidad Cayetano Heredia. Lima.