UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo María

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Departamento académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de Alimentos

"OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa* WILLD D.C.) Y SU APLICACIÓN EN UNA BEBIDA CARBONATADA"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

JHONY WILLIAN VARGAS SOLÓRZANO

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
UNAS TINGO MARIA

TINGO MARÍA-PERÚ

1999

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA - Tingo María
CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN
16/03/00
4716

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
TINGO MARÍA - PERÚ
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el sábado 24 de abril de 1999, a horas 1:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **JHONY WILLIAN VARGAS SOLORZANO**, con el título:

"OBTENCION DE EXTRACTO DE UÑA DE GATO (Uncaria tomentosa Willd D.C.) Y SU APLICACIÓN EN UNA BEBIDA CARBONATADA"

Después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las preguntas *formuladas*, se declara aprobado con el Calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia el Bachiller **JHONY WILLIAN VARGAS SOLORZANO**, queda apto para recibir el Título de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22 de la Ley Orgánica de la Universidad Peruana 23733; con los artículos 43° y 45° del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva; con los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la UNAS.

Tingo María, 29 de abril de 1999.

BLGA. MARGARITA ALCEDO ROMERO
PRESIDENTE

ING. FRANCESCA MAMANI SANCA
VOCAL

ING. PEDRO PELAEZ SANCHEZ
PATROCINADOR

A mis queridos Padres: CIRO e ISABEL, que siempre me brindan dilección y apremio

Con la estima de siempre, a mis Hermanos: Roberto, Isabel, Kelly y C. Karen

A mis familiares y amigos verdaderos, por su aprecio y confianza para conmigo

Agradecimiento

Al Ing° Pedro Pablo Peláez Sánchez, asesor del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Manuel Sandoval Chacon, por las sugerencias hechas al estudio, sus consejos y su constante estímulo hacia mi persona, los cuales permitieron culminar el presente estudio.

Al Ing° Pedro Vejarano Jara, gestor de la idea inicial del presente estudio, por sus enseñanzas en mi formación profesional y consejos.

Al Ing° Lauriano Zavaleta De la Cruz, por sus enseñanzas durante mi formación profesional, amistad y consejos.

Al Ing° Warren Ríos García, por su colaboración en la identificación de la planta material.

Al Ing° Juan Lao, por el apoyo brindado en la determinación de componentes minerales y las facilidades que prestó en la ejecución de una parte del trabajo.

Al personal técnico de los laboratorios de química, análisis de alimentos, y espectrofotometría, por disponer todas las facilidades durante la ejecución del trabajo.

A todas mis amistades que aportaron de algún modo, en forma individual o colectiva, la ejecución de este trabajo; asimismo, a aquellos que me ayudaron a sondear el conocimiento y la lógica de esta vida tal y como es.

Indice general

RESUMEN 1

I. INTRODUCCION 3

II. REVISION BIBLIOGRAFICA 4

A. Aspectos generales de la uña de gato 4

1. Clasificación taxonómica 4

2. Descripción botánica 4

3. Diferencias botánicas entre *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. y *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel 5

4. Uso en etnomedicina 8

5. Aplicaciones clínicas 8

6. Los metabolitos secundarios de *Uncaria tomentosa* 10

7. Compuestos no alcaloídicos 13

8. Propiedades farmacológicas de extractos y compuestos no alcaloídicos 13

B. Los alcaloides de *Uncaria tomentosa* 17

1. Definición de alcaloide 18

2. Estructura química 18

3. Propiedades físico-químicas 20

4. Propiedades farmacológicas 22

5. Extracción de alcaloides 24

6. Cuantificación de alcaloides 26

C. Factores que influyen en el contenido de alcaloides de *Uncaria tomentosa*. 28

1. Variedad. 28

2. Estación. 29

3. Edad. 31

4. Distribución en la planta. 33

5. Método de extracción. 34

D. Extracción sólido-líquido. 35

1. Características industriales en la extracción sólido-líquido. 35

2. Factores que influyen en la eficacia de la extracción. 37

3. Métodos de extracción industrial. 39

4. Tratamientos complementarios. 40

E. Bebidas carbonatadas. 43

1. Definición. 43

2. Ingredientes. 43

3. Tratamiento del agua. 44

4. Preparación de jarabes. 44

III. MATERIALES Y METODOS. 46

A. Lugar de ejecución. 46

B. Materia prima e insumos. 46

C. Equipos, materiales y reactivos. 47

1. Equipos de laboratorio y proceso. 47

2. Materiales de laboratorio. 48

3. Reactivos y soluciones. 48

D. Métodos de análisis. 50

1. En la materia prima. 50

2. En el extracto obtenido. 51

3. En la bebida carbonatada. 51

E. Metodología experimental. 53

1. Estudio de la materia prima. 53

a. Muestreo e identificación. 53

b. Preparación de corteza pulverizada. 53

c. Caracterización físico- química. 55

2. Estudio de la extracción sólido-líquido de alcaloides. 55

a. Espectrofotometría en el análisis de extractos de uña de gato. 56

b. Relación sólido-líquido en la extracción a reflujo. 58

c. Tiempo de extracción. 58

d. Rendimiento de extracción en alcaloides totales. 58

3. Estudio del producto final. 62

a. Ensayos preliminares para obtener el extracto. 62

b. Caracterización físico-química. 64

c. Evaluación en almacenamiento. 64

4. Aplicación del extracto en la formulación de una bebida carbonatada. 64

a. Preparación de bebida carbonatada. 65

b. Evaluación sensorial. 67

c. Caracterización físico-química..... 67

F. Diseño experimental..... 68

G. Análisis estadístico..... 70

IV. RESULTADOS Y DISCUSION..... 71

A. De la materia prima..... 71

B. De la extracción sólido-líquido de alcaloides..... 78

1. Espectrofotometría en el análisis de extractos de uña de gato..... 78

2. Relación sólido-líquido en la extracción a reflujo..... 80

3. Tiempo de extracción para el método reflujo..... 84

4. Tiempo de extracción para el método continuo..... 86

5. Rendimiento de extracción en alcaloides totales..... 88

C. Del producto final..... 93

1. Ensayos preliminares..... 93

2. Obtención del extracto..... 99

3. Caracterización físico-química..... 99

4. Evaluación en almacenamiento..... 101

D. De la aplicación del extracto en la formulación de una bebida carbonatada..... 105

1. Evaluación sensorial..... 105

2. Caracterización físico-química..... 107

E. Flujo de procesamiento definitivo para obtener extracto de uña de gato y bebida carbonatada..... 110

F. Balance de materia..... 113

V. CONCLUSIONES 116

VI. RECOMENDACIONES 118

VII. BIBLIOGRAFIA 119

VIII. ANEXOS 125

Anexo A 126

Anexo B 127

Anexo C 128

Anexo D 129

Anexo E 130

Anexo F 131

Anexo G 132

Anexo H 134

Anexo I 135

RESUMEN

El presente estudio se realizó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva-Tingo María, Perú, con el apoyo de los laboratorios de la facultad de Industrias Alimentarias y la facultad de Zootécnia. El objetivo fue evaluar la extracción sólido-líquido de alcaloides de la corteza del tallo de uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C y su posterior aplicación como extracto concentrado en la formulación de una bebida carbonatada de cola.

La extracción se realizó con cuatro solventes: en medio alcalino con cloroformo y cloroformo-etanol(9:1) y en medio ácido con soluciones acuosa y etanólica (etanol 96°GL) de ácido acético al 10%, utilizando tres métodos (percolación fraccionada o relixiviación, decocción o reflujo y maceración-Soxhlet o continuo). Se evaluó el rendimiento de extracción en alcaloides totales, los que fueron analizados en un D.C.A. con arreglo factorial 3*4 con 2 repeticiones y la posterior prueba de Tukey con $p<0.05$. Previo a esta etapa se evaluó espectrofotométricamente el efecto de la relación sólido-líquido en el método reflujo y el efecto del tiempo de extracción para los métodos reflujo y maceración-Soxhlet.

El extracto obtenido se utilizó en tres concentraciones (0.05, 0.10 y 0.15%) para elaborar tres tipos de bebida carbonatada (1=con colorante, saborizante y jarabes simples de 54, 56 y 58°Brix);(2=con colorante y jarabe simple de 54°Brix);(3=con jarabe simple de 54°Brix). Las bebidas se evaluaron sensorialmente (prueba de aceptabilidad) los que fueron analizados en un D.C.A. con 12 repeticiones (jueces) mediante la estadística no paramétrica de Kruskall-Wallis y la posterior prueba de Dunn.

Los rendimientos en alcaloides totales fueron favorables para la extracción en medio ácido: etanol/maceración-Soxhlet (86.48%), etanol/reflujo (69.83%) y agua/reflujo (56.38%). Los parámetros para elaborar extracto de uña de gato son: preparación de corteza pulverizada (9.6%

humedad, 315 μm de tamaño), extracción I (por reflujo, 1 kg de corteza por 10 L de solución etanólica de ácido tartárico al 10%, a ebullición (80°C) por 40 min), sedimentación (por gravedad), extracción II (por percolación, 1 kg de corteza por 2 L de solución), clarificación (11.83% de extracto seco soluble) y concentración (62.72% de extracto seco soluble). El rendimiento por proceso fue de 12.25% respecto a los tallos frescos y 135.81% respecto a la corteza pulverizada.

Las bebidas preparadas con 0.05% de concentración de extracto de uña de gato fueron las favorecidas en la evaluación sensorial y se requiere como mínimo un dulzor de 56°Brix en el jarabe simple para que los jueces acepten el sabor de uña de gato.

I. INTRODUCCION

La 'uña de gato' *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. (*Rubiaceae*) es una liana enorme y fuerte que crece en bosques de lluvia y niebla de la amazonía peruana. Ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional por la gente nativa durante cientos, quizás miles de años en el tratamiento de un amplio grado de problemas de la salud asociados con el sistema inmune y el sistema digestivo (inflamaciones crónicas como artritis, gastritis e inflamaciones del intestino), pero todavía no hay evidencias substanciales a cerca de su modo de acción.

Klaus Keplinger menciona que es improbable que una sola sustancia o un grupo reducido de sustancias puedan ser las responsables, pero que sin embargo algunas de dichas actividades podrían ser debido a los alcaloides oxindol pentacíclicos. Esta demostrado que estos alcaloides ejercen su efecto sobre el sistema inmunológico celular.

Por esta razón, dicha planta silvestre ha incrementado su demanda consumiéndose en forma de té (por cocción de la corteza de la raíz o del tallo), y elaborándose cápsulas (por micropulverización de la corteza o secado por aspersión del extracto acuoso).

En tal sentido, se plantea determinar los parámetros tecnológicos óptimos para la extracción sólido-líquido de alcaloides de la corteza del tallo de uña de gato, ejecutar la caracterización físico-química del extracto obtenido, evaluarlo en almacenamiento y, con el propósito de hacerla más accesible al consumo, aplicarlo como aditivo de enriquecimiento en la formulación de una bebida carbonatada de cola.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA UÑA DE GATO

1. Clasificación taxonómica

Según Enma Cerrate de Ferreyra citado por Obregon,1994 menciona que la clasificación taxonómica de esta especie corresponde a lo siguiente:

Reino	:	*Vegetal*
División XVII	:	*Angiospermas*
Clase	:	*Dicotiledóneas*
Subclase	:	*Metaclamídeas (Simpétalas)*
Orden	:	*Gentianales*
Familia	:	*Rubiaceae*
Género	:	*Uncaria*
Especie	:	*Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.

2. Descripción botánica

Es un gran arbusto, trepador, presente en bosques secundarios que sube a los arboles aledaños a su nacimiento, formando enredaderas frecuentes en el espesor de la selva. Llega a medir hasta 20 m de altura aproximadamente, posee tallos de forma cuadrangular, cerca del ápice con espinas ganchudas, macizas, leñosas, que llegan a tener 2 cm de largo por 0.4 cm a 0.6 cm de ancho proximal, dirigidas hacia abajo, no retorcidas. En las hojas el limbo es de consistencia membranosa, de forma oblonga u oblongo aovado de aproximadamente 9 a 17 cm de longitud, por 4.3 a 9.0 cm de ancho, agudo, a veces redondeado en el ápice, de color verde amarillento, opaco en el haz y verde pálido en el envés. En esta zona se

observa la presencia de finos vellos dispuestos densa y finamente en toda su extensión, siendo esta característica el origen del término "tomentosa". Las venas laterales (nervios) son en número de 8 a 10, de forma arqueada, angulares, a menudo decoloradas.

Las inflorescencias tienen 9 cm de longitud, los racimos son pequeños hasta con 5 cabezuelas, los pedúnculos tienen una longitud que oscila entre 1.0 a 3.5 cm y de 0.8 a 3.0 mm de diámetro, con una terminación simple en capítulo de flores en forma globular o con terminación axial, presentando 2 pares de ramas opuestas y perpendiculares al eje, definidamente espaciadas. Cada una termina en un capítulo esférico, el diámetro de cada cabezuela varía de 1.5 a 2 cm Las flores son sésiles, de color amarillento. La corola tiene forma de embudo (infundibiliforme) de aproximadamente 5 mm de longitud por 0.6 mm de diámetro, glabro en la cara adaxial, tiene 5 lóbulos reflexos redondeados. Posee 5 estambres sésiles con anteras oblongas de 1.1 a 1.5 mm de largo. El ovario tiene 2 lóculos con un septum discretamente delgado, el estilo es lineal, más o menos 4.5 a 6.0 mm de longitud. El fruto es bivalvo, angostamente oblongo aovado, mide hasta 6 mm de longitud, en ellos persiste el cáliz, su corteza es seca, esta cubierto de vellos blancos, tienen ciertas estriaciones longitudinales; las semillas son fusiformes, longitudinales, pequeñísimas, hasta 4 mm de largo, el cuerpo propiamente dicho mide cerca de 1 mm de largo (Obregon,1994).

3. Diferencias botánicas entre *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. y *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel

En Perú y otros países de habla hispana, el nombre común de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. es uña de gato, en ingles cat's claw. Es importante notar que hay otra especie de Uncaria que crece en terrenos bajos de la selva tropical peruana conocida como *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel, que también es llamada uña de gato. Esta última especie mostró tener alguna de las

mismas características de *U. tomentosa*, con excepción de que no posee el alcaloide más importante, isopteropodina, el cual la hace menos efectiva en las aplicaciones para el sistema inmune (Keplinger *et al*, 1989).

Según los estudios efectuados por la Botánica Peruana Dra. Emma Cerrate de Ferreyra en el Herbario del Museo de Historia Natural Javier Prado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, existen las siguientes diferencias entre las 2 especies peruanas del genero Uncaria, los cuales se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Diferencias botánicas de las dos especies peruanas del genero Uncaria.

Características	*Uncaria tomentosa*	*Uncaria guianensis*
Porte	Arbusto mas o menos trepador	Arbusto trepador o rastrero
Espinas adultas	Dirigidas hacia abajo, no retorcidas	Recurvadas como cuernos de carnero
Forma de limbo	Oblonga	Aovada o elíptica
Consistencia de limbo	Membranosa	Coriácea
Haz	Verde amarillento opaco	Verde oscuro brillante
Envés	Toda tomentosa o sola en los nervios	Glabro
Número de nervios	7 a 10	8 a 9
Racimos de cabezuelas	Axilares, pequeños hasta 5 capítulos	Terminales, grandes con capítulos
Diámetro de cabezuelas	1.5 a 2 cm.	2 a 3 cm.
Flores	Sésiles	Pediceladas
Corola	Glabra	Pilosa pubescente
Cápsulas	No fue observada	2 a 3 cm. (sin cortar el pedicelo)

Fuente : Obregon(1994)

4. Uso en etnomedicina

Las patologías tratadas con esta planta incluyen procesos inflamatorios de diversa índole en órganos y/o sistemas tales como artritis, gastritis, inflamaciones dérmicas y en vías genitourinarias, asma, etc.; ulcera gástrica, diabetes, enfermedades degenerativas como el cáncer (entre ellos del tracto genital femenino, broncopulmonar, gástrico) y diversas tumoraciones; procesos vírales; irregularidades del ciclo menstrual; convalecencia y debilidad general; gonorrea (esta última aplicación según la etnia Bora de Maynas, Loreto) (Obregon,1994).

En Guyana y en las riberas del río Appaporis se utiliza el cocimiento de la corteza para el tratamiento de la disentería (Shultes ; Raffauf,1990).

Obregon(1994),reporta que al cortar transversalmente el tallo fresco se desprende un líquido transparente semejante al agua fresca con un discreto sabor amargo, es utilizado por los nativos para quitar el cansancio y el hambre, y en otras comunidades nativas es usado como refresco sin otra particularidad. Los preparados generalmente se obtienen:

a. Por cocimiento, 20 a 30 g del duramen cortado en pequeños fragmentos es hervido en 1 L de agua durante 20 a 30 min.
b. Por infusión, a 10 g de hojas se agrega 200 mL de agua hirviendo, se cubre y deja reposar por 10 min.
c. Por maceración, en etanol de 70°GL al 10% o más que con frecuencia se combina con otras plantas.

5. Aplicaciones clínicas

Klaus Keplinger obtuvo éxitos al usar *U. tomentosa* en el tratamiento de herpes genital y herpes zoster. También al tratar a 7 pacientes con S.I.D.A., 5 de ellos mostraron varios

progresos de la enfermedad. Estas conclusiones fueron evidentes al mostrar una mejora en el análisis de sangre de los pacientes y una desaparición de los síntomas clínicos en el primer año de tratamiento (El comercio,1988).

"Krallendom" es una medicina constituida por principios activos de uña de gato *U. tomentosa* en combinación con AZT y esta siendo usada para impedir la multiplicación del virus HIV en la sangre, activando el sistema inmunológico y frenando el desarrollo de células cancerosas. Esta medicina fue usada exitosamente en los 6 pasados años para tratar gente infectada con el virus del S.I.D.A. Según el laboratorio Inmmodal Pharmaka Gmbh, prácticamente ninguno de los casos aun muestra síntomas de la enfermedad desarrollada. "Krallendom" también ha sido efectivo en disminuir los desagradables efectos secundarios de AZT y radiación de terapia, al tratar pacientes con cáncer (El comercio,1990).

Gerber(1988), en su experiencia personal manifestó que esta planta muestra grandes promesas en el tratamiento de artritis, luego de elaborarlo como un té y al tomar cápsulas de esta planta. Además, por su baja toxicidad, puede ser útil para aquellas personas que sufren de articulaciones dolorosas y no pueden tomar medicina convencional por los desagradables efectos secundarios.

Steinberg(1996), también tuvo una experiencia personal con uña de gato, donde menciona que hace aproximadamente 20 años, tuvo un problema crónico del tracto urinario, contrayendo inflamaciones de la uretra y otros síntomas comúnmente asociados con el aumento de la glándula de la próstata. En todo ese tiempo, visitó a muchos especialistas en alopatía y holística, también intentó numerosas medicinas convencionales, regímenes de vitaminas y minerales, remedios de combinaciones herbarias y un sinnúmero de otros productos naturales con resultados mínimos. Finalmente, experimentó con Uña de gato,

elaborándolo como un té y tomando 3 copas por día. Al tercer día, llegó a notar que los síntomas crónico urinarios empezaban a disminuir, y en la segunda semana los síntomas fueron virtualmente eliminados.

Iaccarino *et al* (1988), reportó que el extracto acuoso de la planta aplicado externamente da buenos resultados en el caso de heridas abiertas, fisuras y hemorroides.

Iaccarino *et al* (1993), también ha reportado resultados preliminares satisfactorios de la aplicación de infusiones, de pulverizaciones y de diluciones decimales de uña de gato en pacientes con enfermedades de origen autoinmune.

Ruiz *et al* (1994), hicieron ensayos en 135 perros y 53 gatos durante 4 años utilizando *U. tomentosa* como antiinflamatorio, para reducir el dolor por osteoartritis en animales geriátricos e inflamación de la piel por reacciones alérgicas; y para el tratamiento de tumores y parvovirosis, dando buenos resultados en todos los casos.

6. Los metabolitos secundarios de *Uncaria tomentosa*

Los productos naturales se dividen en 2 grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios, siendo esta clasificación sobre todo de tipo biosintética y, en menor grado, de tipo funcional. Así, los metabolitos primarios comprenden aquellas sustancias de amplia difusión en la naturaleza y se encuentran en todos los organismos vivos, siendo por lo tanto metabólicamente esenciales. Un grupo reducido de estos metabolitos primarios sirven como precursores de todas las otras sustancias que no pertenecen a esta categoría, consideradas como metabolitos secundarios y comprenden la gran mayoría de los llamados Productos Naturales.

La mayoría de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, y de

distribución más restringida en la naturaleza, limitadas a fuentes botánicas específicas, siendo en consecuencia una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene. Puede decirse que no son indispensables en las plantas que las albergan, puesto que no se ha descubierto aún una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados "artículos de lujo" en la planta. Es probable que lleguen a ser reconocidos en el futuro como actores principales de importantes funciones biológicas, ya que son biosintetizados y biodegradados (Gros,1985).

En la actualidad se sabe que *U. tomentosa* contiene 4 tipos de metabolitos secundarios: alcaloides, glicósidos, triterpenos y esteroides. En la Figura 1 se muestra el metabolismo general de los Productos Naturales.

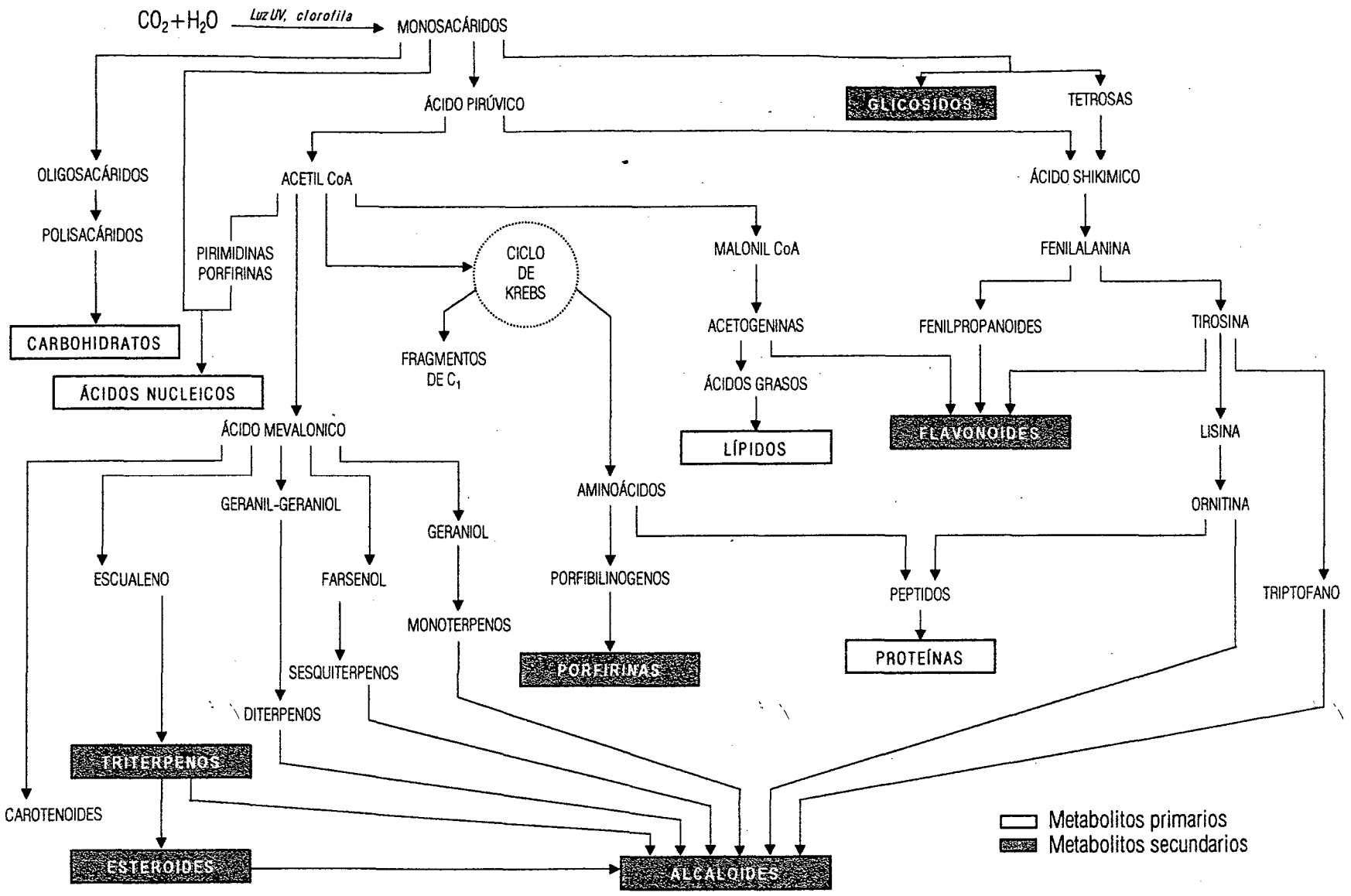


Figura 1: Metabolismo general de los Productos Naturales. Fuente : Dominguez(1973)

7. Compuestos no alcaloídicos

Cerri *et al* (1988), Aquino *et al* (1989) y Aquino *et al* (1991), aislaron e identificaron 8 glicósidos del ácido quinóvico, con modelos de glicosidación C-3, C-28 ó C-3,27. La separación y purificación de estos compuestos fue mediante cromatografía en fase líquida de alta resolución (CLAR), utilizando columnas de Sephadex LH-20 y las estructuras determinadas por mediciones de RMN ^{1}H y ^{13}C, espectroscopía de masas y análisis de azúcar. Las estructuras de estos glicósidos se detallan en el anexo A.

Aquino *et al* (1990) y Aquino *et al* (1991), aislaron e identificaron 4 nuevos triterpenos polihidroxilados, la separación fue por CLAR en fase inversa, utilizaron columnas de SiO_2. Las estructuras de estos triterpenos se detallan en el anexo B.

El ácido oleanólico y el ácido ursólico también fueron aislados por primera vez de *Uncaria tomentosa.* (Aquino *et al*, 1991).

Senatore *et al* (1989), aislaron de la fracción esteroide de esta planta, β-sitosterol en un 60%, campestrol y estigmasterol. De acuerdo a los datos espectroscópicos identifican al β-sitosterol como el esterol principal.

8. Propiedades farmacológica de extractos y compuestos no alcaloídicos

Keplinger(1982), demostró que el extracto acuoso y etanólico de *U. tomentosa* tienen actividad citostática, contraceptiva y antiinflamatoria.

Aquino *et al* (1989), realizaron pruebas de actividad antiviral *in vitro* de los glicósidos del ácido quinóvico de *U. tomentosa*, contra 2 virus RNA: vesicular stomatitis virus VSV y rhinovirus tipo IB HRBIB, encontrándose un efecto inhibitorio contra la infección de VSV, pero en concentraciones relativamente altas. Ellos precisaron que la actividad es mejor en

aquellos que tienen libre el -COOH en C-27. Los ensayos contra la infección rhinovirus tipo IB mostraron que todos estos ácidos quinóvicos y sus glicósidos eran inactivos.

De estudios preliminares realizados sobre la fracción esteroidal de *Uncaria tomentosa*, se confirmó una moderada actividad antiinflamatoria, siendo atribuido este efecto, debido a la presencia notable de β-sitosterol. (Senatore *et al*, 1989).

Aquino *et al* (1991), realizaron ensayos de actividad antiinflamatoria en extractos de éter de petróleo, cloroformo, cloroformo-metanol (9:1), metanol y agua, utilizando la prueba de edema pedal producido por carragenina. Los extractos más activos fueron: $CHCl_3$-MeOH(9:1) (50 mg/kg) y H_2O (84 mg/kg), los que produjeron respectivamente 69.2 y 49.2% de inhibición del edema en 3 h. Luego realizaron el fraccionamiento del extracto $CHCl_3$-MeOH(9:1) por CLAR, utilizando columnas de Sephadex LH-20, recogiendo fracciones del I al V, siendo las más activas I(4.2 mg/kg) y III(2.3 mg/kg) que produjeron respectivamente 46.8 y 37.4% de inhibición del edema en 3 h. Y finalmente aislaron los compuestos de las fracciones I y III, donde cada uno de ellos fue probado para la actividad antiinflamatoria resultando el más activo el glicósido 7, que causó 33% de inhibición en 3 h, en dosis de 20 mg/kg. El estudio concluyó que la fuerte actividad antiinflamatoria sería debido a la presencia de una combinación de compuestos o que es posible que algunos compuestos como el glicósido 7 tengan una actividad antiinflamatoria intrínseca actuando los otros sinérgicamente. Los autores no creen que la actividad sea debido a compuestos minoritarios no aislados o a los compuestos aislados en dosis altas.

Rizzi *et al* (1993), realizaron un estudio para determinar la actividad antimutagénica de 5 extractos de la corteza de *U. tomentosa* (como en Aquino *et al*, 1991) y 6 diferentes fracciones del extracto $CHCl_3$-MeOH (9:1) tanto en experimento *in vitro* como *in vivo*. Se

utilizó la prueba Salmonella/microsoma mamalia, con y sin activación metabólica en tipos de *S, tiphimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538). Se determinó que todos los extractos y fracciones ensayados mostraron efecto no mutagénico en diferentes clases de *S. tiphimurium* con y sin activación metabólica; sin embargo, sí mostraron efecto antimutagénico *in vivo* contra fotomutagénesis inducido por 8-metoxipsoraleno mas irradiación UVA en *S. tiphimurium* TA 102. Se atribuye este resultado a la propiedad antioxidante que tendrían los componentes de la corteza.

Sandoval *et al* (1998), descubrieron que el extracto acuoso de uña de gato actúa como inhibidor de transcripción, previniendo la activación del factor de transcripción NF-κB. Este factor esta inactivo bajo circunstancias normales, y lo mantiene inactivo la subunidad represora IκBα. Bajo estimulo con un agente proinflamatorio, esta unidad represora es retirada y el factor activo NF-κB se traslada hacia el núcleo donde se une a la región del promotor de muchos genes diferentes involucrados en inflamaciones (aproximadamente 18). La unión con el promotor conlleva a que una enzima, la polimerasa de ARN, pueda leer el código del ADN y que en consecuencia sea sintetizado un sinnúmero de copias del gen que se encuentra después del promotor. Evitando el traslado del factor NF-κB al núcleo, la uña de gato previene la activación de un sinnúmero de compuestos inflamatorios (moléculas de adhesión, enzimas, citokinas). Esto explica su notable eficacia.

Este descubrimiento se aseveró al demostrar que uña de gato es un antioxidante efectivo, previniendo la muerte (por apoptosis) de células cultivadas tratadas con el fuerte oxidante peroxinitrito. La molécula precursora de peroxinitrito, óxido nítrico, un radical libre débil, no fue afectada por uña de gato, lo que indica cierta selectividad de su acción. Luego de otros experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los autores concluyeron que la uña de gato es efectiva en

estados de inflamación crónica, y además puede evitar efectos secundarios de otros tratamientos comunes en la medicina occidental que se aplican para los mismos males. También afirman que la uña de gato podría ser una excelente terapia asociada para el tratamiento de artritis reduciendo la dosificación requerida de las terapias habituales y limitando los efectos secundarios sobre el tracto gastrointestinal.

B. LOS ALCALOIDES DE *UNCARIA TOMENTOSA*

El aislamiento e identificación de los constituyentes alcaloídicos en esta planta lo realizó por primera vez Hemingway; Phillipson(1974), quienes reportaron la presencia de alcaloides indólicos y oxindólicos.

Montenegro de Matta *et al* (1975), solo identificaron alcaloides oxindólicos de una muestra colectada en la selva central peruana, pero no se estableció si la planta perteneció a la especie *U. tomentosa* ó *U. guianensis*, los cuales ambos crecen en esa región.

Wagner *et al* (1985), realizaron una reinvestigación, identificando alcaloides oxindólicos tetracíclicos y pentacíclicos en muestras de 3 variedades de *U. tomentosa*.

Stuppner *et al* (1992), reportó solamente la presencia de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, pero no especificó que variedad fue usada.

Estos inconsistentes hallazgos incitaron a Laus ; Keplinger(1994), a desarrollar métodos por CLAR para la rápida separación y determinación de los alcaloides de esta especie.

Así, con el empleo de este método y utilizando columnas de Li Chro CART de 125mm x 4 mm empacados con Li Chos pher 100 RP-18 (5 μm) se logró determinar hasta 17 alcaloides con isomería conformacional (Laus *et al*, 1997).

Alcaloides oxindólicos pentacíclicos:

Pteropodina 1

Isopteropodina 2

Especiofilina 3

Uncarina F 4

Mitrafilina 5

Isomitrafilina 6

Alcaloides indólicos pentacíclicos:

Rincofilina 7

Isorincofilina 8

Corinoxeína 9

Isocorinoxeína 10

Alcaloides oxindólicos tetracíclicos:

Akuamigina 11

Tetrahidroalstonina 12

Isoajmalicina 13

Alcaloides indólicos tetracíclicos:

Hirsutina 14

Dihidrocorinanteína 15

Hirsuteína 16

Corinanteína 17

También se reporta en Aquino *et al* (1991), el aislamiento del alcaloide 5-α carboxiestrictosidina del primer fraccionamiento por CLAR de un extracto $CHCl_3$-MeOH (9:1).

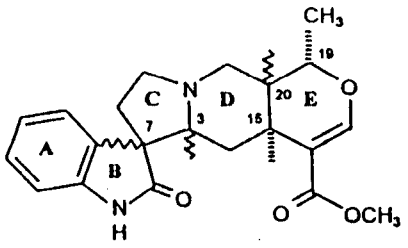
1. Definición de alcaloide

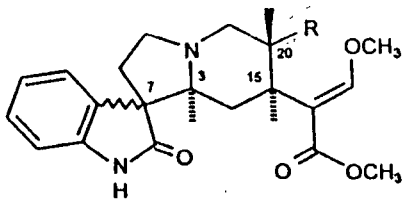
El término alcaloide (de "al kaly" = sosa; alcaloide = que tiene la apariencia de una base) se refiere explícitamente a las propiedades básicas de estos compuestos, llamados a principios del siglo XIX, los álcalis vegetales. Por encima de las discrepancias de muchos autores, se puede considerar clasificar como alcaloides a las sustancias orgánicas de origen natural (sobre todo vegetal) nitrogenadas, con carácter más o menos básico, de distribución restringida en la naturaleza y dotadas, a dosis débiles, de propiedades farmacológicas marcadas. Estas moléculas están confirmadas por reacciones comunes de precipitación (Bruneton,1991).

2. Estructura química

Se han formulado diversas teorías respecto al modo de formación de estas complejas estructuras en el interior de las plantas, teniendo en cuenta, sobre todo, la posibilidad de que sean aminoácidos los precursores biológicos (Fieser,1960).

Así, el esqueleto del triptófano se encuentra en los alcaloides de *U. tomentosa*, el cual origina como núcleo básico al indol, tal como se observa en las estructuras de la Figura 2. El indol es un heterociclo aromático que tiene un anillo de benceno unido lado a lado a un



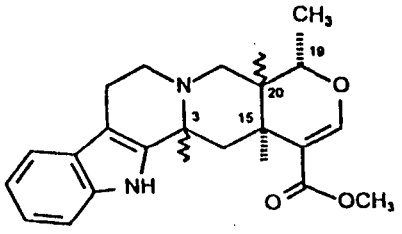


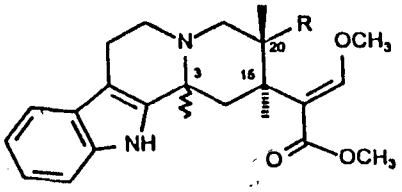
1-6

1	3*S*, 7*R*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
2	3*S*, 7*S*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
3	3*R*, 7*S*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
4	3*R*, 7*R*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
5	3*S*, 7*R*, 15*S*, 19*S*, 20*R*
6	3*S*, 7*S*, 15*S*, 19*S*, 20*R*

7-10

7	3*S*, 7*R*, 15*S*, 20*R* R=ethyl
8	3*S*, 7*S*, 15*S*, 20*R* R=ethyl
9	3*S*, 7*R*, 15*S*, 20*R* R=vinyl
10	3*S*, 7*S*, 15*S*, 20*R* R=vinyl





11-13

11	3*R*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
12	3*S*, 15*S*, 19*S*, 20*S*
13	3*R*, 15*S*, 19*S*, 20*R*

14-17

14	3*R*, 15*S*, 20*R* R=ethyl
15	3*S*, 15*S*, 20*R* R=ethyl
16	3*R*, 15*S*, 20*R* R=vinyl
17	3*S*, 15*S*, 20*R* R=vinyl

Pteropodina	1
Isopteropodina	2
Especiofilina	3
Uncarina F	4
Mitrafilina	5
Isomitrafilina	6
Rincofilina	7
Isorincofilina	8
Corinoxeína	9
Isocorinoxeína	10
Akuammigina	11
Tetrahidroalstonina	12
Isoajmalicina	13
Hirsutina	14
Dihidrocorinanteína	15
Hirsuteína	16
Corinanteína	17

Figura 2: Estructura química de los alcaloides de *Uncaria tomentosa* (alcaloides oxindólicos pentacíclicos o tetracíclicos y sus precursores indólicos). Fuente: Laus *et al* (1997)

anillo de pirrol. El pirrol es un heterociclo de 5 miembros (4 carbonos y 1 nitrógeno), donde cada uno de los 4 carbonos con hibridación sp^2 tiene un orbital p perpendicular al anillo y cada uno contribuye con un electrón π. El átomo de nitrógeno también tiene hibridación sp^2 y su par de electrones no compartidos ocupa un orbital p. Así, existe un total de 6 electrones π, los cuales participan en la aromaticidad (McMurry,1994).

El otro átomo de nitrógeno, que no participa en el grupo indol (ver las estructuras químicas de la Figura 2), es común a 2 anillos y tiene hibridación sp^3. En consecuencia, su par de electrones no compartidos ocupa un orbital sp^3 y esta disponible para cederlo a sustancias electrofílicas.

3. Propiedades físico-químicas

Los alcaloides de esta especie tienen pesos moleculares que varían entre 352 a 384. Son sólidos cristalizables (excepto uncarina F), dotados de poder rotatorio específico, con puntos de fusión sin descomposición para la mayoría por debajo de 180ºC (Cuadro 2). El espectro de absorción UV de estos alcaloides elucidados en metanol, exhibe 3 máximos con longitudes de onda en 208, 243 y 283 ηm.

Por regla general los alcaloides bases son muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares, y solubles en alcoholes de más elevada graduación.

El carácter básico de los alcaloides es muy variable, dependiendo esta propiedad de la disponibilidad del doblete libre del nitrógeno. Los alcaloides de esta especie poseen 2 átomos de nitrógeno. Los agrupamientos electrofílicos adyacentes al átomo de nitrógeno disminuyen la basicidad y los de carácter contrario la aumentan. El sistema heterocíclico puede permitir una basicidad muy variable, para el caso del indol, el doblete del nitrógeno

Cuadro 2: Propiedades físico-químicas de algunos alcaloides oxindólicos de la uña de gato *U. tomentosa.*

Alcaloide	Fórmula molecular	Peso molecular	P.f.°C	$[\alpha]_D^{24°C}$	$UV\lambda_{max}^{MeOH}$
Pteropodina 1	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	214-219/212-213		208,243,283h
Isopteropodina 2	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	204-209/209-211	-85.1	208,243,283h
Especiofilina 3	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	183-184/185-186	+91	208,243,283h
Uncarina F 4	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	amorfo	+85	208,243,283h
Mitrafilina 5	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	264-268/265-266	-4.3	208,243,283h
Isomitrafilina 6	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368,432	96-105	+14.5	208,243,283h
Rincofilina 7	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	384,474	214-216/214	-15.1	208,243,283h
Isorincofilina 8	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	384,474	138-141/144	+7.8	208,243,283h

Fuente : Lock de Ugaz(1994)

participa en la aromaticidad, por lo que no es básico. Al ser básicos, los alcaloides forman sales con ácidos minerales u orgánicos. Estas son hidrosolubles, insolubles en disolventes orgánicos apolares y solubles en alcoholes. La formación de sales, estabiliza la molécula, por lo que comercialmente los alcaloides se encuentran al estado de sales.

4. Propiedades farmacológicas

Wagner *et al* (1985), realizaron ensayos de actividad inmunoestimulante con los alcaloides oxindólicos de la raíz de esta planta, por separado y en conjunto a fin de dilucidar su efecto en la actividad fagocítica de los leucocitos.

En los ensayos *in vitro*, se analizó el grado de fagocitosis de los leucocitos (habilidad de las células de glóbulos blancos y macrófagos para atacar, sumir y digerir microorganismos perjudiciales y sustancias extrañas) observándose que el alcaloide más activo inmunológicamente es isopteropodina(2), y en menor proporción (50%) los alcaloides pteropodina(1), isomitrafilina(6) e isorincofilina(8). También se demostró que mitrafilina(5) y rincofilina(7) son inactivos en la estimulación del sistema inmunológico (Cuadro 3). Para los ensayos *in vivo* en ratas, se aplicó la prueba del aclaramiento del carbón, que determina la velocidad con que el sistema retículo endotelial (RES) reacciona frente a determinadas sustancias extrañas al organismo. Se observó un buen efecto ascendente de la fagocitosis en el extracto acuoso con 10 mg de alcaloide/kg peso del animal. A mayor contenido de isopteropodina en los extractos se observó una mayor eficiencia comparada con su acción a menores concentraciones.

También se demostró que isopteropodina(2) en su forma pura es inactiva *in vitro* e i*n vivo*, como hidrocloruro muestra una gran actividad *in vitro*, más no *in vivo*, y solo con la presencia de restos de catequinas se observó su efectividad *in vivo*. Este trabajo concluyó que la

actividad inmunoestimulante de *U. tomentosa* depende de la coexistencia del contenido en alcaloides, tipos de alcaloide y presencia de sustancias adicionales.

Cuadro 3: Propiedades farmacológicas de algunos alcaloides oxindólicos de *Uncaria tomentosa*

Alcaloide	Propiedad farmacológica
Pteropodina ó uncarina C(1)	Fagocitogénico
Isopteropodina ó uncarina E(2)	Fagocitogénico
Especiofilina ó uncarina D(3)	-
Uncarina F(4)	-
Mitrafilina(5)	Hipotensivo vaso dilatador, depresante general
Isomitrafilina ó ajmalicinaoxindol A(6)	Fagocitogénico
Rincofilina ó mitrinermina(7)	Antipirético hipotensivo sedativo
Isorincofilina(8)	Fagocitogénico

Fuente : Lock de Ugaz(1994)

Stuppner *et al* (1993), investigaron el efecto antiproliferativo de los alcaloides en líneas celulares leucémicas (HL-60 y U-937) aplicándolos en diferentes concentraciones, y observaron que con excepción de la mitrafilina(5) todos los alcaloides inhibieron el crecimiento de ambas células, siendo el efecto más pronunciado el producido por uncarina F(4) con valores de IC_{50} (concentración para inhibir el 50% de las células leucémicas) de 21.7 y 29.0 mol/L para HL-60 y U-937 respectivamente, que lo convierte en una posible

droga para el tratamiento de pacientes con leucemia aguda.

Los alcaloides oxindol-tetracíclicos rincofilina(7) e isorincofilina(8) son capaces de neutralizar el efecto de los alcaloides oxindol-pentacíclicos (efecto antagónico). Además estos alcaloides tienen efectos sobre el sistema nervioso central (efectos negativos cronótropos e inotropos, inhibición de la agregación de trombositos y sus efectos sedantes), que en dosificaciones tóxicas pueden conducir al paro respiratorio y la ataxia. (Reinhard, 1997).

5. Extracción de alcaloides

Para no entorpecer el correcto funcionamiento del proceso extractivo, es conveniente proceder a un desengrasado del polvo de la planta, con hexano o éter de petróleo. Estos disolventes no arrastran casi nunca, en medio neutro, los alcaloides ni parte de ellos. Luego, la extracción puede realizarse por dos vías: extracción en medio alcalino (con un disolvente) y extracción en medio ácido (con agua, una solución alcohólica o hidroalcohólica) (Bruneton,1991).

En las figuras 3 y 4 se esquematizan los métodos de extracción alcalina y extracción ácida. En la extracción vía alcalina, la droga pulverizada se humedece con soluciones diluidas de amoniaco o carbonato de sodio, para liberar los alcaloides. Se seca al ambiente y se extrae con solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo; el extracto orgánico se concentra y se trata con ácido diluido formando las sales de los alcaloides; se alcaliniza este extracto ácido y los alcaloides liberados se extraen con uno de los solventes inmiscibles señalados antes, teniendo así el "extracto crudo de alcaloides" (Lock de Ugaz, 1988).

La extracción vía ácida se realiza con una solución acuosa o alcohólica débilmente ácida (HCl

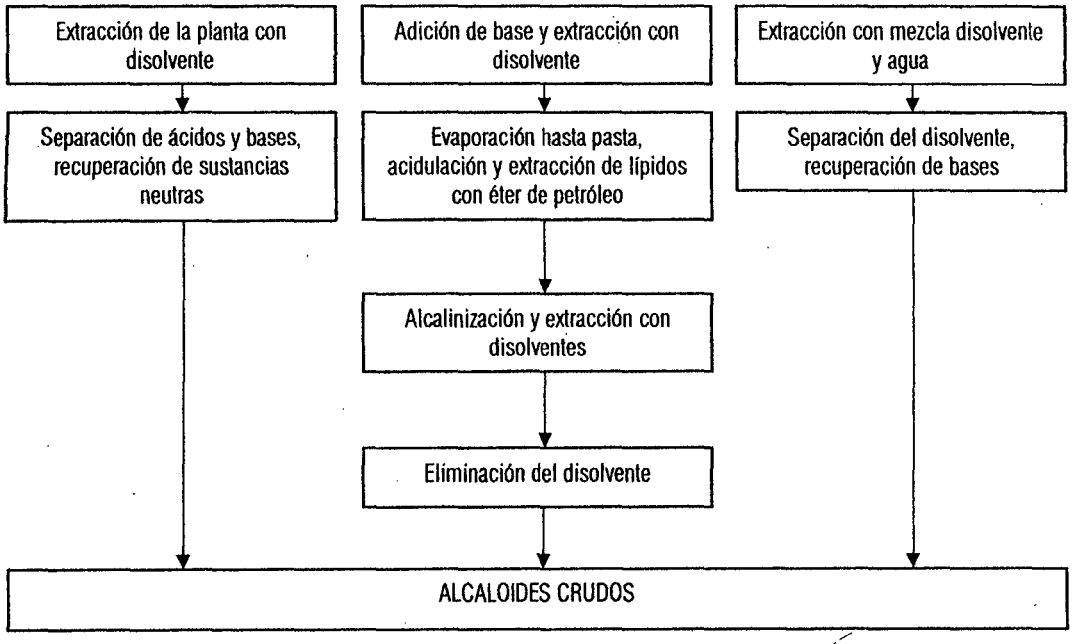


Figura 3: Métodos de extracción alcalina (con disolventes orgánicos). Fuente : Dominguez(1973)

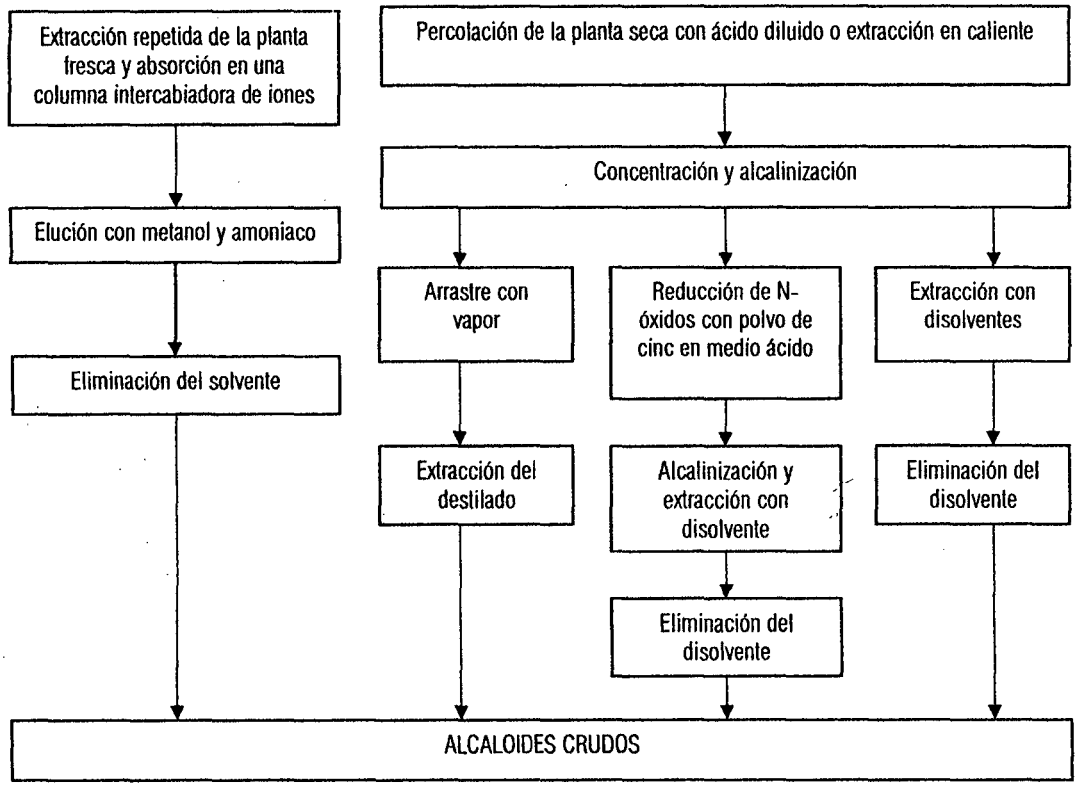


Figura 4: Métodos de extracción ácida. Fuente : Dominguez(1973)

1N o H_2SO_4 1N, o de ácidos acético o tartárico al 10%). El extracto es luego alcalinizado con hidróxido de amonio, de calcio o carbonato de sodio y los alcaloides así liberados, extraídos finalmente con solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, y éter etílico entre otros, se obtiene el "extracto crudo de alcaloides" (Lock de Ugaz, 1988).

6. Cuantificación de alcaloides

Bruneton(1991), menciona que la valoración de alcaloides totales (A.T.) comienza por una extracción de los mismos, asegurando que la extracción sea total y para ello en cada etapa hay que comprobar que el agotamiento sea total. Esto se realiza con reactivos de precipitación, cuyas reacciones se fundan en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con metales pesados: bismuto, mercurio, tungsteno o yodo. En la práctica, se emplean soluciones yodo-yoduradas como el mercuritetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer). El residuo de A.T. se puede después valorar por métodos gravimétricos, volumétricos o espectrofotométricos.

Los métodos gravimétricos son fáciles de llevar a cabo, pero la simple pesada del residuo de A.T. carece de precisión; el error por exceso no es despreciable y es sobre todo importante cuando el contenido alcaloídico es bajo.

Los métodos volumétricos son mucho más interesantes, puesto que se fundan en el carácter básico de los alcaloides. Se redisuelven los A.T. en un exceso de ácido titulado y se valora por retroceso dicho exceso, con una base de título conocido en presencia de un indicador coloreado. Si el carácter básico es demasiado débil para permitir una valoración fiable, el residuo de A.T. se disuelve previamente en ácido acético anhidro, que exalta su basicidad y luego se valora con un ácido fuerte, ácido perclórico (protometría en medio no acuoso).

Los métodos espectrofotométricos son muy sensibles y tienen gran importancia cuando el

contenido en A.T. es débil. Es necesario que la reacción sea altamente específica.

En las valoraciones especiales, si no se dispone de un método físico-químico o espectral, que permita valorar específicamente un determinado componente presente en una mezcla, se debe utilizar las técnicas cromatográficas: eluyendo las manchas separadas por cromatografía en capa delgada (CCD), y valorando estas soluciones por colorimetría o espectrofotometría o bien por densitometría directa de las placas de CCD, y sobre todo la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Laus ; Keplinger(1994), desarrollaron 2 sistemas de elución para la rápida separación de los alcaloides de *Uncaria tomentosa* por CLAR. En el sistema I se usó como eluente acetonitrilo : t-butilmetileter : buffer fosfato acuoso 10 m*M*(pH 6.7) (34:1:65) con una tasa de flujo de 1.0 $mL.min^{-1}$ con temperatura en la columna de 12°C y presión de 110 bar. En el sistema II el eluente fue acetonitrilo : buffer fosfato acuoso 10 m*M*(pH 7) (45:55) con una tasa de flujo de 1.3 $mL.min^{-1}$, temperatura en la columna de 80°C y presión de 55 bar. La detección para ambos sistemas se llevó a cabo a 245 ηm. Así, el sistema II provee en un mínimo tiempo, excelente resolución por su corto límite de detección (0.5 $\eta g.mL^{-1}$) comparado con el sistema I (5$\eta g.mL^{-1}$).

Para la cuantificación por CLAR con detectores UV, se realizan curvas estándar, calibrando con pteropodina para alcaloides oxindólicos, y con ajmalicina para los indólicos. Luego se establece una relación lineal entre el área bajo el pico y la concentración de alcaloide estándar (con rangos de concentración de 0.005-20 y 0.005-1$\mu g.mL^{-1}$ para pteropodina y ajmalicina respectivamente) (Laus *et al*, 1997).

C. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO ALCALOIDICO DE *Uncaria tomentosa*

1. Variedad

Keplinger(1982), en una interrogación a personas nativas de nuestra selva peruana, quienes usan raíces de Uncaria en medicina tradicional, revelaron que existe 3 variedades de *Uncaria tomentosa* (Willd)D.C., que en el aspecto exterior no tienen diferencias entre sí; éstas se notan al observar el color de la corteza recién cortada y el color de la raíz; así se distinguen los 3 tipos de acuerdo al color del líber fresco: plantas con una coloración del líber blanco grisáceo, marrón dorado y rojo oscuro. La correlación del contenido de alcaloides y el color de la corteza de la raíz se pudo establecer (Cuadro 4).

Cuadro 4: Contenido de alcaloides de 3 variedades de color de la corteza de la raíz de *U. tomentosa*[1].

Alcaloide	Contenido de alcaloide ($mg.g^{-1}$)		
	Blanco grisáceo	Marrón dorado	Rojo oscuro
Pteropodina 1	7.54	5.20	10.53
Isopteropodina 2	3.94	2.49	2.99
Especiofilina 3	8.16	2.80	4.06
Uncarina F 4	3.00	0.79	0.86
Mitrafilina 5	3.03	4.70	1.83
Isomitrafilina 6	0.52	1.89	0.04
Alcaloides totales	26.20	17.88	20.30

[1] Muestras colectadas en julio de 1990.
Fuente : Laus ; Keplinger(1994)

Laus ; Keplinger(1994), mencionan que estas 3 variedades se adaptan de acuerdo al clima, la variedad rojo oscuro tiene preferencia en un ambiente cálido y húmedo. La variedad blanco grisáceo prefiere condiciones frías y secas, y la variedad marrón dorado esta entre estas dos condiciones.

2. Estación

Laus ; Keplinger(1994), analizaron muestras de plantas individuales colectadas en diferentes años (Cuadro 5), los que mostraron diferentes modelos de alcaloide, con fluctuaciones altas de un modelo a otro con el transcurso de los años. De este modo, se explica los inconsistentes hallazgos de investigaciones anteriores. Solo hay reportes de que la especie asiática *Mitragyna parvifolia* cambia sus alcaloides oxindólicos en varios meses.

Cuadro 5: Variación del contenido de alcaloides de la corteza de la raíz de *Uncaria tomentosa* colectado en diferentes tiempos.

Alcaloide	Contenido de alcaloide ($mg.g^{-1}$)						
	Planta n°1				Planta n°2		
	Octubre 1985	Julio 1987	Julio 1990	Julio 1992	Junio 1983	Octubre 1985	Julio 1987
Pteropodina 1	3.14	2.65	6.18	0.04	1.29	3.83	0.04
Isopteropodina 2	1.01	1.53	2.72	0.01	0.40	1.66	0.01
Especiofilina 3	1.65	2.32	3.61	0.03	1.72	2.49	0.03
Uncarina F 4	0.35	0.61	0.86	0.17	0.39	0.66	0.00
Mitrafilina 5	1.91	3.59	5.48	0.11	1.07	3.62	0.07
Isomitrafilina 6	0.80	1.63	2.17	0.04	0.66	1.52	0.08
Rincofilina 7	0.01	0.08	0.05	13.82	20.33	0.09	12.53
Isorincofilina 8	0.02	0.03	0.02	14.23	12.39	0.03	8.63
Alcaloides totales	8.89	12.44	21.09	28.45	38.25	13.90	21.39

Fuente : Laus ; keplinger(1994)

Los alcaloides rincofilina(7) e isorincofilina(8) fueron detectados en mayor proporción en esas muestras y, en todo momento los isómeros pentacíclicos y tetracíclicos fueron encontrados como mayores constituyentes. El contenido de alcaloides totales varió de 0.36 a 38.30% (p/p) en base seca y la planta material fue colectada siempre de junio a octubre. Laus *et al* (1997), también monitorearon la variación estacional en una planta de esta especie (Cuadro 6), donde se observa que, en hojas jóvenes el contenido de uncarina F(4) fue alto durante la primavera y el verano, y disminuyo en el otoño.

Cuadro 6: Variación estacional de los alcaloides en hojas jóvenes de *Uncaria tomentosa.*

Alcaloide	Abril 1994	Dicie. 1994	Abril 1995	Mayo 1995	Octub. 1995	Dicie. 1995	Abril 1996	Mayo 1996	Julio 1996	Setiem 1996
	mg alcaloide.g^{-1}planta material									
Planta n°16										
Pteropodina 1	3,10	3,80	11,5	7,10	8,20	+	1,10	4,70	2,70	4.00
Isopteropodina 2	0,89	2,30	4,20	2,20	2,60		1,30	1,80	1,70	1,40
Especiofilina 3	6,40	13,4	14.0	13,7	9,40		8,50	6,50	7,40	8,30
Uncarina F 4	18,3	7,40	64,4	44,6	2,20		25,9	29,6	39,8	15,2
Mitrafilina 5					0,02					
Isomitrafilina 6					0,10					
Akuamigina 11	1,70	0,75	15,80	10,80			2,10	3,10	6,80	1,50
Tetrahidroalstonina 12			4,10	3,50			0,15		1,20	0,10
Total	30,4	27,7	114.0	81,9	22,5		39,1	45,7	59,6	30,5

+ Hojas jóvenes no evaluadas.
Fuente : Laus *et al* (1997).

En este mismo estudio al analizar otras 2 plantas, se encontró trazas de alcaloides pentacíclicos, comparados con los alcaloides tetracíclicos importantes, siendo

probablemente el indicio de un futuro cambio. Asimismo, en otras 4 plantas se reportan pequeñas cantidades de alcaloides tetracíclicos, los que podrían ser remanentes de un cambio reciente. Aun no es entendido que influencias causan estas transformaciones de un modelo de alcaloide a otro, pero debe tenerse en consideración que 2 plantas (plantas 14 y 15) cultivadas en atmósfera controlada en jardines botánicos de Graz e Insbruck, Austria, reportaron solamente alcaloides pentacíclicos.

3. Edad

Laus *et al* (1997), investigaron en 14 plantas peruanas de *U. tomentosa* el contenido de alcaloides de sus hojas jóvenes y adultas (Cuadro 7), cosechadas en mayo de 1994. En ese tiempo las plantas tenían aproximadamente 2 años de edad.

En hojas jóvenes, (4) fue el alcaloide predominante entre (1), (2) y (3), mientras que en hojas adultas, (3) fue más abundante.

Estos resultados son sorprendentes, ya que (3) y (4) son termodinámicamente los más inestables de este grupo de alcaloides (se isomerizan muy rápidamente).

En las hojas jóvenes los alcaloides son sintetizados a partir de (11), no identificado antes en *U. tomentosa*. El epímero (12) fue encontrado solo en pequeñas cantidades.

En algunas plantas se detecto solamente a (7) y (8), junto con sus congéneres (9) y (10). Estos 4 alcaloides también ocurren juntos en otras especies de Uncaria. Pequeñas cantidades de los alcaloides indólicos tetracíclicos (14), (15), y trazas de (16) fueron encontradas en hojas y raíces. Solo en 2 plantas, fue detectado (17).

En general, las hojas jóvenes tienen la más alta concentración de alcaloides de todas las partes de la planta. Sin embargo, se comprobó que no hay diferencia significativa en las proporciones de los alcaloides oxindólicos principales de las hojas y raíces.

Cuadro 7: Contenido alcaloídico en hojas jóvenes y adultas de plantas peruanas de *U. tomentosa*.

	planta n°						
	1	2	3	4	8	9	13
	mg alcaloide.g^{-1}planta material						
Hojas jóvenes							
Pteropodina 1	3.30	5.20	3.00	0.82			
Isopteropodina 2	1.50	2.00	2.10	0.67			
Especiofilina 3	7.10	8.60	7.00	1.20			
Uncarina F 4	11.20	17.50	13.70	1.60			
Mitrafilina 5						0.03	
Isomitrafilina 6						0.02	
Rincofilina 7					9.20	10.70	10.90
Isorincofilina 8					14.80	20.80	18.10
Corinoxeína 9					0.27	0.44	0.39
Isocorinoxeína 10					0.29	0.17	0.33
Akuammigina 11	3.10	9.60	6.10	40.00			
Tetrahidroalstonina 12	0.30	0.62	1.50	0.85			
Isoajmalicina 13							
Hirsutina 14					2.30	1.70	1.80
Dihidrocorinanteína 15					4.80	1.60	4.40
Hirsuteína 16					0.21	0.11	0.14
Corinanteína 17					0.08		0.04
Total	26.50	43.50	33.40	45.10	32.00	35.60	36.10
Hojas adultas							
Pteropodina 1	4.00	4.70	4.70	4.60			
Isopteropodina 2	1.70	3.00	2.00	3.10			
Especiofilina 3	4.90	10.80	5.70	7.40			
Uncarina F 4	1.10	2.80	1.40	1.90			
Mitrafilina 5						0.09	
Isomitrafilina 6	0.09		0.11			0.09	
Rincofilina 7					3.20	3.20	4.40
Isorincofilina 8					8.70	9.10	12.00
Corinoxeína 9					0.06	0.05	0.10
Isocorinoxeína 10					0.20	0.17	0.32
Akuammigina 11	0.05	0.39					
Isoajmalicina 13							
Hirsutina 14					0.12		0.15
Dihidrocorinanteína 15					2.10	0.45	0.58
Hirsuteína 16					0.14		
Total	11.80	21.70	13.90	17.00	14.50	13.20	17.60

Fuente : Laus *et al* (1997)

4. Distribución en la planta

Laus *et al* (1997), también investigaron en 2 plantas de *U. tomentosa* el contenido de alcaloides de sus hojas jóvenes y adultas, de sus raíces, tallos y ramitas (Cuadro 8). La isomerización de mitrafilina(5) sucedió en algunas de las hojas más adultas y en la corteza verde de la ramita. En la corteza del tallo estuvo presente isomitrafilina(6).

Cuadro 8: Distribución de los alcaloides en diferentes partes de 2 plantas de *U. tomentosa.*

Alcaloides	Hojas jóvenes	Hojas adultas	Corteza de la ramita	Corteza del tallo	Raíz
	mg alcaloide.g^{-1}planta material				
Planta n°15					
Pteropodina 1	2.80	9.30	3.00	0.05	1.10
Isopteropodina 2	1.90	4.10	0.63	0.06	0.57
Especiofilina 3	12.20	9.60	1.60	0.08	2.10
Uncarina F 4	47.90	2.40	0.63	0.03	0.91
Mitrafilina 5			0.50	0.03	1.60
Isomitrafilina 6		0.06		0.02	0.84
Akuammigina 11					
Total	64.80	25.50	6.40	0.27	7.10
Planta n°16					
Pteropodina 1	3.10	5.20	1.70	0.32	1.50
Isopteropodina 2	0.89	1.90	0.54	0.23	0.65
Especiofilina 3	6.40	6.20	1.30	0.50	1.50
Uncarina F 4	18.30	1.50	0.39	0.22	0.50
Mitrafilina 5			0.55	0.30	1.60
Isomitrafilina 6					0.72
Akuammigina 11	1.70				
Total	30.40	14.80	4.50	1.60	6.50

Fuente : Laus *et al* (1997)

5. Método de extracción

Los alcaloides de *U. tomentosa* son espiroestructuras que sufren isomerización fácilmente cuando son calentados con ácidos o bases. En extracciones con soluciones ácidas, la isomerización es lenta en general y casi cesa a temperatura ambiente.

La técnica usual de extracción continua en un aparato Soxhlet, donde el material esta en contacto con un solvente hirviendo (metanol) durante un periodo prolongado, produce cambios en la conformación de los alcaloides, tal como fue comprobado para pteropodina(1) que se isomerizó en (2), (3) y (4). Lo mismo ocurre con (5) y (7) que se isomerizaron a (6) y (8) respectivamente. Estas conversiones también toman lugar en la planta, pero no después de haber sido secadas (Laus ; Keplinger,1994).

En el Cuadro 9 se reporta resultados del contenido en alcaloides usando diferentes métodos de extracción.

Cuadro 9: Comparación de los métodos de extracción en el contenido alcaloídico de *U. tomentosa*.

Alcaloide	Extracción por Soxhlet		Extracción ácida	
	corteza de raíz $mg.g^{-1}$	alcaloides totales %	corteza de raíz $mg.g^{-1}$	alcaloides totales %
Pteropodina 1	6.51	51.62	5.75	49.01
Isopteropodina 2	3.76	29.8	2.28	19.44
Especiofilina 3	0.38	3.03	1.81	15.41
Uncarina F 4	0.64	5.09	0.55	4.70
Mitrafilina 5	1.03	8.15	1.13	9.65
Isomitrafilina 6	0.29	2.30	0.21	1.79
Alcaloides totales	12.61		11.73	

Fuente : Laus ; Keplinger(1994)

D. EXTRACCION SOLIDO-LIQUIDO

Es una operación de transferencia de materia destinada a separar los principios solubles de un sustrato sólido, mediante su difusión en un solvente. Por regla general la fase noble esta constituida por la solución del extracto (jugo de remolacha, mezcla de aceite, mosto de cervecería, etc.) mientras que la fase insoluble constituye el residuo (tortas, estrujado de oleaginosas, residuos de cebada). Sin embargo, también puede darse el caso inverso; así por ejemplo, el lavado de la caseína láctea debe considerarse como la extracción de lactosa y de sales minerales. Del mismo modo el blanqueado de patatas destinado a disminuir parcialmente los azúcares con el fin de limitar las reacciones de Maillard es una extracción sólido-líquido. Por último, la eliminación de componentes indeseables como las lipoproteínas amargas de la soja o la cafeína del té o del café, puede realizarse mediante extracción con disolvente (Mafart,1994).

1. Características industriales en la extracción sólido-líquido

Mafart(1994), menciona que la extracción ideal debería cumplir los cuatro factores siguientes:

- caudal elevado,
- máximo rendimiento,
- elevada o débil selectividad en función al objetivo perseguido,
- elevada concentración del extracto.

Estos cuatro requisitos son difíciles de aunar, debiendo llegar, en la práctica, a un compromiso.

a. Caudal

Puede expresarse como la masa de extracto obtenida por unidad de tiempo. En extracción en continuo, resulta interesante cuantificar la facilidad de extracción mediante

su número de unidades de transferencia (NUT).

b. Rendimiento

No todo el mundo entiende la palabra rendimiento del mismo modo. Para los cerveceros, se trata de la masa de extracto seco obtenida en el mosto respecto a la masa bruta de harina de malta empleada. En la mayoría de medios (té, café, frutas), se trata de la masa de extracto seco obtenida respecto a la masa de extracto seco soluble inicial de la fase sólida. Por último, según la lógica, cuando se trata de una extracción que debe ser muy selectiva, como la del azúcar, el rendimiento representa la masa de la fracción deseada (por ejemplo sacarosa) obtenida en el extracto respecto a la masa de dicha fracción presente inicialmente en la fase sólida. Un sencillo balance de materia de la extracción permite determinar su rendimiento. Basta con conocer la 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.

c. Selectividad

En algunas industrias la preocupación por la selectividad se limita a no extraer ciertos componentes indeseables (cervecería, café, té, etc.). Por el contrario, en otras se pretende extraer un solo componente (azúcar) o una fracción muy bien definida (extracción de proteínas). En estos casos la selectividad se caracterizará por el contenido del extracto en sacarosa o en proteínas, respecto a su extracto seco total.

d. Concentración del extracto

Excepto en el caso particular del mosto de cervecería, generalmente el extracto debe ser no solamente concentrado sino además totalmente seco. Está claro pues que los costes

de secado, relacionados con el consumo de energía, serán tanto más elevados cuanto más diluido sea el extracto.

2. Factores que influyen en la eficacia de la extracción

Durante la extracción, intervienen factores que modifican más o menos directamente la velocidad de extracción, la concentración del extracto y el rendimiento.

a. Naturaleza del solvente

Por razones evidentes, el agua es el solvente más adecuado y mayoritariamente empleado en las industrias agro-alimentarias. Es útil para la extracción de azúcares (sacarosa, dextrinas y maltosa en cervecería, lactosa en industrias lácteas, etc.), de compuestos nitrogenados (proteínas de cualquier origen) y de sales minerales. En la producción de café "instantáneo" soluble, el café tostado y molido se somete a una lixiviación con agua pura, y el tanino se extrae de las cortezas de árboles por lixiviación con agua. Por el contrario, la industria aceitera emplea disolventes orgánicos como hexano, tricloroetileno, acetona y éter, para extraer aceite de maní, soja, semillas de lino, girasol, algodón, etc. Los disolventes orgánicos también son empleados cuando se quiere realizar una extracción selectiva de un compuesto del cual se pretende prescindir, como en la eliminación de cafeína mediante cloroformo para la fabricación de café "descafeinado", en la eliminación mediante etanol de las lipoproteínas amargas de la soja, etc. En la industria farmacéutica, se obtienen una gran diversidad de productos por lixiviación de raíces de plantas, hojas y tallos (Geankoplis,1982 ; Mafart,1994).

b. pH del medio de extracción

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

sobre la solubilidad de los compuestos a extraer, el pH también participa en las hidrólisis químicas y enzimáticas. Y de manera secundaria, el pH puede aprovecharse para aportar a la extracción cierta selectividad como en la acidificación del agua del malteado que permite entre otras ventajas, reducir la disolución de taninos y resinas amargas contenidas en las cáscaras de malta (Mafart,1994).

c. Temperatura

En las extracciones físico-químicas (en las que no se dan hidrólisis enzimáticas), los valores elevados de temperatura favorecen el rendimiento de extracción por cuatro motivos principales: el calor facilita la extracción al permeabilizar las paredes celulares que se desnaturalizan; el calor, al menos en los intervalos usuales de temperatura, aumenta la solubilidad de los materiales que se desean extraer; el calor aumenta los coeficientes de difusión; por último, el calor disminuye la viscosidad de los jugos extraídos, lo que facilita, no solo el paso de jugo a través de la masa de substrato sólido sino también las posteriores operaciones de separación (sedimentación o filtración). Por el contrario, una temperatura excesiva, actúa en sentido contrario, por desnaturalización de los productos a extraer. La preocupación por la selectividad puede ser un factor limitante de la temperatura escogida (Mafart,1994).

d. Tamaño y forma de las partículas

Durante la extracción, los intercambios osmóticos serán tanto más importantes cuanto mayor sea la superficie total expuesta por las partículas y cuanto menor sea el radio de ellas. Por ello, la extracción siempre va precedida de una operación mecánica (corte, raspado, triturado, etc.). Una exageración en la finura de las partículas disminuye la permeabilidad al disolvente de la capa de sólidos. Esto origina corrientes preferenciales

y bloquea el proceso de extracción en las zonas en las que no circula el solvente. Por otra parte se debe prever la siguiente operación que siempre es una fase de clarificación (separación del jugo y del residuo insoluble). Con cualquiera de las técnicas empleadas, la fase de clarificación se hace tanto más difícil cuanto menor es la talla de las partículas a separar (Mafart,1994)

Para la lixiviación de productos farmacéuticos de hojas tallos y raíces, el secado y la molienda del material antes de la extracción ayuda a romper las paredes celulares. De esta manera, el disolvente puede atacar directamente al soluto (Geankoplis,1982).

3. Métodos de extracción industrial

La extracción de sólidos es un paso importante en la producción de muchos productos. Las tinturas por ejemplo se preparan por percolación o maceración de la droga en su estado natural con un menstruo hidroalcohólico. Los alcaloides y otros compuestos de origen vegetal y animal se separan, por lo general, de las fuentes de procedencia con extracción por disolventes.

a. Extracción por relixiviación o percolación fraccionada

Geankoplis(1982), menciona que esta técnica es conocida como lixiviación *in situ*, donde se permite que el disolvente fluya por percolación por el lecho de partículas (sólido) y el licor de lixiviación se bombea a otra pila de sólido triturado.

En los extractores con lechos fijos, las cubiertas de la tapa y el fondo son removibles, de tal manera que es posible extraer el sólido ya lixiviado y añadir nueva carga. En los extractores con lechos móviles, como el extractor Bollman, emplean elevador de cangilones perforados que transportan el sólido y el solvente fluye a contracorriente con los cangilones y por percolación dentro de éstos (McCabe ; Smith,1981).

b. Extracción por reflujo

Consiste en tomar una porción de sólido finamente reducida a polvo y mezclar con el agente extractante. Luego se separa por filtración el sólido consumido. Algunas veces es aconsejable calentar la mezcla para acelerar la extracción (Connors,1981).

Pueden emplearse extractores con lechos fijos o móviles. Los primeros son espesadores en serie (tanques de sedimentación provistos de agitador y raspador), donde el solvente fluye a contracorriente desde el espesador de la primera serie y el sólido lo hace desde la última, el cual se desplaza por el fondo gracias a los lentos raspadores giratorios. Los últimos, como el extractor de Hildebrant consisten en 3 transportadores de tornillo en forma de U vertical, donde el solvente fluye a contracorriente con respecto al sólido que se alimenta en la parte superior derecha (McCabe ; Smith,1981).

c. Extracción continua

Sirve para lixiviar todo el componente activo de las drogas vegetales, empleando un extractor automático. De estos, los más conocidos son aquellos que se fundan en el extractor Soxhlet, donde el sólido esta en contacto con un solvente hirviendo durante un periodo prolongado (Connors,1981).

4. Tratamientos complementarios

a. Purificación

La purificación incrementa la relación de componente deseado con respecto al extracto seco total. Las técnicas incluyen a la precipitación, la ultrafiltración y a la cromatografía de intercambio iónico.

La fabricación tradicional de queso no es más que una purificación por coagulación

(precipitación) de la leche, si ésta se considera como un extracto proteínico natural. La ultrafiltración es una técnica de separación por membranas semipermeables que seleccionan a las moléculas según su tamaño por tamizado. La solución a ser tratada es separada en 2 fases: el líquido retenido que contiene a las macromoléculas rechazadas por la membrana y el ultrafiltrado que pudo atravesar la membrana. El interés en la ultrafiltración es doble debido a sus efectos simultáneos de concentración y purificación. La purificación por cromatografía de intercambio iónico es apropiado para obtener productos con grados de pureza elevados, y puede ser, como la ultrafiltración, importante en la concentración si el volumen del eluente es inferior al del extracto bruto (Bourgeois,1986).

b. Secado

Toda cadena de extracción termina en forma obligatoria en esta operación, con excepción de la cervecería que se distingue de otras industrias alimentarias por diluir en vez de secar. El secado permite que el producto final quede estabilizado, su volumen reducido y su facilidad de empleo incrementada. Las técnicas empleadas incluyen a la evaporación, al secado por aspersión (spray-dry), la liofilización, y las técnicas de concentración por membranas (ultrafiltración y osmosis inversa).

El secado por aspersión conserva la calidad del producto tratado, pero mejor lo hace la liofilización. Ambas técnicas son costosas y altas consumidoras de energía (el consumo energético específico del secador por aspersión es 1300 kcal por kg de agua eliminada). Por ello no resulta económico secar directamente por aspersión y menos aún, por liofilización. Más bien, las primeras fracciones de solvente pueden ser eliminadas en forma más adecuada por técnicas de concentración menos costosas, como la

evaporación que consume 10 veces menos energía que el secado por aspersión. La ultrafiltración y la osmosis inversa consumen aún menos energía que la evaporación y concentran sin recurrir a un tratamiento térmico, por lo que son apreciadas para concentrar productos altamente termosensibles. (Bourgeois,1986).

E. BEBIDAS CARBONATADAS

1. Definición

Desrosier(1983), define a las bebidas carbonatadas como refrescos endulzados, saboreados, acidulados coloreados y conservados mediante aditivos químicos. Su elaboración consiste básicamente en mezclar agua carbonatada muy fría, previamente tratada, con los demás ingredientes. El producto acabado puede tener de 2 a 5 volúmenes de CO_2 por volumen de líquido (1 volumen de CO_2 = 15 $Lb.pulg^{-2}$, a 15°C), y la cantidad de azúcar oscila entre 8.5 y 14°Brix.

2. Ingredientes

Se permite adicionar sacarosa, glucosa, jarabe de glucosa, sorbitol, etc., como edulcorantes; adicionar ácido acético, adípico, cítrico, fumárico, láctico, málico, fosfórico y tartárico como acidulantes; y también esta permitido la adición de ciertos tampones salinos y emulsificadores, estabilizantes y espumantes (Hart ; Fisher,1991).

Los colorantes empleados son generalmente los sintéticos (colorantes certificados de anilina), debido a su mayor intensidad y estabilidad frente a los colorantes naturales de fruta (Potter,1992).

Los saborizantes empleados pueden ser sintéticos, extractos naturales y concentrados de jugos de fruta (Zapata,1966).

Bourdon(1963), define a los extractos naturales como productos comúnmente de color pardo oscuro, sólidos o espesos como la miel, resultantes de la evaporación de jugos o de la infusión de materias vegetales o animales, también pueden ser obtenidos por cualquier otro procedimiento químico. Desempeñan un importante papel en la elaboración de bebidas de todas clases.

3. Tratamiento del agua

El agua a emplear en los refrescos debe ser de alta pureza y deberá eliminarse olores, sabores, colores y ciertos minerales indeseables. Para ello se emplean coagulantes, cal y cloro (Desrosier,1983).

Los coagulantes químicos como el alumbre, aluminato de sodio y sulfato ferroso (caparrosa), son usados para sedimentar impurezas en suspensión que dan turbidez y color al agua. La cal regula la alcalinidad del agua, por precipitación de las sales solubles de calcio y magnesio, evitando así la neutralización de los ácidos usados para condimentar el producto. Una libra de cal añadida al agua dura, remueve aproximadamente 3.5 libras de sólidos en forma de precipitados. El cloro desinfecta y oxida las impurezas del agua, esta última propiedad es capaz de eliminar colores, olores, sabores, minerales y otros compuestos indeseables en el agua. Con frecuencia es necesario emplear dosis en un rango de 12 a 15 ppm, para lograr su efecto oxidante y ayudar en la función apropiada al sulfato ferroso (Pepsi-Cola,1975).

Finalmente se utilizan filtros de arena y grava, así como también filtros de láminas de fibra conocidos como pulidores para complementar la purificación. Para eliminar sabores y olores del cloro se utilizan filtros de carbón activado (Desrosier,1983).

4. Preparación de jarabes

Los jarabes simples se elaboran con agua pura y azúcar refinada de la mejor calidad obteniéndose una solución de concentración entre 45 y 65% de azúcar en peso, dependiendo del uso a que se destine. El jarabe terminado es la mezcla completa de los ingredientes, incluyendo el jarabe simple (Rollin,1953 ; Zapata,1966).

Desrosier(1983), menciona el siguiente procedimiento para elaborar jarabes:

a. Elaborar el jarabe simple y filtrar cualquier sedimento.

b. Disolver el preservante y el color en una pequeña cantidad de agua caliente y agregarlo al jarabe simple.

c. Agregar el ácido y mezclar bien.

d. Agregar el sabor, algunas veces el sabor, color y preservante se mezclan entre sí. Deben adicionarse antes del ácido.

e. Completar la fórmula agregando la cantidad necesaria de agua.

Cuando se elaboran jarabes de jugos de fruta, se puede utilizar benzoato de sodio en la proporción de 0.05% como complemento de la acción preservativa del ácido y dióxido de carbono contenido en la bebida.

III. MATERIALES Y METODOS

A. LUGAR DE EJECUCION

El presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, con el apoyo de los laboratorios de la Facultad de Industrias Alimentarias y de la Facultad de Zootécnia.

B. MATERIA PRIMA E INSUMOS

1. Materia prima

La materia prima utilizada fue cortezas del tallo de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. *Rubiaceae*, variedad de color marrón dorado (yellow brown), conocida en nuestra zona como 'uña de gato'.

Los tallos frescos fueron colectados de Pichis-Palcazú, Provincia de Puerto Inca, Región Andrés Avelino Cáceres, Perú. La identificación de la planta material fue realizada por el Ingº R.N.R. Warren Ríos García.

2. Insumos

Como insumos se emplearon:

- Etanol 96°GL.
- Acido tartárico comercial.
- Agua purificada.
- Agua carbonatada "San Luis".
- Azúcar blanca industrial.
- Colorante caramelo.
- Saborizante "Pepsi-cola".

C. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

1. Equipos de laboratorio y proceso

Se utilizaron los siguientes equipos:

- Estufa bacteriológica con termostato para temperatura regulable de 0 a 300°C. Lab-Line, Instruments Inc. Melrose Park 111.
- E stufa científica, marca Labor Muszeripari, Müvek-Hungria, rango de vacío, de 0.0 a 1.0 $kp.cm^{-2}$.
- Balanzas electrónicas, marca Sartorius, sensibilidad 0.1 y 0.0001 g., EE.UU.
- Equipo extractor Soxhlet.
- Equipo extractor a reflujo.
- Equipo de destilación al vacío.
- Equipo de filtración al vacío.
- Calentador de agua y plataforma de calentamiento con agitador.
- Refractómetro de mesa, con rango de lectura de 0-80% de sólidos solubles, CarlZeis.
- Potenciómetro, rango de pH 0-14, marca Schott, modelo CG840.
- Centrífuga Budapesti-Hungria, r.p.m. 80, kw. 0.2.
- Espectrofotómetro molecular Shimadzu, rango fotométrico 200-1100 ηm.
- Espectrofotómetro de absorción/emisión atómica A.A.E., Video 12. Instrumentation Laboratory.
- Secador de cabina, Precision Scientific, U.S.A.
- Molino manual, marca Corona, Landers y Clia., Colombia.
- Molino de cuchillas, Laboratory Mill. Thomas Scientific, U.S.A.
- Congelador doméstico.

- Coronador manual.
- Desionizador de agua, Easy pure RF.
- Microcomputador IBM, modelo ED3.
- Impresora EPSON Stylus color 440.

2. Materiales de laboratorio

Se utilizaron los siguientes materiales:

- Ampollas de decantación, capacidad 100, 500, 1000 y 2000 mL.
- Balones de vidrio, capacidad 100, 500 y 1000 mL.
- Buretas, fiolas, pipetas, micropipetas, goteros.
- Vasos de precipitados, capacidad 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL.
- Campanas de desecación.
- Pesasustancias, viscosímetro capilar de Cannon-Fenske y picnómetro.
- Tubos de ensayo graduados y herméticos, capacidad 15 mL.
- Cubetas de cuarzo.
- Termómetro, con rango de temperatura 0-150°C.
- Tamiz , con diámetro de luz 315 μm.
- Papel filtro Whatman Nº42 y papel de filtración rápida.
- Frascos ámbar de capacidad 250, 500, 1 000 y 2 000 mL.
- Bolsas de polietileno, tapas corona y botellas de capacidad 285 mL.

3. Reactivos y soluciones

Se utilizaron los siguientes reactivos y soluciones:

- Hexano
- Benceno

- Hidróxido de amonio concentrado y solución al 10%.
- Acetato de etilo
- Solución de ácido sulfúrico al 1.25%, al 2%, 0.1 *N* y 0.02 *N*.
- Solución de hidróxido de sodio al 1.25%, 0.1 *N* y 0.02 *N*.
- Solución de ácido clorhídrico al 10%(v/v), al 50%(v/v) y 0.1 *N*.
- Reactivo de Mayer.
- Cloroformo y Cloroformo-etanol(9:1).
- Acido acético

D. METODOS DE ANALISIS

1. Materia prima

a. **Medidas biométricas.-** Se evalúo el peso y las dimensiones geométricas de tallos y cortezas frescas de uña de gato, empleando para ello balanza, pie de rey y cinta métrica. Se realizó 10 medidas para determinar la media y la desviación estándar (Shewfelt,1993).

b. **Análisis químico proximal.-** Se realizó el análisis de agua, método 930.04; cenizas, método 930.05; grasa, método 930.09, proteína bruta, método 930.07, (AOAC,1975). El análisis de fibra bruta se determinó por el método F-3 (Lees,1982), y el contenido de carbohidratos totales, por diferencia de los valores anteriores.

c. **Minerales.-** La determinación cuantitativa de minerales en la materia prima se efectuó por espectrofotometría de absorción atómica, método 975.03 (AOAC International,1997 ; Sandoval,1994). Los metales evaluados fueron: Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, K^{+} y Na^{+}.

d. **Alcaloides totales.-** La cuantificación de alcaloides totales del material vegetal se realizó por el método general de titulación y extracción alcalina (A.O.A.C,1975 ; Lock de Ugaz,1988). El procedimiento se brinda en el anexo C.

e. **Acidez total.-** Se realizó por neutralización con hidróxido de sodio. Es el método volumétrico 11-19 recomendado por Hart ; Fisher(1991).

f. **pH.-** Se determinó empleando un potenciómetro, de acuerdo a los métodos electroquímicos 2-9 y 4-9 citados por Hart ; Fisher(1991).

g. **Sólidos solubles.-** El contenido en sólidos solubles se determinó por el método S-6a (Lees,1982).

2. **Extracto**

   a. **Minerales.-** Se realizó según lo citado para la materia prima.

   b. **Alcaloides totales.-** Se realizó por el método general de titulación y extracción ácida (A.O.A.C,1975 ; Lock de Ugaz,1988).

   c. **Acidez total.-** Se realizó según lo citado para la materia prima.

   d. **pH.-** Se determinó del mismo modo que la materia prima, pero solamente empleando el método 2-9 (Hart ; Fisher,1991).

   e. **Extracto seco soluble.-** El contenido en extracto seco soluble se determinó por gravimetría, método S-10 (Lees,1982).

   f. **Azúcares reductores y azúcares totales.-** Se evalúo en el extracto concentrado, por espectrofotometría molecular (Maier,1981).

   g. **Densidad y viscosidad.-** La densidad se evaluó con un matraz de densidad (picnómetro), y la viscosidad con el tubo capilar de Cannon-Fenske N°100 (Lewis,1993)

3. **Bebida carbonatada**

   a. **Azúcares reductores y azúcares totales.-** Se evalúo en la bebida previamente desgasificada, por espectrofotometría molecular (Maier,1981).

   b. **Acidez total.-** Se realizó tal como lo citado para la materia prima.

   c. **pH.-** Se realizó por potenciometría, en la bebida liberada de dióxido de carbono por agitación vigorosa (Madrid,1994).

   d. **Sólidos solubles.-** El contenido en sólidos solubles se determinó por refractometría, método 11-15 (Hart; Fisher,1991).

   e. **Volumen de CO_2.-** El contenido en dióxido de carbono disuelto en la bebida se determinó por referencia a las cartas de volumen de gas (en volúmenes Bunse),

definidos como el número de volúmenes de CO_2 (a presión atmosférica y 0°C) que se hallan disueltos por unidad de volumen de líquido utilizando un manómetro de punción con cierre de goma y termómetro (Ranken,1993).

f. **Análisis microbiológico.-** El análisis microbiológico se realizó a la bebida carbonatada luego de 75 días de vida en anaquel. Los análisis efectuados fueron: enumeración de microorganismos aerobios viables mesófilos, enumeración de coliformes totales, enumeración de Streptococcus del grupo D de Lancefield y, enumeración de mohos y levaduras (FAO ; OMS,1981).

E. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se realizó en 4 etapas:

- Estudio de la materia prima.
- Estudio de extracción sólido:líquido de alcaloides.
- Estudio del producto final
- Estudio de formulación de una bebida carbonatada con el extracto obtenido.

1. Estudio de la materia prima

a. Muestreo e identificación

Se tomaron muestras de tallos de *Uncaria tomentosa* colectados del bosque silvestre, para su identificación botánica con el apoyo de un profesional.

b. Preparación de corteza pulverizada

Los tallos frescos fueron sometidos a las operaciones que se describen a continuación para obtener corteza pulverizada de uña de gato. En la Figura 5 se esquematiza el flujo de las operaciones descritas.

(1) Cosecha de cortezas.- Se procedió a cortar los tallos de uña de gato *U. tomentosa*, previo a su identificación. Esta operación se realizó empleando machetes.

(2) Limpieza.- Se eliminó el material adherido en la superficie de los tallo, raspando con un cuchillo de acero inoxidable. Luego se realizaron las medidas biométricas a los tallos limpios.

(3) Descortezado.- Se realizó manualmente, en forma de tiras. Luego se determinaron las medidas biométricas y el contenido en agua de las cortezas frescas.

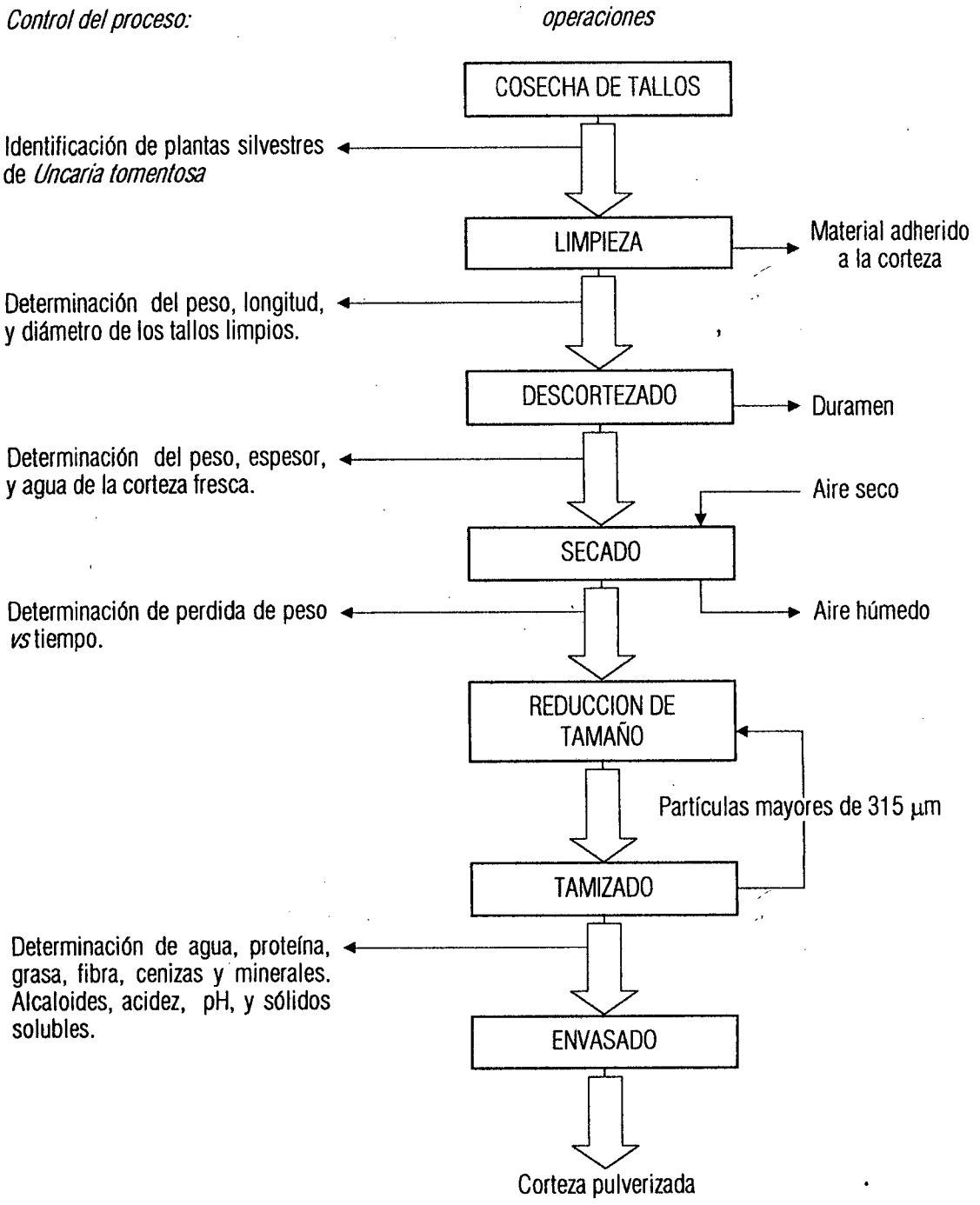


Figura 5: Flujograma de operaciones para obtener corteza pulverizada de uña de gato.

(4) Secado.- Se realizó el secado de cortezas con flujo de aire caliente, utilizando un secador de cabina. Se estimó el tiempo de secado.

(5) Reducción de tamaño.- Se procedió esta operación reduciendo el espesor de la corteza con una tijera podadora, luego con moliendas sucesivas en forma manual y mecánica, utilizando un molino tradicional de tolva alta y un molino de cuchillas respectivamente.

(6) Tamizado.- En esta operación se uniformizaron las partículas molidas empleando un tamiz. Se determinó el contenido en agua de la corteza pulverizada.

(7) Envasado.- La corteza pulverizada se envasó en bolsas de polietileno y se almacenó al ambiente en un lugar fresco y seco.

c. Caracterización físico-química de la corteza

Se realizó el análisis químico proximal, análisis de componentes minerales y físico-químico, siguiendo los métodos ya descritos en métodos de análisis, para caracterizar la materia prima.

2. Estudio de extracción sólido-líquido de alcaloides

Para este estudio se tomó en consideración factores que modifican la velocidad de extracción, tales como: método, temperatura, solvente y pH del medio de extracción. Los métodos de extracción fueron:

M_1 = Relixiviación o percolación fraccionada, a temperatura ambiente.

M_2 = Reflujo o decocción, a temperatura de ebullición del solvente.

M_3 = Continuo (por maceración y luego en Soxhlet), a temperatura de ebullición del solvente.

La naturaleza de los solventes empleados fue según polaridad creciente:

S_1 = Cloroformo, $CHCl_3$, en la extracción a pH alcalino.

S_2 = Cloroformo-etanol, $CHCl_3$-EtOH (9:1), en la extracción a pH alcalino.

S_3 = Etanol, EtOH 96°GL, en la extracción a pH ácido.

S_4 = Agua, H_2O, en la extracción a pH ácido.

En el anexo D se dan las características de los métodos de extracción y en el anexo E se dan los mismos para los solventes utilizados.

a. Espectrofotometría en el análisis de extractos de uña de gato

Se adecuó la manera de medir la concentración del soluto de interés (alcaloides) en la fase líquida (extracto), en función al método y tiempo de extracción, mediante la espectroscopía de absorción molecular, puesto que la absorbancia de una determinada solución es directamente proporcional a la concentración de solutos disueltos en dicha solución. Para este fin, se utilizó la secuencia que se muestra en la Figura 6, realizando extracciones vía ácida (soluciones acuosas y etanólicas de ácido acético al10%) con tiempos de extracción iguales (30 min) y una proporción sólido-líquido (relación S:L = kg de corteza pulverizada : L de solvente = 1 : 25).

Como el indol posee un máximo de absorción entre 243 y 247 ηm (dependiendo de las sustituciones que sufre), se verificó la longitud de onda de máxima absorbancia en la región UV entre 200 a 310 ηm, utilizando el extracto etanólico diluido hasta 100 $\mu g.mL^{-1}$ Así, se logró representar gráficamente la variación de la absortividad molar global del extracto frente a la longitud de onda. Luego se realizaron lecturas en 245 ηm (Laus *et al*, 1994), a los extractos EtOH y H_2O diluyendo a ambos hasta 100, 50, 30, 20 y 10 $\mu g.mL^{-1}$. Así se logró representar gráficamente la ley de Beer y verificar la proporcionalidad entre concentración y absorbancia.

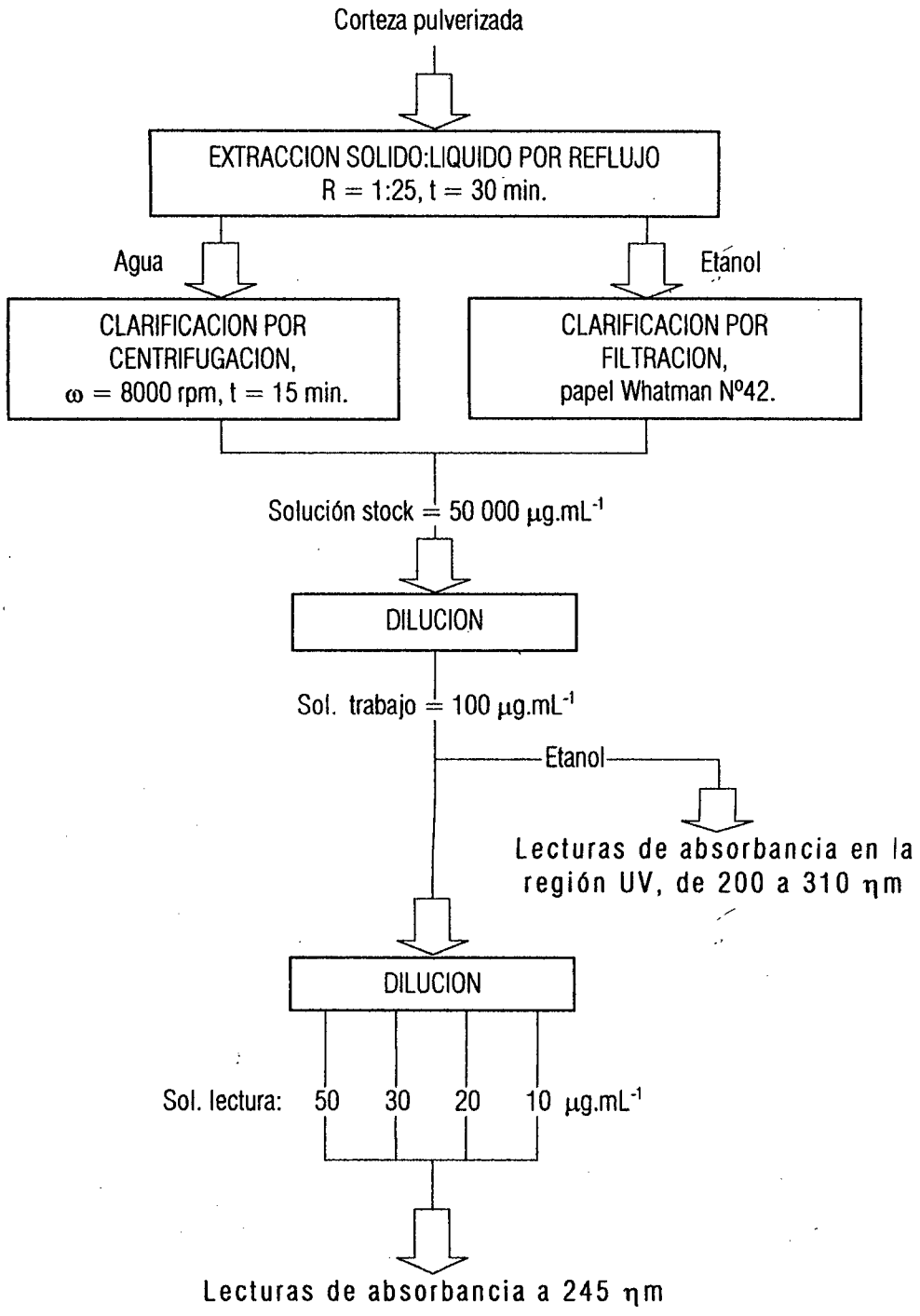


Figura 6: Secuencia utilizada para el estudio de la verificación del método espectrofotométrico en el análisis de extractos de uña de gato.

b. Efecto de la relación sólido:líquido en la extracción por reflujo

Se realizó determinando el rendimiento de extracción en los componentes del extracto (medido por la absorbancia de los solutos a 245 ηm) y el rendimiento en extracto seco soluble (medido por los sólidos totales del extracto, obtenido por evaporación total del solvente). Se utilizaron extractos etanólicos diluidos y las proporciones fueron (kg corteza por L Solvente): 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 y 1:25, tal como se da en la Figura 7.

c. Efecto del tiempo de extracción para los métodos reflujo y maceración-Soxhlet

Se realizó evaluando la velocidad de extracción de los componentes del extracto (absorbancia a 245 ηm). Los tiempos de extracción fueron: 10,20,30,40,50,60 min para reflujo y 2,3,4,5,6,7 h para maceración-Soxhlet. La corteza pulverizada de uña de gato previamente fue desengrasada con hexano. En las extracciones en medio alcalino, la corteza pulverizada se humedeció con solución de NH_4OH al 10%, y luego se trataron con los solventes orgánicos: $CHCl_3$, $CHCl_3$-EtOH(9:1). En las extracciones en medio ácido, los solventes H_2O y EtOH 96°GL, fueron acidulados con CH_3COOH (soluciones al 10%). La secuencia utilizada para este estudio se detalla en la Figura 8.

d. Rendimiento de extracción en alcaloides totales

Se realizó la extracción de la corteza pulverizada y desengrasada con benceno, empleando los métodos, solventes y tiempos obtenidos en la etapa anterior. En el método relixiviación (24 h. de maceración y 24 h. de percolación) se utilizó una relación S:L = 1:10 y en el método continuo se utilizó una relación S:L = 1:25. El procedimiento para las extracciones en medio ácido y alcalino también es la misma que de la etapa anterior. En la Figura 9 se detalla la secuencia utilizada.

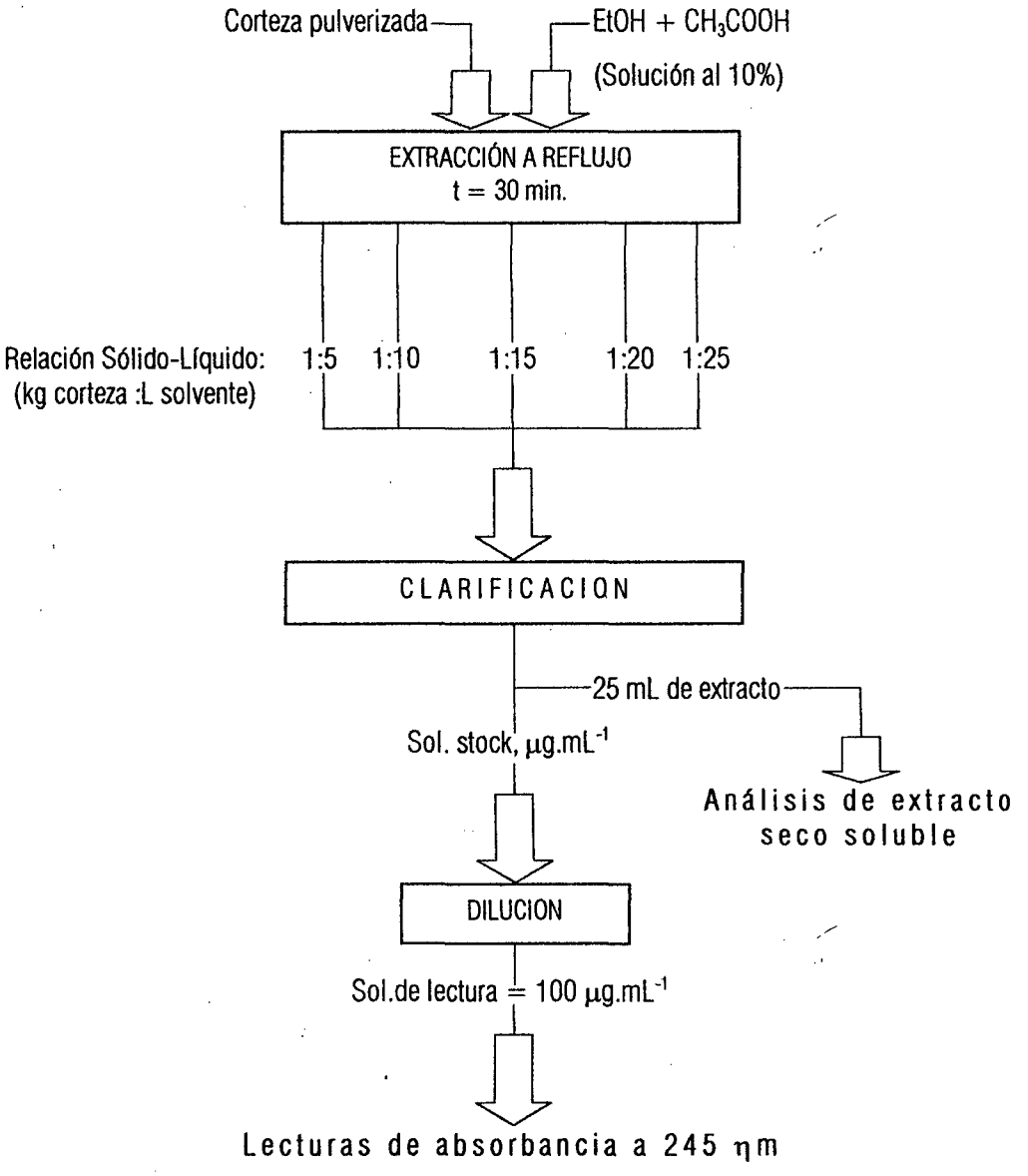


Figura 7: Secuencia utilizada para el estudio de la relación sólido:líquido (kg corteza por L solvente) en la extracción a reflujo.

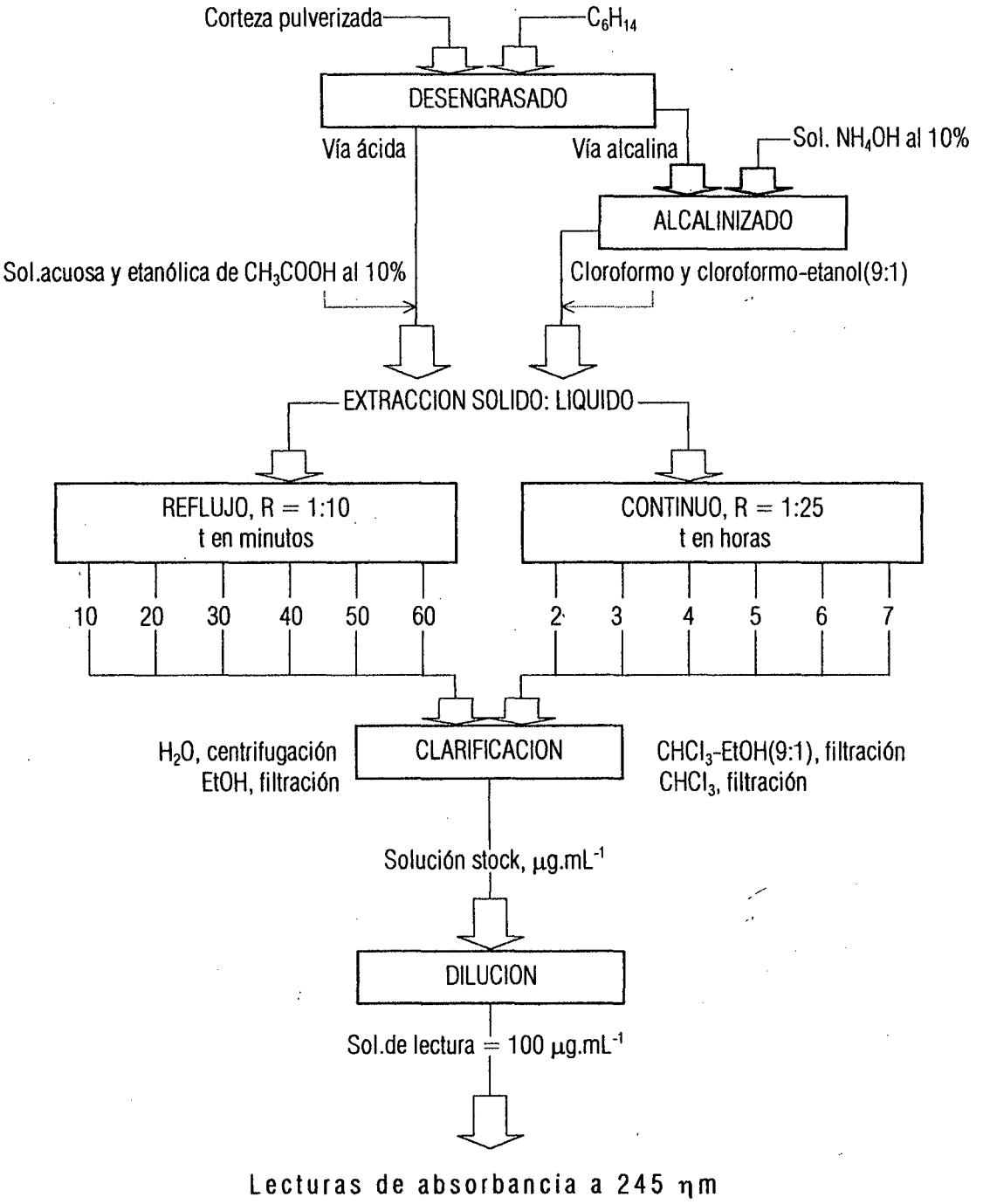


Figura 8: Secuencia utilizada para el estudio del tiempo de extracción para los métodos reflujo y maceración-Soxhlet.

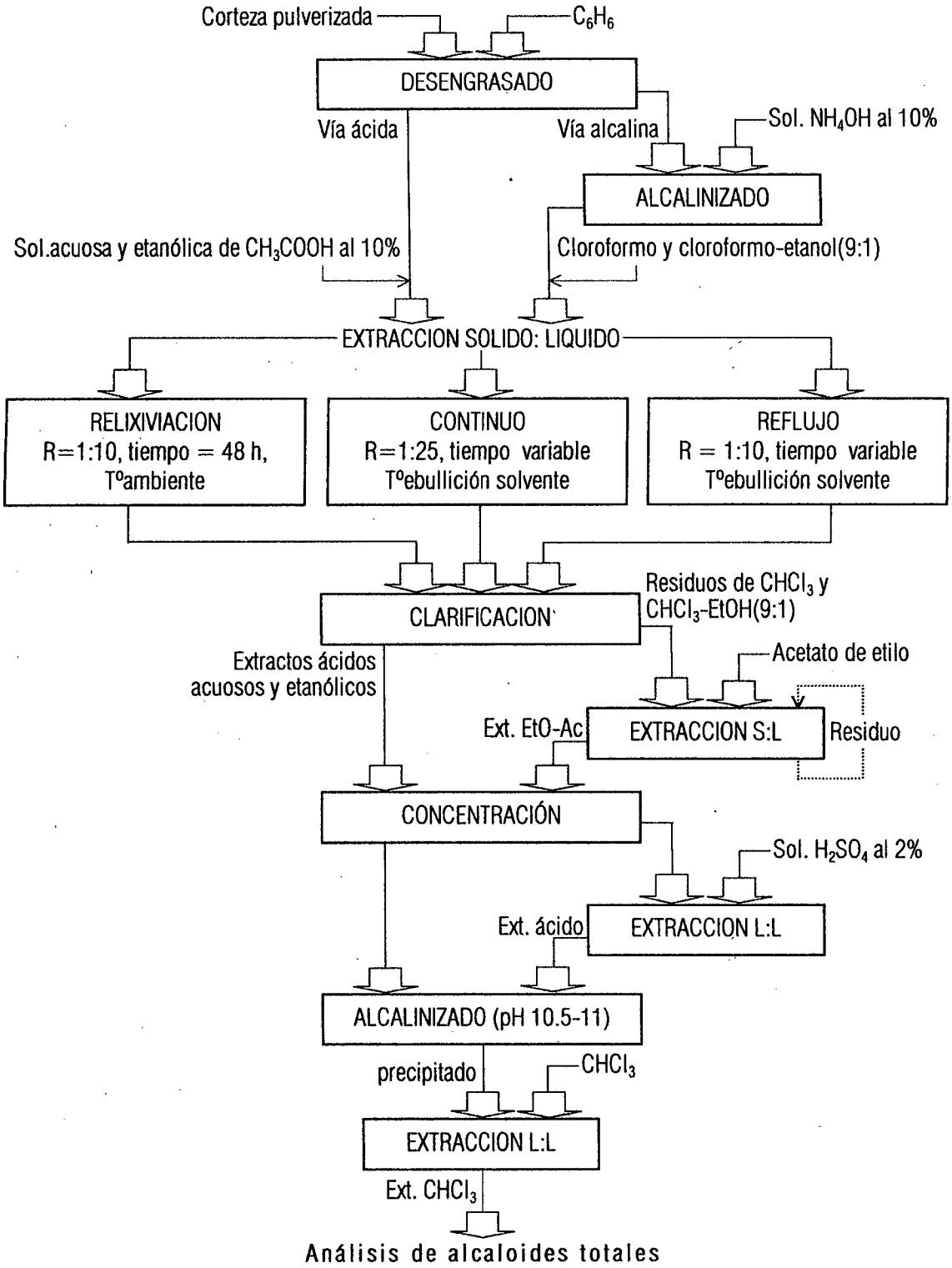


Figura 9: Secuencia utilizada para el estudio del rendimiento de extracción en alcaloides totales (S:L=Sólido:líquido; L:L=Líquido:líquido).

3. Estudio del producto final

a. Ensayos preliminares para obtener el extracto

Del estudio de extracción sólido:líquido de alcaloides se procedió a elaborar el extracto de uña de gato, realizando previos ensayos en cada operación unitaria. En la Figura 10 se esquematiza el flujo de las operaciones descritas.

- **(1) Extracción de la corteza pulverizada.-** Esta operación se realizó tomando como criterio de evaluación: elevada selectividad en función a alcaloides totales, máximo rendimiento en extracto seco soluble, caudal elevado y elevada concentración del extracto.

(2) Clarificación del extracto.- Se clarificó el extracto por decantación, filtración al vacío por papel Whattman N°42 o, por centrifugación, dependiendo del método y solvente de extracción. Se determinó el contenido de extracto seco soluble y la densidad del clarificado.

(3) Extracción del residuo.- Se realizaron ensayos de extracción sólido-líquido al residuo obtenido de la primera extracción, empleando diferentes proporciones de relación sólido-líquido. Se determinó el extracto seco solubles *vs* relación S:L.

(4) Concentración del extracto.- Se realizó por destilación a presión reducida, empleando un equipo de destilación simple conectado a una bomba de vacío y un plato de calentamiento, con agitador. Luego se concentró por evaporación. Se determinó el extracto seco soluble *vs* número de veces de concentración, para estimar el volumen adecuado del extracto final.

(5) Envasado.- El concentrado se envasó en forma manual en frascos ámbar para su caracterización, evaluación en almacenamiento y aplicación.

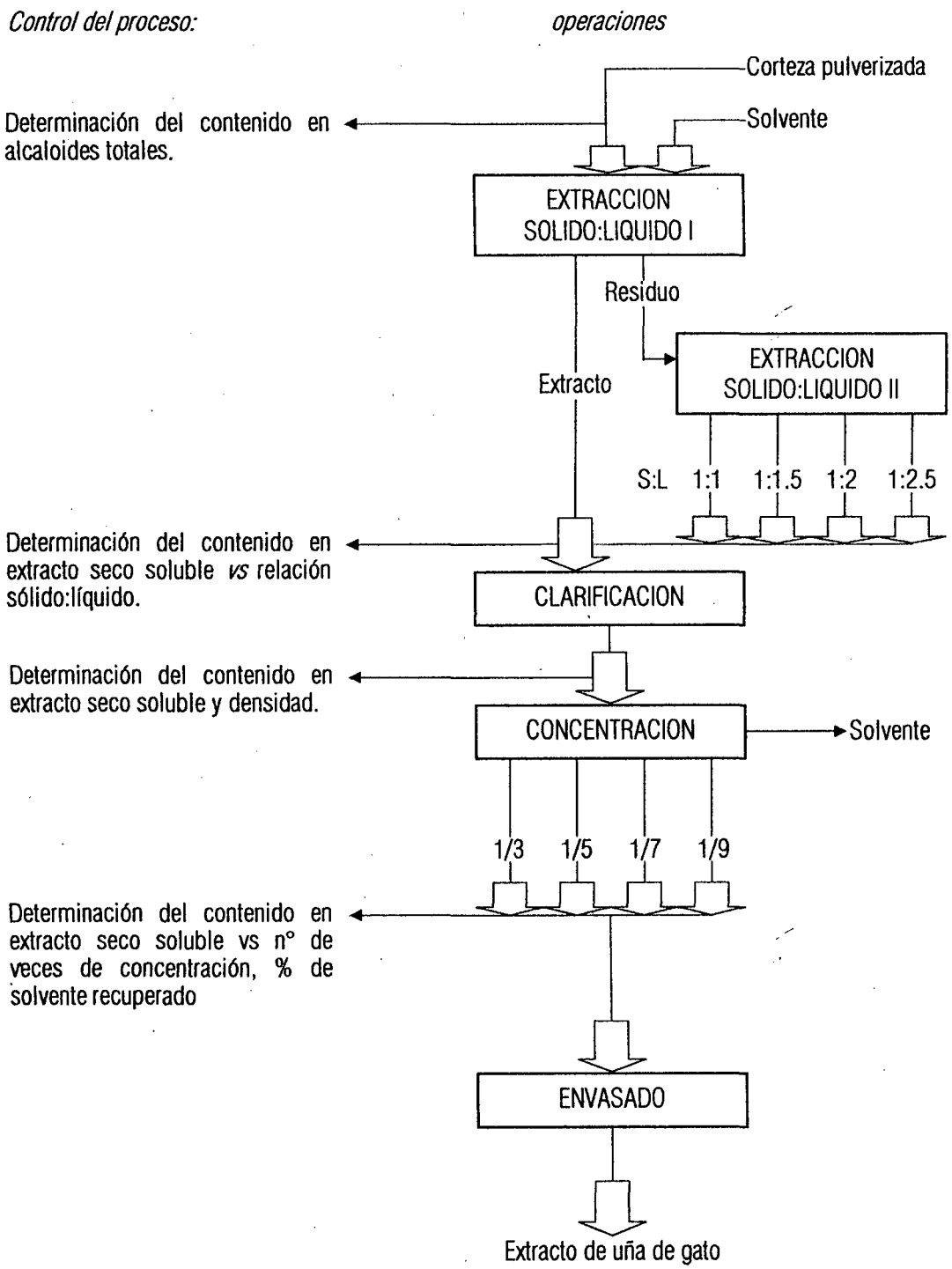


Figura 10: Flujograma de operaciones para obtener extracto de uña de gato.

b. Caracterización físico-química del extracto

Se realizaron los análisis siguiendo los métodos ya descritos en métodos de análisis para caracterizar el extracto.

c. Evaluación en almacenamiento

Se determinó la variación en el contenido de alcaloides totales, acidez total, pH y extracto seco soluble, durante los 60 días de vida en almacenamiento a temperatura ambiente, con intervalos de 15 días.

4. Aplicación del extracto en la formulación de una bebida carbonatada

En este estudio se consideró los factores: dosis de extracto y grado de dulzor, siendo los niveles escogidos, función de las modificaciones organolépticas que se presentó en la bebida.

Los niveles de dosis de extracto en la bebida (D), fueron:

$D_1 = 0.05\%$

$D_2 = 0.10\%$

$D_3 = 0.15\%$

Estas dosis equivalen en una botella de 285 ml. de capacidad a 142.5, 285.0 y 427.5 μL de extracto respectivamente.

Los niveles de dulzor en el jarabe simple (B), fueron:

$B_1 = 54°Brix$

$B_2 = 56°Brix$

$B_3 = 58°Brix$

Estos grados de dulzor en el jarabe simple, corresponden en las bebidas a: 10.7, 11.1 y

11.5°Brix respectivamente, cuando se diluyen con agua carbonatada.

a. Preparación de bebida carbonatada

Se elaboró 3 tipos de bebida carbonatada:

Bebida 1.- Se utilizó los siguientes insumos para formular el jarabe terminado: color caramelo, sabor "Pepsi-cola" y extracto de uña de gato. Esto se realizó para los 9 tratamientos (de la interacción de 3 niveles de dulzor y 3 niveles de dosis de extracto).

Bebida 2.- Consistió en utilizar solamente colorante caramelo y extracto de uña de gato (3 niveles de dosis), con un nivel de dulzor (B_1=54°Brix).

Bebida 3.- Se preparó empleando como único aditivo al extracto de uña de gato (3 niveles de dosis), con un nivel de dulzor (B_1=54°Brix).

Las operaciones realizadas se describen a continuación y el flujo seguido se esquematiza en la Figura 11.

(1) Preparación de jarabe simple.- Se realizó esta operación mezclando agua purificada en un desionizador y azúcar refinada, con agitación y calor para eliminar la posible contaminación microbiana del azúcar empleado. Seguidamente se filtró al vacío y se dejó enfriar.

(2) Preparación de jarabe terminado.- Se realizó adicionando al jarabe simple enfriado, los insumos: colorante, saborizante y agua (este último para enjuagar los restos de colorante y saborizante adheridos en los recipientes de medición), y finalmente, el extracto de uña de gato. Durante la mezcla la agitación debe ser permanente. Se dejó reposar durante 24 h. a temperatura de refrigeración.

(3) Mezclado-llenado.- Esta operación se realizó enfriando previamente el jarabe terminado y el agua carbonatada "San Luis". Luego se mezclaron en una proporción

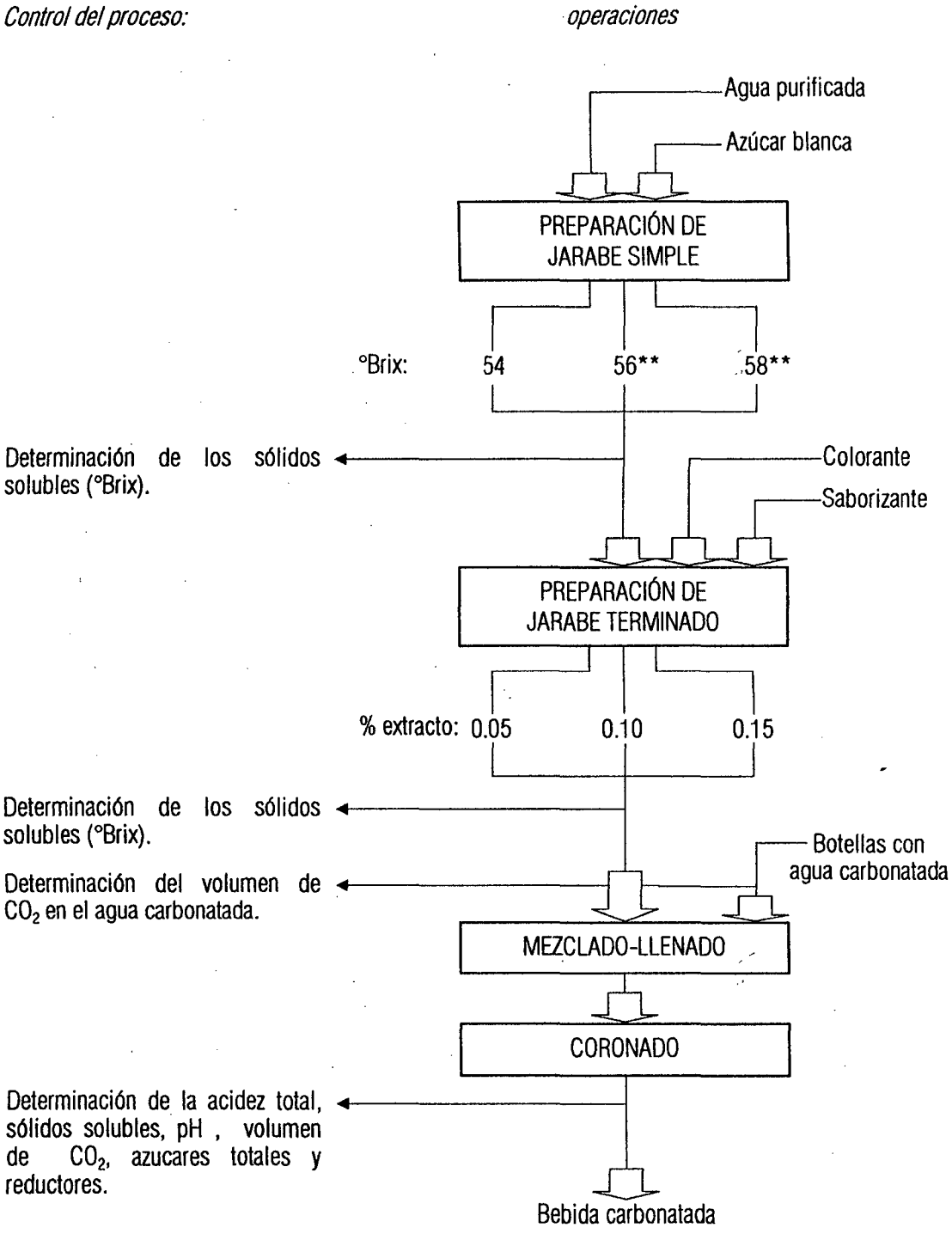


Figura 11: Flujograma de operaciones para obtener bebida carbonatada empleando extracto de uña de gato (** Solo para la bebida tipo 1).

en volumen+volumen de 1+5 respectivamente.

En esta operación se dio simultáneamente el llenado, quitando a la botella con agua carbonatada la sexta parte de su volumen, que corresponde al jarabe terminado adicionado.

(4) Coronado.- Seguidamente se procedió a coronar las botellas empleando chapas esterilizadas y un coronador manual.

b. Evaluación sensorial

Las bebidas preparadas fueron evaluadas sensorialmente (atributo sabor), por jueces familiarizados con el producto. Se utilizó el método afectivo: Prueba del nivel de agrado ("Hedonic Test"), citado por Pedrero(1992) y con las siguientes escalas estructuradas:

Escala hedónica	*Escore*
Gusta mucho	7
Gusta moderadamente	6
Gusta un poco	5
Me es indiferente	4
Disgusta un poco	3
Disgusta moderadamente	2
Disgusta mucho	1

Escala hedónica	*Escore*
Gusta mucho	5
Gusta un poco	4
Me es indiferente	3
Disgusta un poco	2
Disgusta mucho	1

En las bebidas tipo 1 (9 tratamientos), se utilizó la escala con 7 puntos, y en las bebidas tipo 2 y 3 (3 tratamientos cada uno), se utilizaron las escalas con 5 puntos.

c. Caracterización físico-químico de la bebida

Se realizaron los análisis siguiendo los métodos ya descritos en métodos de análisis para caracterizar la bebida.

F. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Extracción sólido-líquido de alcaloides

En esta primera etapa del estudio se evaluó una adecuada extracción sólido:líquido de los componentes alcaloídicos de la corteza pulverizada. En la Figura 12 se detalla el diseño experimental de esta primera etapa del estudio.

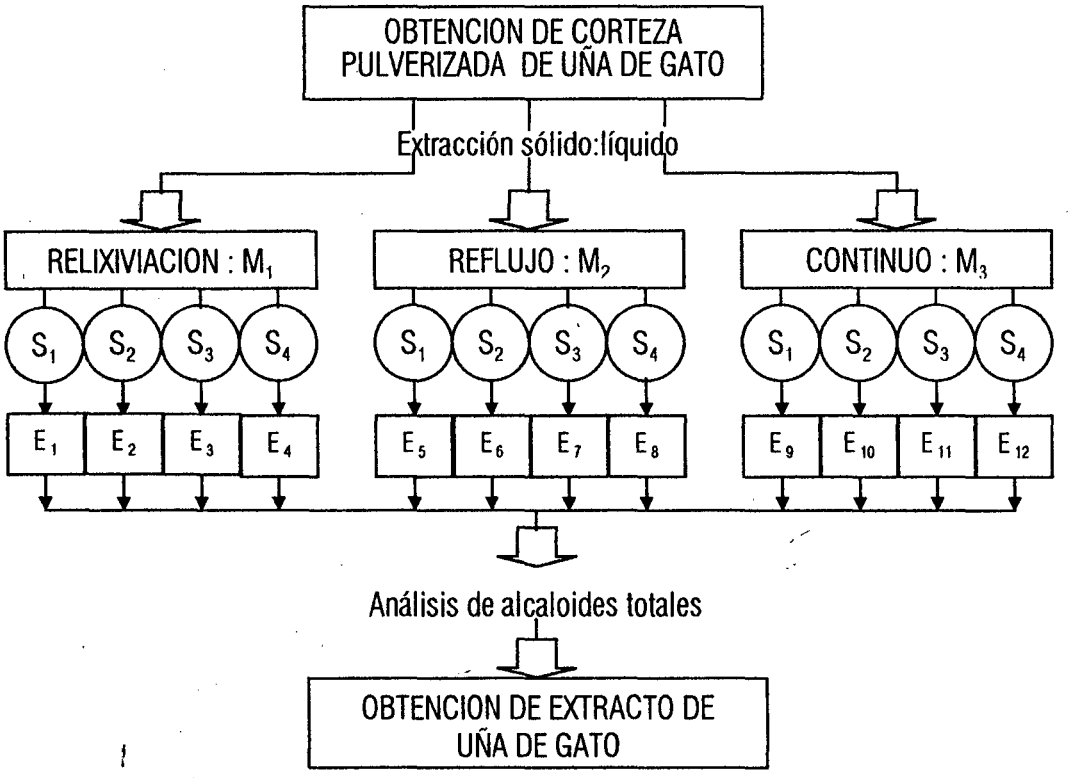


Figura 12: Diseño experimental para la extracción de alcaloides de cortezas de uña de gato.

Leyenda:

M_1 = Método de relixiviación o percolación fraccionada.
M_2 = Método de reflujo o decocción.
M_3 = Método de Soxhlet o continuo.
S_1 = Cloroformo, $CHCl_3$
S_2 = Cloroformo: etanol, $CHCl_3$:EtOH(9:1)
S_3 = Etanol, EtOH 96°GL
S_4 = Agua, H_2O
$E_{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12}$ = Extractos de uña de gato.

2. Formulación de la bebida carbonatada con el extracto obtenido

En esta segunda etapa se evaluó la adecuada formulación de una bebida carbonatada de cola.

En la Figura 13 se detalla el diseño experimental de esta segunda etapa del estudio.

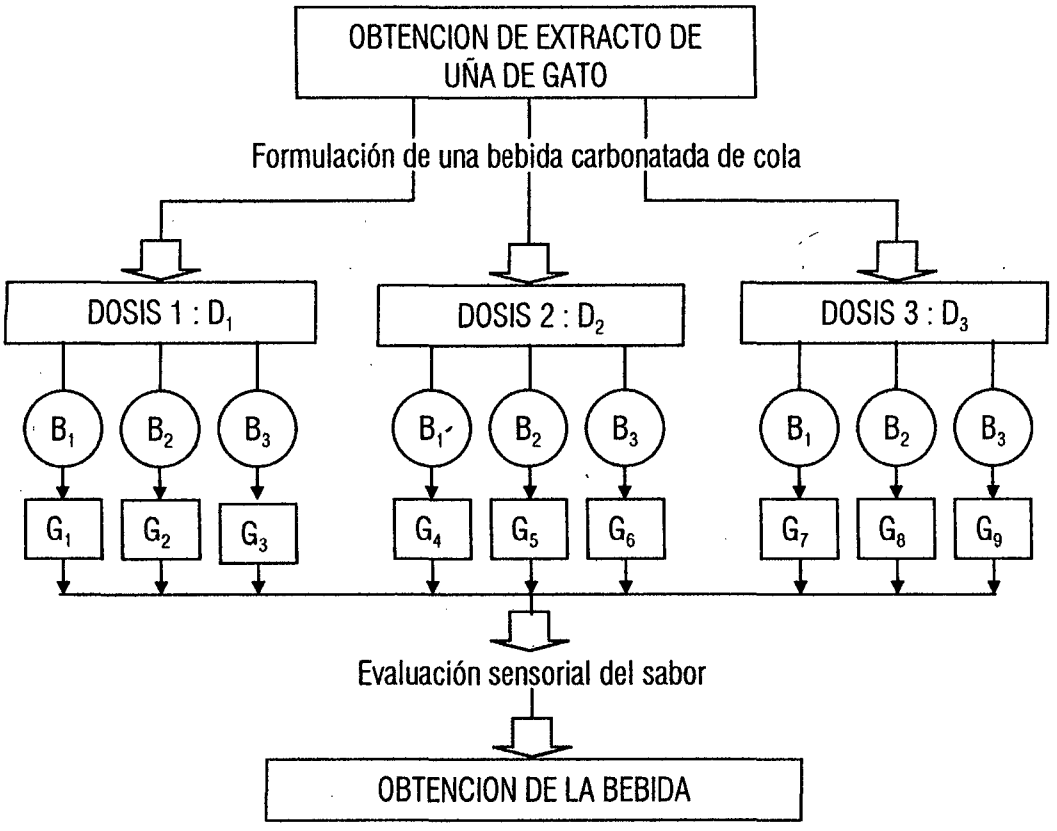


Figura 13: Diseño experimental para el estudio de la obtención de una bebida carbonatada utilizando extracto de uña de gato.

Leyenda:

D_1 = Nivel 1 de dosis de extracto en la bebida (0.05% en v/v).
D_2 = Nivel 2 de dosis de extracto en la bebida (0.10% en v/v).
D_3 = Nivel 3 de dosis de extracto en la bebida (0.15% en v/v).
B_1 = Nivel 1 de dulzor en el jarabe simple (54°Brix).
B_2 = Nivel 2 de dulzor en el jarabe simple (56°Brix).
B_3 = Nivel 3 de dulzor en el jarabe simple 3 (58°Brix).
$G_{1,2,3,4,5,6,7,8,9}$ = Bebidas carbonatadas.

G. ANALISIS ESTADISTICO

1. Extracción sólido-líquido de alcaloides

Los datos del contenido en alcaloides totales de los 12 extractos de uña de gato se analizaron en un D.C.A. con arreglo factorial 3*4 con 2 repeticiones. Se utilizó el análisis de varianza paramétrica de Fisher(prueba de F). Para los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey con $p<0.05$ (Reyes,1995).

2. Formulación de la bebida carbonatada con el extracto obtenido

Los datos obtenidos en la evaluación sensorial (obtenidos al transformar la escala estructurada en números), se analizaron utilizando un D.C.A. con 12 repeticiones (jueces), mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Dunn con $p<0.05$ (Wayne,1989).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A. MATERIA PRIMA

Los tallos de uña de gato *Uncaria tomentosa* variedad marrón dorado se cosecharon en diciembre de 1997. Se realizaron las medidas biométricas a los tallos frescos, cuyas características se detallan en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Medidas biométricas de tallos y cortezas frescas de *Uncaria tomentosa* [1]

Características	Tallo	Corteza	*unidades*
Longitud	60.910 ± 8.710	60.910 ± 8.710	cm
Diámetro	5.970 ± 0.520	-	cm
Espesor	-	0.690 ± 0.090	cm
Peso	1.331 ± 0.292	0.492 ± 0.107	kg

[1] Estos valores reportan el promedio ± desviación estándar, n=10

Los valores del Cuadro 10 dependen en gran medida de la edad de la planta. Los tallos jóvenes poseen el duramen (fibra leñosa) más delgado que los tallos adultos, debido a que con el transcurso de los años se forman anillos de crecimiento en la planta, desde la médula hacia la corteza, acumulándose en el xilema, para así proporcionar sostén a las hojas y flores (Stevenson; Mertens,1990).

Las cortezas frescas de uña de gato con un contenido promedio en agua de 66.48%, fueron secadas con flujo de aire caliente (a velocidad constante), a una temperatura comprendida entre 65-70°C. La correlación entre la perdida de agua con respecto al tiempo de secado se brinda en el Cuadro 11.

Cuadro 11: Pérdida de agua en cortezas frescas de *Uncaria tomentosa*, secadas a 65-70°C.

Tiempo de secado h.	Peso de cortezas g.	Perdida de agua %
0.0	4 753	00.00
0.5	3 164	33.43
1.0	2 431	48.85
1.5	2 325	51.08
2.0	2 216	53.38
3.0	2 001	57.90
4.0	1 804	62.05
5.0	1 601	66.32
6.0	1 596	66.42

Con estos datos se realizó el gráfico de la Figura 14, para estimar el tiempo de secado. Mediante regresión múltiple se obtuvo la línea de tendencia con un coeficiente de correlación de 99.91% y una ecuación polinomial de orden 6.

Luego, las cortezas secas fueron reducidas mediante moliendas sucesivas en forma manual y mecánica, y finalmente tamizadas, para obtener partículas de 315 μm de tamaño con un contenido promedio en agua de 9.60%.

Así, se pudo estimar un tiempo de 4.16 h. para obtener una de pérdida de agua de 62.92%, lo que equivale, según las condiciones de secado mencionadas anteriormente, a obtener corteza pulverizada con un contenido en agua de 9.60%.

Se realizó la composición química proximal cuyos componentes se dan en el Cuadro 12. La determinación de componentes minerales se da en el Cuadro 13, y la composición físico-química se detalla en el Cuadro 14.

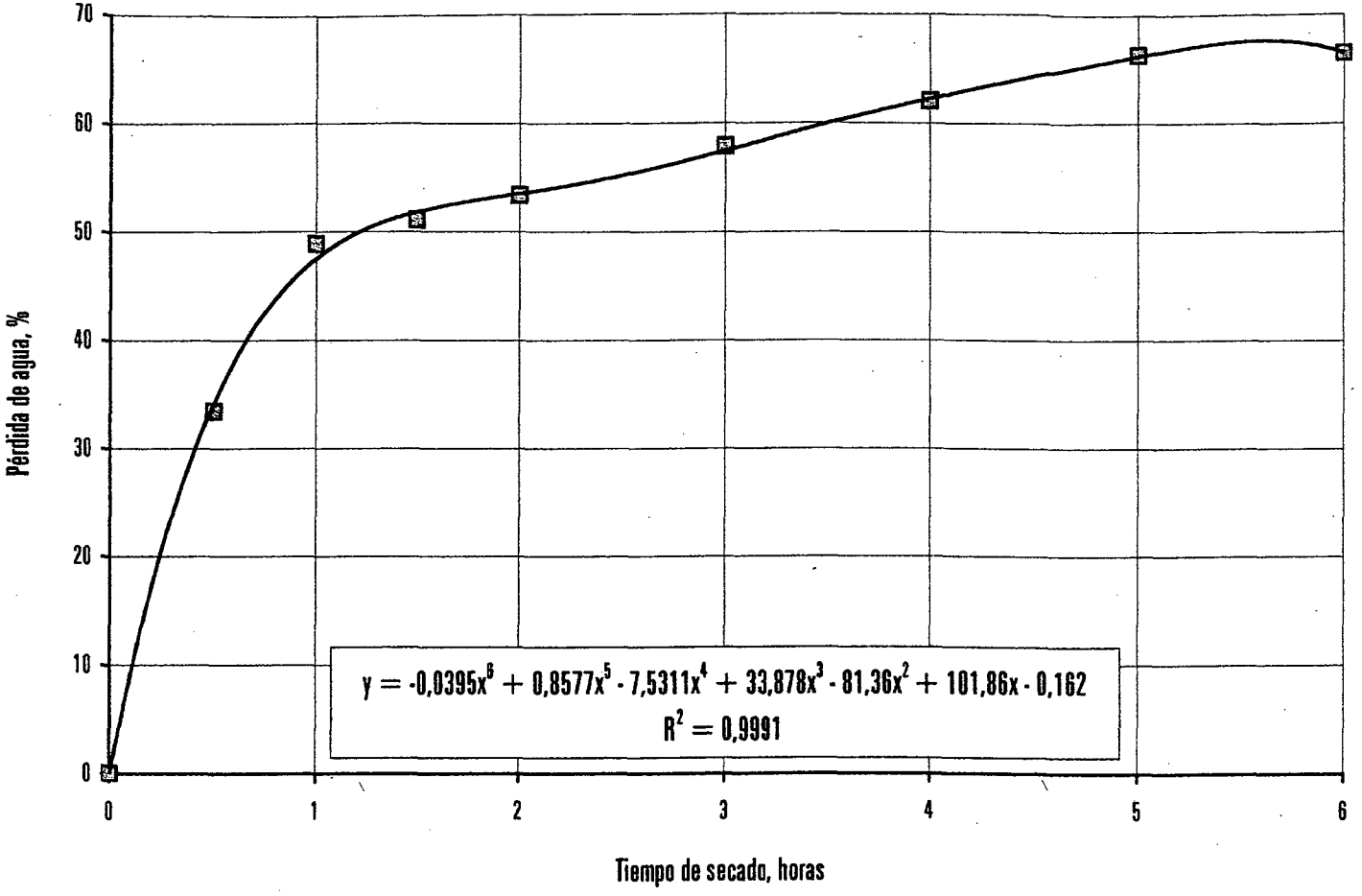


Figura 14: Gráfico de pérdida de agua de cortezas frescas de uña de gato, a 65-70°C.

Cuadro 12: Composición química proximal de la corteza del tallo de *Uncaria tomentosa*. [1]

Componentes	[ ], %	
	Corteza fresca	Corteza seca
Agua	66.48	0.00
Cenizas totales	1.86	5.55
Proteína bruta	2.26	6.74
Grasa bruta	0.46	1.37
Fibra bruta	16.77	50.03
Carbohidratos	12.17	36.31

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

El Cuadro 12 muestra el alto contenido en fibra bruta y carbohidratos totales que contiene la corteza de uña de gato. Esto se debe a la naturaleza protectora y de reserva que se forma en las cortezas de las plantas (celulosa, hemicelulosa y lignina). En el grupo de compuestos denominados genéricamente carbohidratos, muchos son metabolitos secundarios glicosilados, existiendo en la naturaleza un número impresionante, ya que aumentan la solubilidad de las agliconas en agua y disminuyen su reactividad química (Robinson,1991).

La proteína bruta que se reporta en la corteza se debe a las proteínas globulares (enzimas, ciertas hormonas, etc.), ácidos nucleicos y compuestos nitrogenados, que cumplen importantes funciones biológicas en todo ser vivo. (Bohinski,1991).

El contenido en grasa bruta es atribuido a lípidos derivados, entre ellos, esteroides y triterpenos, que posee dicha planta. (Senatore *et al*, 1992 y Aquino *et al*, 1990).

Según Bohinski(1991), estos lípidos derivados participan en las biomembranas (20 a 80%), confiriendo rigidez a ésta, ya que poseen una estructura de anillo fusionado y no son tan flexibles

como una cadena alifática.

Los valores del Cuadro 13 se obtuvieron luego de realizar las diluciones necesarias para obtener concentraciones dentro del rango de trabajo calibrado.

Cuadro 13: Componentes minerales de la corteza del tallo de *Uncaria tomentosa* [1]

Elemento	[ ], $\mu g.g^{-1}$	
	Corteza fresca	Corteza seca
Ca^{2+}	10 643.7	31 753.3
Mg^{2+}	138.8	414.2
Na^{+}	61.7	184.1
Cu^{2+}	3.7	10.9
Fe^{2+}	334.4	997.6
Mn^{2+}	3.6	10.6
K^{+}	1 635.1	4 878.1
Zn^{2+}	9.7	28.8

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

Se aprecia un alto contenido en Ca^{2+} y K^{+}, seguido de Fe^{2+} y, en menores proporciones se encuentran Mg^{2+} y Na^{+} respectivamente.

El criterio de analizar los minerales fue por la importancia que tienen, debido a que actúan como cofactores inorgánicos en las enzimas y ciertas proteínas especializadas. Se sabe que algunos enzimas requieren 2 a 3 cofactores diferentes y por lo general uno de ellos es un ion inorgánico. (Bohinski,1991).

El criterio de microelementos esenciales es importante conocer para estimar su aporte en función al consumo diario recomendado para los mismos (Paredes,1993).

Cuadro 14: Composición físico-química de la corteza del tallo de *Uncaria tomentosa*. [1]

Componentes	Corteza fresca	Corteza seca	*unidades*
Alcaloides totales [2]	3.4	12.82	$mg.g^{-1}$
Acidez total	0.028	0.085	$miliequiv.NaOH.g^{-1}$
Sólidos solubles	1.18	3.52	%
Sólidos insolubles	10.06	30	%
pH a 25°C		4.75	

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.
[2] Estos valores reportan el promedio de 2 repeticiones.

El contenido en alcaloides totales ($mg.g^{-1}$, base seca) es 12.82, estando dicho valor en el rango encontrado por Laus ; Keplinger(1994), que fue de 0.36 a 38.30 $mg.g^{-1}$. El factor que más influye sobre este valor es la estación en que se cosecharon las cortezas para este estudio. Esta demostrado que esta especie no produce en forma constante un modelo uniforme de constituyentes alcaloídicos, los que están sujetos a cambios con el transcurso de los años. Laus; Keplinger(1994) y Laus *et al* (1997).

Uncaria tomentosa (Willd) D.C. se encuentra en la naturaleza como 2 variantes químicas, según su composición en alcaloides, esto, debido a influencias del medio ambiente que aun son desconocidas (tales como: luz, temperatura, nutrientes, infestación de hongos), los que procurarían el desarrollo de distintas características (tales como: color de las flores, forma de las hojas, componentes/ingredientes), sin la alteración de los factores hereditarios (Reinhard,1997). La acidez de la corteza se atribuye a los ácidos orgánicos identificados hasta la fecha (los ácidos quinóvico, ursólico y oleanólico, y 3 triterpenos polihidroxilados de carácter ácido) (Aquino *et al*, 1990 ; Aquino *et al*,1991).

Se aprecia un bajo contenido en sólidos solubles en agua. Esau(1959), menciona que las cortezas de las plantas poseen sustancias orgánicas solubles como los taninos y ciertas drogas; además, sus fibras, así como sus gomas y resinas, requieren hidrólisis para su solubilidad.

El valor del pH indica la presencia de biomoléculas orgánicas de la corteza en forma iónica, en el macerado acuoso analizado (drogas solubles y disociadas).

B. EXTRACCION SOLIDO-LIQUIDO DE ALCALOIDES

1. Espectrofotometría en el análisis de extractos de uña de gato

La comprobación de la longitud de onda de máxima absorbancia, λ_{max} en 245 ηm realizando un barrido en la región ultravioleta (UV) desde 200 a 310 ηm se muestra en el Cuadro 15 y con estos valores se construyo el gráfico de la Figura 15.

Cuadro 15: Verificación de la longitud de onda, λ de máxima absorbancia [1]

λ(ηm)	A	λ(ηm)	A	λ(ηm)	A
200	0.138	230	0.072	270	0.116
205	0.146	235	0.057	275	0.119
210	0.104	240	0.108	280	0.119
215	0.079	245	0.207	285	0.111
220	0.160	250	0.175	290	0.093
222	0.173	255	0.149	300	0.049
223	0.173	260	0.130	305	0.024
225	0.160	265	0.120	310	0.062

[1] Valores obtenidos del extracto EtOH-CH_3COOH de [ ]=100 $\mu g.ml^{-1}$, a reflujo por 30 min, relación S:L=1:25

El indol, de naturaleza aromática, está presente en las moléculas de los alcaloides de *Uncaria tomentosa*, y posee una variación estructural en C-2 con un grupo carbonilo (en los alcaloides oxindólicos) y, en C-7 con un heterociclo de 5 miembros. Esto hace que tales compuestos absorban radiación UV, con λ_{max} en 245 ηm. Las proteínas absorben radiación UV, por los aminoácidos triptófano y tirosina, y los ácidos nucleicos por las bases nitrogenadas, todas de naturaleza aromática (Lock de Ugaz,1988 ; Bohinski,1991).

Laus ; Keplinger(1994) reportan que la absorción máxima de los alcaloides de *U. tomentosa*

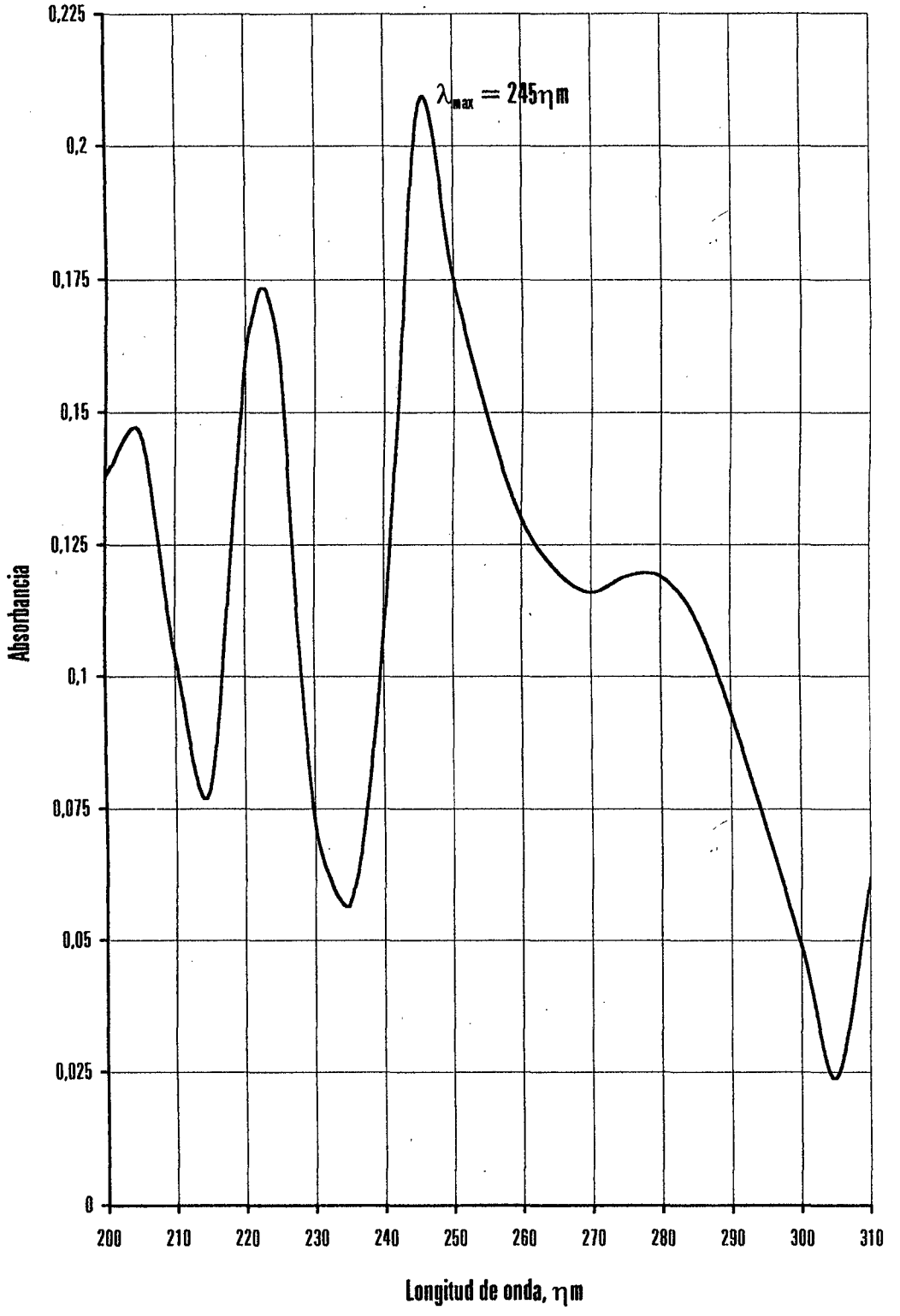


Figura 15: Gráfico del espectro UV de un extracto etanólico ácido (EtOH-CH_3COOH) de uña de gato.

está entre 243 y 247 ηm, de allí que ellos proponen usar $\lambda_{max} = 245$ ηm.

El estudio de la proporcionalidad entre concentración de un extracto y sus correspondientes valores de absorbancia se detalla en el Cuadro 16.

Cuadro 16: Relación entre concentración y absorbancia en extractos de *U. tomentosa*[1].

Extractos, μg.mL^{-1}	Absorbancia a 245 ηm	
	H_2O	EtOH
0	0.000	0.000
10	0.045	0.058
20	0.056	0.095
30	0.075	0.139
50	0.100	0.197
100	0.199	0.290

[1] Valores obtenidos de extracciones en medio ácido, a reflujo por 30 min, R = 1.25.

Con estos datos se construyó los gráficos de las Figuras 16 y 17, para los extractos acuosos y etanólicos respectivamente. En ambos gráficos se observan coeficientes de correlación R^2 elevados (0.9880 y 0.9493 para los extractos acuosos y etanólicos respectivamente). Así se comprobó la ley de Beer, el cual afirma para este caso que existe una proporcionalidad de 98.80% y 94.93% para los extractos acuosos y etanólicos respectivamente, entre el grado de absorción de luz y la concentración de las sustancias absorbentes.

2. Relación sólido:líquido en la extracción a reflujo

En el Cuadro 17 se muestran los valores de absorbancia y el contenido en extracto seco soluble, según la relación sólido-líquido : corteza pulverizada-solvente.

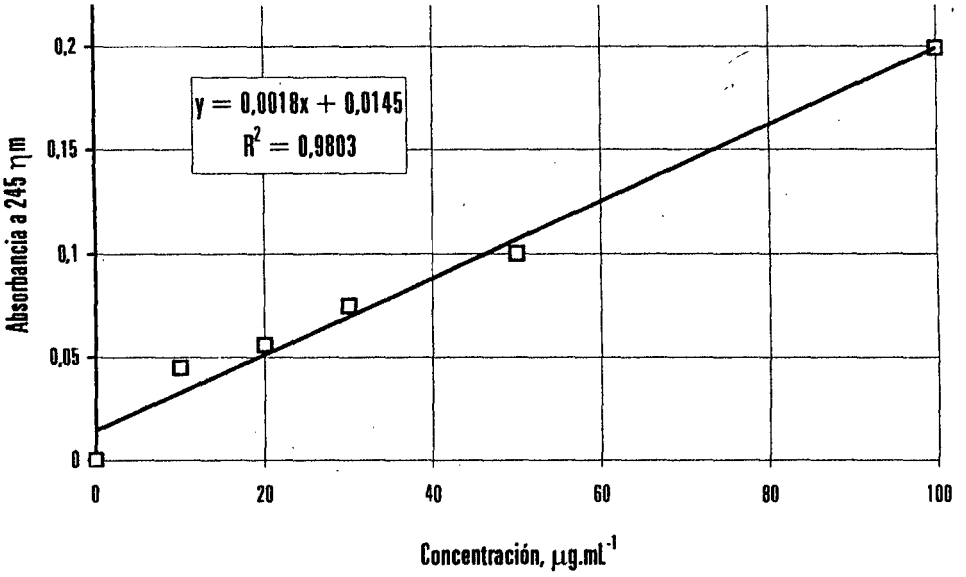


Figura 16: Gráfico de relación entre absorbancia y concentración de extractos acuosos de uña de gato.

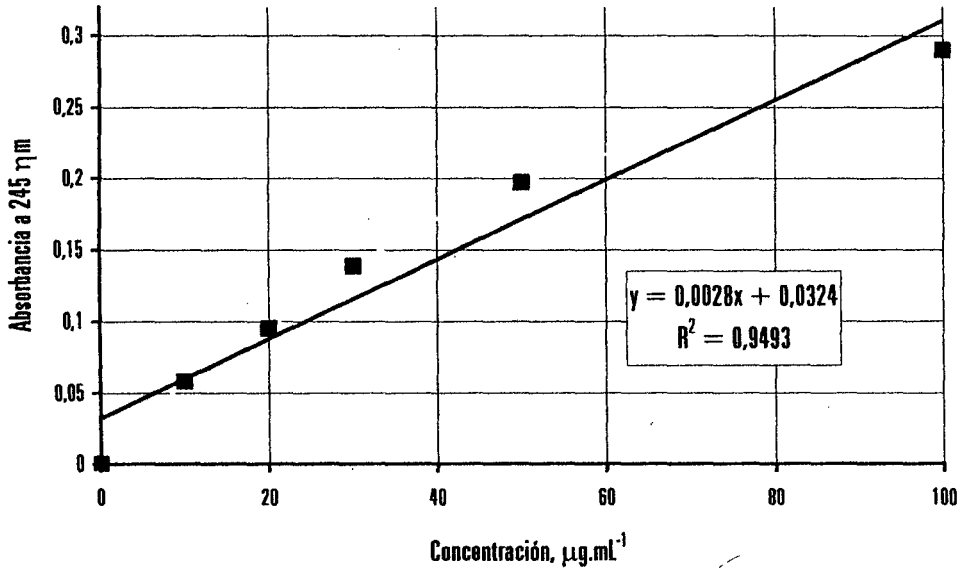


Figura 17: Gráfico de relación entre absorbancia y concentración de extractos etanólicos de uña de gato.

Cuadro 17: Relación sólido-líquido (kg corteza : L solvente) en la extracción a reflujo [1]

Relación sólido:líquido	Absorbancia a 245 ηm	Extracto seco soluble g.100mL^{-1}
1:05	0.139	1.988
1:10	0.162	1.315
1:15	0.178	0.823
1:20	0.189	0.591
1:25	0.193	0.508

[1] Valores obtenidos de extractos EtOH-CH_3COOH de [ ] = 100 μg.ml^{-1}, a reflujo.

Con estos valores se construyó los gráficos de las Figuras 18 y 19. Se observa que existe proporcionalidad entre la relación sólido:líquido y la absorbancia de los extractos en 245 ηm. La absorbancia, mide de modo grosero el rendimiento de extracción de los alcaloides, y puede notarse que su ascenso es no significativo a medida que se incrementa la relación sólido:líquido. Esto demuestra que la extracción se realiza más rápida cuanto más solvente se emplea.

Por el contrario, se observa una proporción inversa entre la relación S:L y el contenido en extracto seco soluble.

En la Figura 18 se aprecia que no existe diferencia numérica en los valores de absorbancia para las proporciones 1:20 y 1:25, y en la Figura 19, se observa que los extractos son tanto más diluidos (menor contenido de extracto seco soluble) a partir de la relación 1:15.

Esto conlleva a un compromiso entre rendimiento de extracción y economía (Mafart,1994), lo que sugiere utilizar la proporción 1:10.

El I.N.D.A., elabora extracto acuoso en polvo de uña de gato (mediante el secado por aspersión), y utiliza una relación S:L=1:12 para la lixiviación.

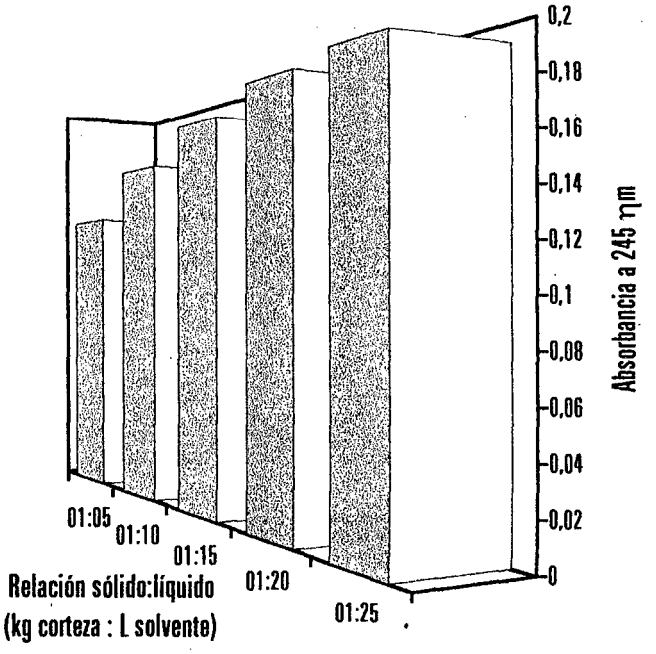


Figura 18: Gráfico de relación sólido:líquido vs absorbancia en la extracción por reflujo.

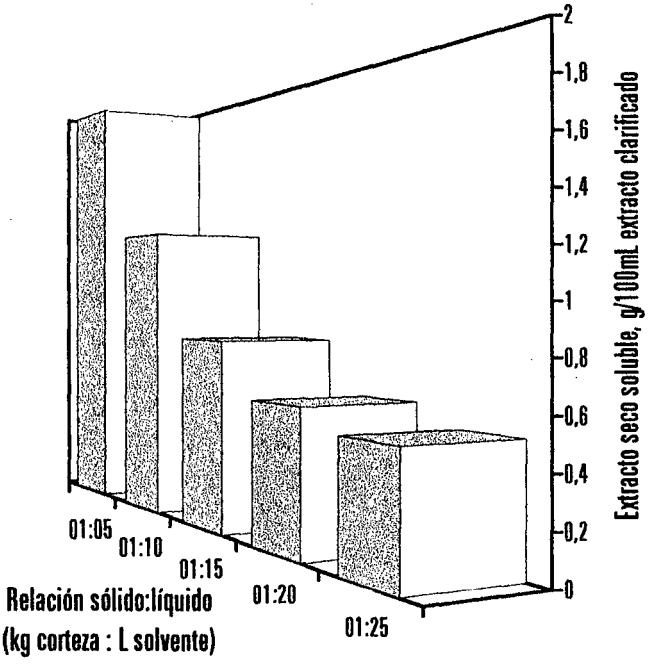


Figura 19: Gráfico de relación sólido:líquido vs extracto seco soluble en la extracción por reflujo.

3. Tiempo de extracción para el método reflujo

El Cuadro 18 muestra la evaluación de los componentes del extracto a medida que transcurre el tiempo de extracción, realizado por el método reflujo.

Cuadro 18: Evaluación de la absorbancia de extractos de *U. tomentosa* por el método reflujo.

Tiempo de Extracción (minutos)	Absorbancia a 245 ηm			
	Extracción alcalina		Extracción ácida	
	$CHCl_3$	$CHCl_3$:EtOH(9:1)	EtOH	H_2O
10	0.083	0.142	0.133	0.097
20	0.113	0.193	0.157	0.107
30	0.146	0.247	0.162	0.120
40	0.160	0.273	0.174	0.141
50	0.147	0.272	0.158	0.123
60	0.145	0.272	0.148	0.119

[1] Valores obtenidos utilizando extractos a una concentración [ ] = 100 $\mu g.ml^{-1}$.

Se observa una diferencia numérica superior en los valores de absorbancia a los 40 min de extracción para todos los solventes, a partir del cual estos valores decrecen. Esto puede correlacionarse mejor en el gráfico de la Figura 20. Los valores de absorbancia reportados se deben a la mezcla de compuestos que fueron lixiviados. Puede notarse que el extracto $CHCl_3$-EtOH(9:1) presenta los mayores valores de absorbancia.

El descenso de la absorbancia después de 50 min. de extracción, puede atribuirse al efecto del tratamiento térmico prolongado que modifica la estructura electrónica del indol en los alcaloides, presentes en la fase líquida. El indol de naturaleza aromática, es el responsable

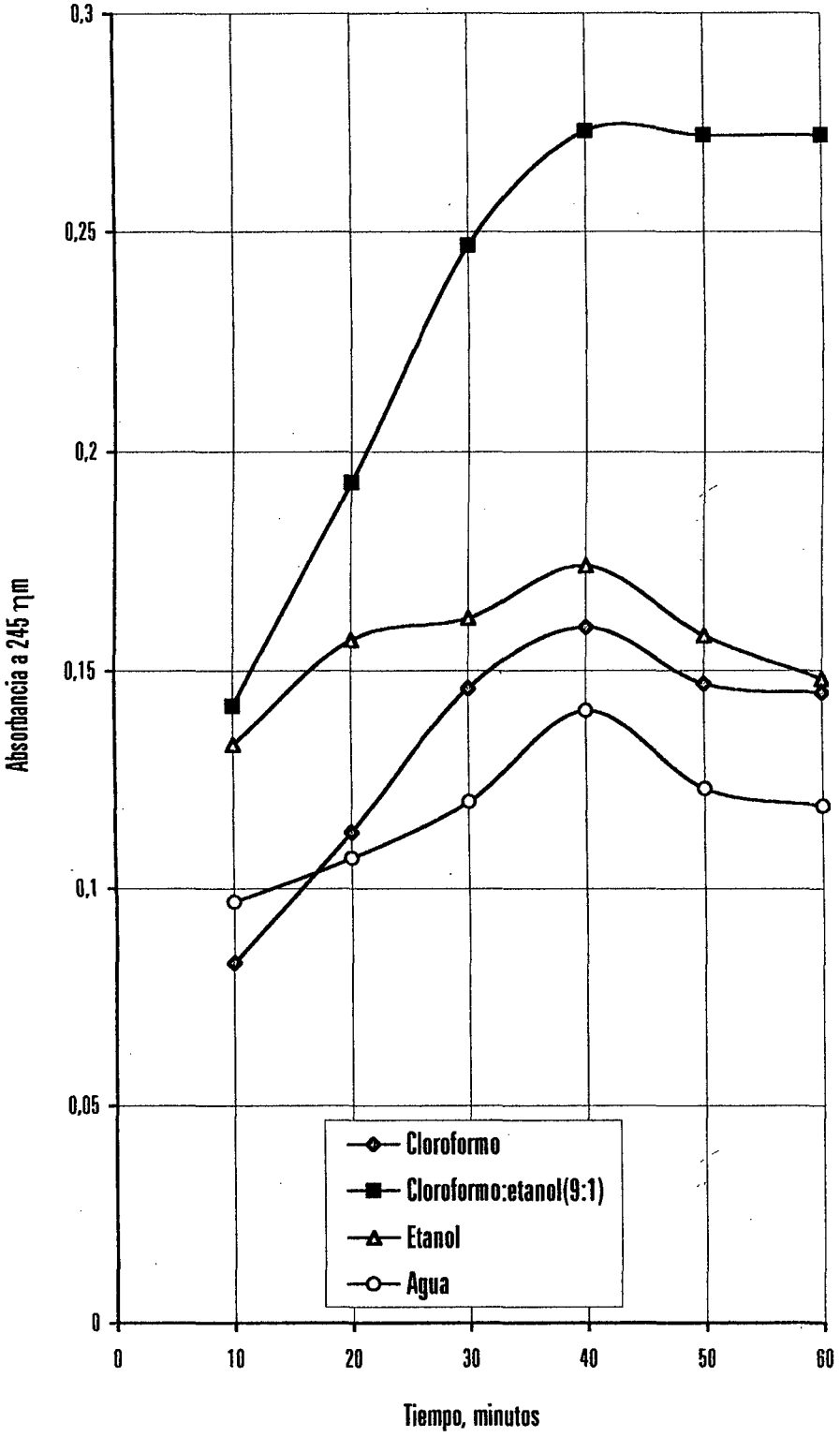


Figura 20: Gráfico de velocidad de extracción por el método reflujo utilizando diferentes solventes.

de que los alcaloides absorban luz UV en 245 ηm. (McMurry,1994 ; Lock de Ugaz,1988). A ello también se puede sumar el efecto del método empleado, donde el solvente a ebullición esta en contacto directo con la fase sólida, de la cual los alcaloides están siendo extraídos y, fácilmente podrían ser modificados.

4. Tiempo de extracción para el método maceración-Soxhlet

La velocidad de extracción para el método continuo (maceración por 24 h, seguido de extracción por Soxhlet) se observa en el Cuadro 19, y con estos valores se construyó el gráfico de la Figura 21.

Cuadro 19: Evaluación de la absorbancia de extractos de *U. Tomentosa* por el método maceración-Soxhlet.

Tiempo de extracción (horas)	Absorbancia a 245 ηm			
	Extracción alcalina		Extracción ácida	
	$CHCl_3$	$CHCl_3$:EtOH(9:1)	EtOH	H_2O
2	0.061	0.243	0.113	0.071
3	0.102	0.288	0.134	0.089
4	0.116	0.289	0.146	0.085
5	0.131	0.313	0.168	0.067
6	0.170	0.324	0.188	0.056
7	0.168	0.317	0.192	-

[1] Valores obtenidos utilizando extractos a una concentración [ ] = 100 $\mu g.ml^{-1}$.

Se aprecia una diferencia numérica superior de los valores de absorbancia en 6 h de extracción para el cloroformo y cloroformo:etanol(9:1); en 7 h para el etanol 96°GL y en 3 h para el agua. Tales valores reflejan un constante ascenso, excepto para el agua. El

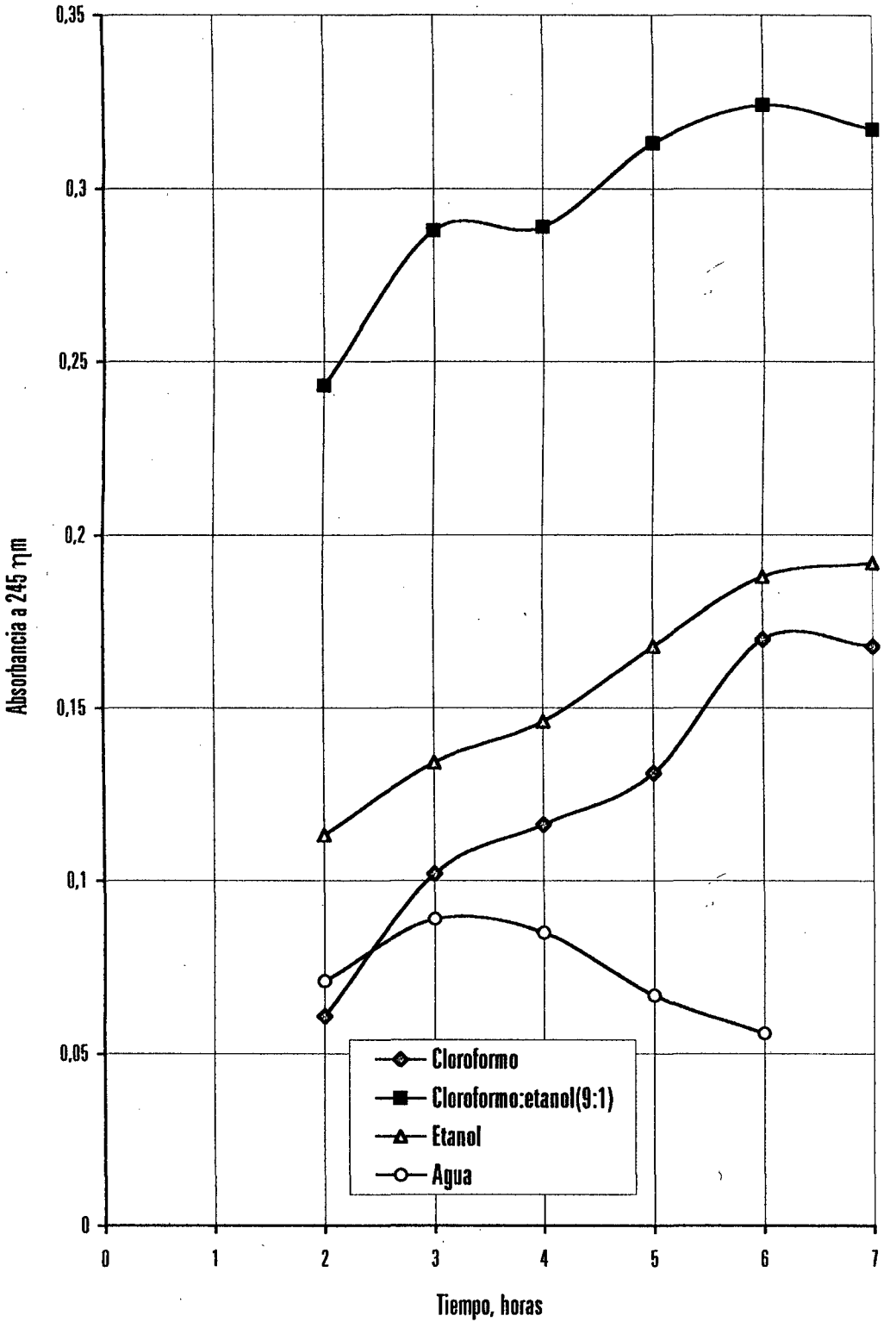


Figura 21: Gráfico de velocidad de extracción por el método maceración-Soxhlet utilizando diferentes solventes.

fenómeno ocurrido puede atribuirse al efecto de temperaturas elevadas, ya que en la ebullición del agua se utilizó como fuente de calentamiento, un plato o plataforma eléctrica, mientras que para los demás solventes se utilizó baño de agua.

Las temperaturas altas afectan la absorbancia de un soluto por modificación en su estructura electrónica (Laus ; Keplinger,1994).

El ascenso permanente de la absorbancia puede explicarse por el sistema utilizado (extractor Soxhlet). En efecto, la fase sólida previamente humedecida por 24 h, no esta en contacto directo con el solvente a ebullición y por ello los solutos removidos, que progresivamente están siendo extraídos, son difícilmente modificados cuando se someten a un tratamiento térmico prolongado.

5. Rendimiento de extracción en alcaloides totales

Las extracciones ácidas y alcalinas, a reflujo, fueron de 40 min. En el método continuo las extracciones fueron: para $CHCl_3$ y $CHCl_3$:EtOH(9:1), 6 h; EtOH, 7h y H_2O, 3h.

Los resultados se presentan en el Cuadro 35 (anexo F) y los análisis estadísticos en los Cuadros 36 y 37 (anexo F). Se encontró diferencia altamente significativa ($p<0.0001$) con respecto a los solventes y métodos de extracción utilizados.

El Cuadro 20 resume las significancias de Tukey para las medias del contenido de alcaloides totales, obtenidos de las interacciones método de extracción/solvente. Se observa que los 12 extractos de uña de gato son estadísticamente diferentes, siendo las extracciones en medio ácido, las favorecidas. La interacción M_3S_3 (maceración por 24 h-Soxhlet con etanol 96°GL), es estadísticamente superior a los demás tratamientos y posee el mayor rendimiento en A.T. (86.48%), tal como se detalla en el mismo cuadro. Con estos datos se construyó el gráfico de la Figura 22.

Cuadro 20: Contenido de alcaloides totales (A.T.) en extractos de uña de gato y rendimiento de extracción en A.T.

Extractos de uña de gato		Alcaloides totales [1] mg.g^{-1}		Rendimiento [2] %
Etanólico, por maceración-Soxhlet	M_3S_3	11.16±0.080	a	86.48
Etanólico, por reflujo	M_2S_3	8.87±0.060	b	69.83
Acuoso, por reflujo	M_2S_4	7.15±0.080	c	56.38
Etanólico, por relixiviación	M_1S_3	6.36±0.020	d	50.01
Acuoso, por maceración-Soxhlet	M_3S_4	5.90±0.001	e	46.63
Acuoso, por relixiviación	M_1S_4	4.71±0.020	f	35.91
Clorofórmico-etanólico, por macer.-Soxhlet	M_3S_2	3.45±0.020	g	33.61
Clorofórmico-etanólico, por reflujo	M_2S_2	2.69±0.040	h	29.08
Clorofórmico-etanólico, por relixiviación	M_1S_2	2.23±0.020	i	24.94
Clorofórmico, por maceración-Soxhlet	M_3S_1	1.25±0.020	j	20.80
Clorofórmico, por reflujo	M_2S_1	0.76±0.020	k	16.28
Clorofórmico, por relixiviación	M_1S_1	0.40±0.060	l	12.63

[1] Estos valores reportan el promedio ± error estándar de la media, n=2
[2] Valores obtenidos al asumir que 12.82 mg.g^{-1} es el contenido total de alcaloides en la corteza

Esto puede atribuirse a la composición de las soluciones ácidas utilizadas en la lixiviación. Las especies iónicas (ion acetato e ion hidrónio) contribuyen en la solvatación (interacciones ión-dipolo con los solutos de la fase sólida), las especies moleculares contribuyen en atracciones dipolo-dipolo como los puentes de hidrógeno en interacciones polares, y las fuerzas de Van der Waals en interacciones apolares (Morrison ; Boyd,1990).

Así se explica la ventaja del etanol frente al agua en el rendimiento de A.T., puesto que dicho solvente posee una parte polar (grupo hidróxilo) y una parte apolar (radical etilo).

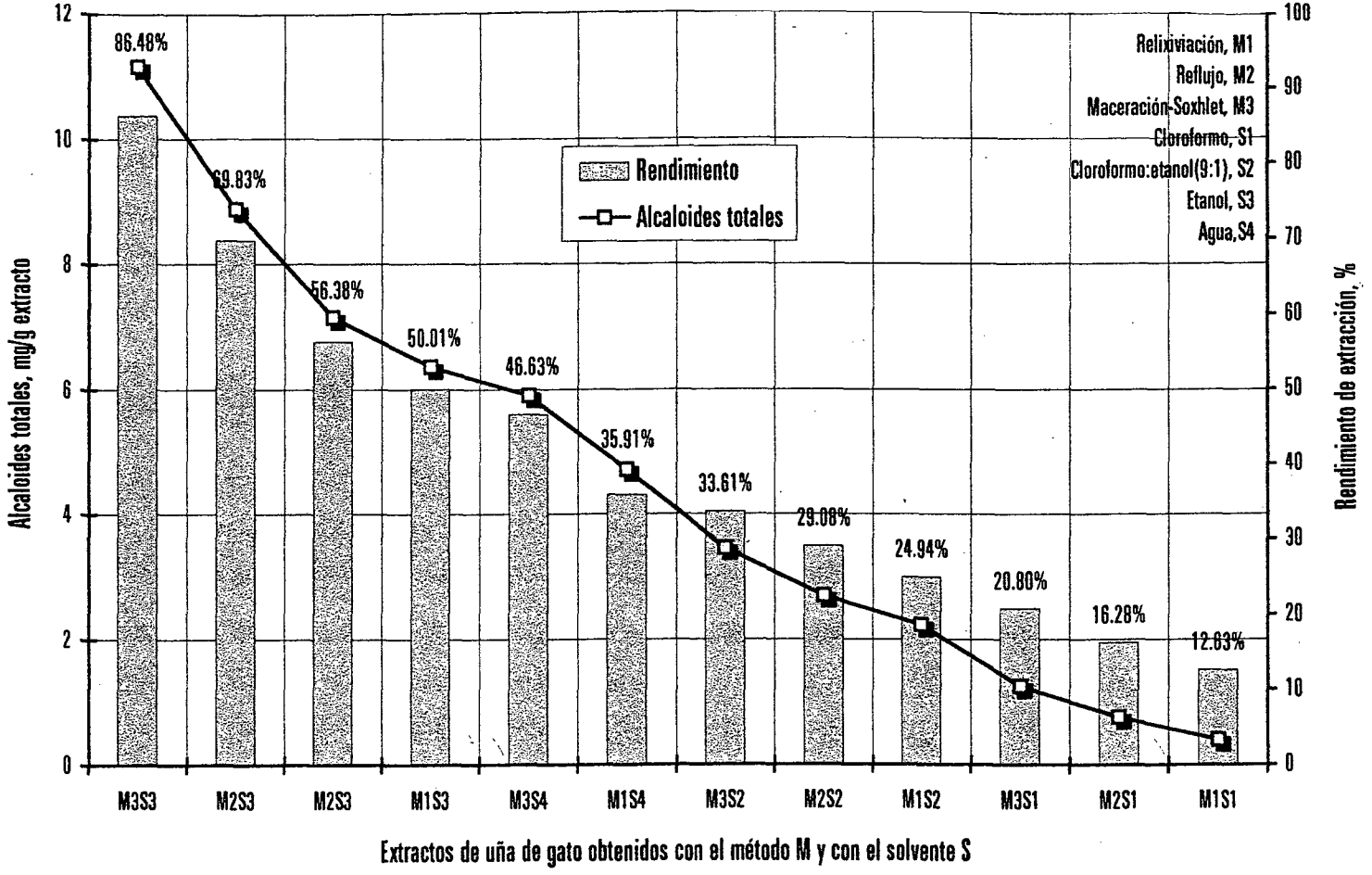


Figura 22: Gráfico del rendimiento de extracción de los alcaloides de uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.

Los métodos maceración por 24h-Soxhlet y reflujo, poseen los mayores rendimientos en A.T. Esto puede atribuirse a que ambos métodos emplean calor en la extracción, comparado con el método relixiviación que reporta los rendimientos más bajos para todos los solventes. Mafart(1994), afirma que el calor facilita la extracción porque permeabiliza las paredes celulares que se desnaturalizan y aumenta la solubilidad y los coeficientes de difusión de los materiales que se desean extraer.

Laus ; Keplinger(1994), reportaron un mayor rendimiento en la extracción por Soxhlet con MeOH neutro, comparado con la extracción ácida por maceraciones sucesivas con MeOH:H_2O:HCl concentrado (500:500:1).

La extracción de alcaloides a reflujo utilizando H_2O (solvente barato), posee el tercer lugar en rendimiento de extracción, pero, no va acompañada de una buena selectividad en cuanto a los constituyentes del extracto, puesto que lixivia saponinas, sustancias que producen espumas indeseadas cuando son agitadas o calentadas, y acarrean problemas durante el concentrado. Como tales moléculas consisten en un carbohidrato hidrofílico unido a una parte esteroide hidrofóbica, su comprobación mediante la prueba de la espuma es muy sencilla (Robinson,1991).

La sobrecocción del extracto acuoso en el método continuo, disminuyó el rendimiento de extracción, tal como se observó en los valores de absorbancia de la etapa anterior. También se puede observar que no existe correlación entre los valores de absorbancia de los extractos $CHCL_3$ y $CHCl_3$-EtOH(9:1), con el contenido en alcaloides de ambos. Estos solventes, por estar menos polarizados, puedan que lixiviaron moléculas distintas a los alcaloides tales como purinas, pirimidinas, compuestos fenólicos como los flavonoides, etc.

Bohinski(1991), menciona que estas sustancias, por poseer en sus estructuras anillos

aromáticos, absorben radiación UV.

En Aquino *et al* (1990) se reportó que el extracto $CHCl_3$ contiene triterpenos polihidroxilados, y en Cerri *et al* (1988), Aquino *et al* (1989) y Aquino *et al* (1991) se reportó que el extracto $CHCl_3$-EtOH(9:1) contiene glicósidos del ácido quinóvico. No obstante en estas investigaciones la forma de extracción fue diferente a lo que se realizó en este estudio. En dichas investigaciones, la corteza de la raíz de *Uncaria tomentosa* fue sucesivamente extraída con los solventes éter de petroleo, cloroformo, cloroformo-metanol (9:1), metanol, y finalmente con agua, obteniendose así, 5 extractos de polaridad baja a alta, respectivamente. Otra explicación seria que las reacciones orgánicas entre las moléculas de solvente y los solutos de la fase sólida, no lleguen a ocurrir. Es decir, no sucede el fenómeno de solvatación, y para que un solvente lixivie sustancias de un sólido, es necesario que soluto y solvente choquen entre si y ocurra una reorganización de los átomos y los enlaces (McMurry,1994)

Una manera de lograr este fenómeno es, proporcionando calor al sistema, el cual suministra la energía suficiente para ascender la barrera de activación y alcanzar el estado de transición de los reactivos (Morrison ; Boyd,1990).

C. PRODUCTO FINAL

1. Ensayos preliminares en la obtención del extracto de uña de gato

a. Extracción de la corteza

Se utilizó el método reflujo, por su caudal elevado, según el estudio de extracción sólido:líquido de alcaloides. Como solvente se utilizó EtOH 96°GL y con el propósito de buscar una mejor selectividad en los componentes del extracto por parte de las sustancias acidulantes, se realizaron ensayos con EtOH neutro, EtOH-CH_3COOH (pH=2.32) y EtOH-$C_4H_6O_6$ (pH=2.36) (los 2 últimos solventes son soluciones alcohólicas al 10% de ácido acético y tartárico respectivamente).

El tiempo de extracción fue de 40 min para todos los solventes y relación S:L = 1:10. Las mezclas sólido-líquido fueron transferidas a ampollas de decantación de 2 L, luego de 15 min se dejo drenar para su filtración al vacío por papel Whatman N°42. El % de extracto seco soluble y la densidad de los extractos clarificados se dan en el Cuadro 21. El clarificado se concentró 5 veces, por destilación a 48-50°C y 21-22 pulgHg de presión de vacío. El contenido de extracto seco soluble (%), densidad y alcaloides totales para los concentrados también se da en el Cuadro 21.

Comparando el extracto EtOH neutro (sin acidular), con los acidulados, éste es menos concentrado en los 3 constituyentes analizados. Entre los extractos acidificados, EtOH-$C_4H_6O_6$ tiene mayor % de extracto seco soluble y es más denso, siendo adecuado para un tratamiento complementario, como por ejemplo, el secado por aspersión. El bajo contenido en extracto seco soluble de EtOH-CH_3COOH, hace que éste requiera mayor eliminación del solvente, elevando los costos de secado.

Cuadro 21: Extracción etanólica por reflujo en medio neutro y en medio ácido [1]

Solvente	Componentes	Extracto	
		Clarificado	Concentrado
EtOH	Extracto seco soluble(%)	1.44	6.93
	Densidad($g.mL^{-1}$)	0.80493	0.82585
	Alcaloides totales($mg.g^{-1}$) [2]	-	5.011
$EtOH-CH_3COOH$	Extracto seco soluble(%)	1.51	7.95
	Densidad($g.mL^{-1}$)	0.83103	0.91381
	Alcaloides totales($mg.g^{-1}$) [2]	-	8.226
$EtOH-C_4H_6O_6$	Extracto seco soluble(%)	11.52	54.48
	Densidad($g.mL^{-1}$)	0.86535	1.12083
	Alcaloides totales($mg.g^{-1}$) [2]	-	7.745

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.
[2] Estos valores reportan el promedio de 2 repeticiones.

Se encontró una diferencia numérica en el contenido de alcaloides (94.15% de rendimiento) comparado con $EtOH-CH_3COOH$, que fue asumido dar 100% de rendimiento. También se observó que el extracto $EtOH-C_4H_6O_6$, atenúa mejor el olor del etanol.

Parece ser que los ésteres y sales formadas con este solvente tienen mayor peso molecular que aquellos formados con $EtOH-CH_3COOH$.

El ácido tartárico posee en su estructura mayores enlaces polarizados (concentrados en sus 2 grupos carboxilos -COOH y 2 grupos hidroxilos -OH), así como enlaces no polarizados al unirse con el etanol; los primeros enlaces contribuyen en la atracción hidrofílica mediante puentes de hidrogeno, y los últimos lo hacen en la atracción

hidrofóbica a través de las fuerzas de Van der Waals (Morrison ; Boyd, 1990)

Así, se puede explicar como el extracto EtOH-$C_4H_6O_6$ posee un alto contenido en extracto seco soluble, y un menor contenido de alcaloides, por competición de éstas últimas con las demás drogas presentes en la corteza, durante la extracción.

b. Extracción del residuo por percolación

El residuo sedimentado en la ampolla de decantación, luego de la extracción por reflujo con EtOH-$C_4H_6O_6$, fue tratado nuevamente. El Cuadro 22 muestra como el contenido de extracto seco soluble disminuye si se emplea mas solvente en la extracción, puesto que diluye el extracto. La Figura 23 esquematiza el comportamiento de estos valores.

Cuadro 22: Relación sólido : líquido en la extracción del residuo por percolación [1]

Relación sólido:líquido (kg coreteza : L solvente)	Extracto seco soluble (%)
1:1	13.03
1:1.5	12.95
1:2	11.97
1:2.5	9.06

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

Se observa mayor disminución del contenido en extracto seco soluble con la relación 1:2.5, comparado con 1:2, que posee un decremento no significativo respecto a la relación 1:1. Esto nos indica que hasta la relación 1:2, el extracto sigue concentrándose en solutos y a partir de esta relación, la concentración en solutos disminuye y mas bien, se aprecia una dilución en el extracto.

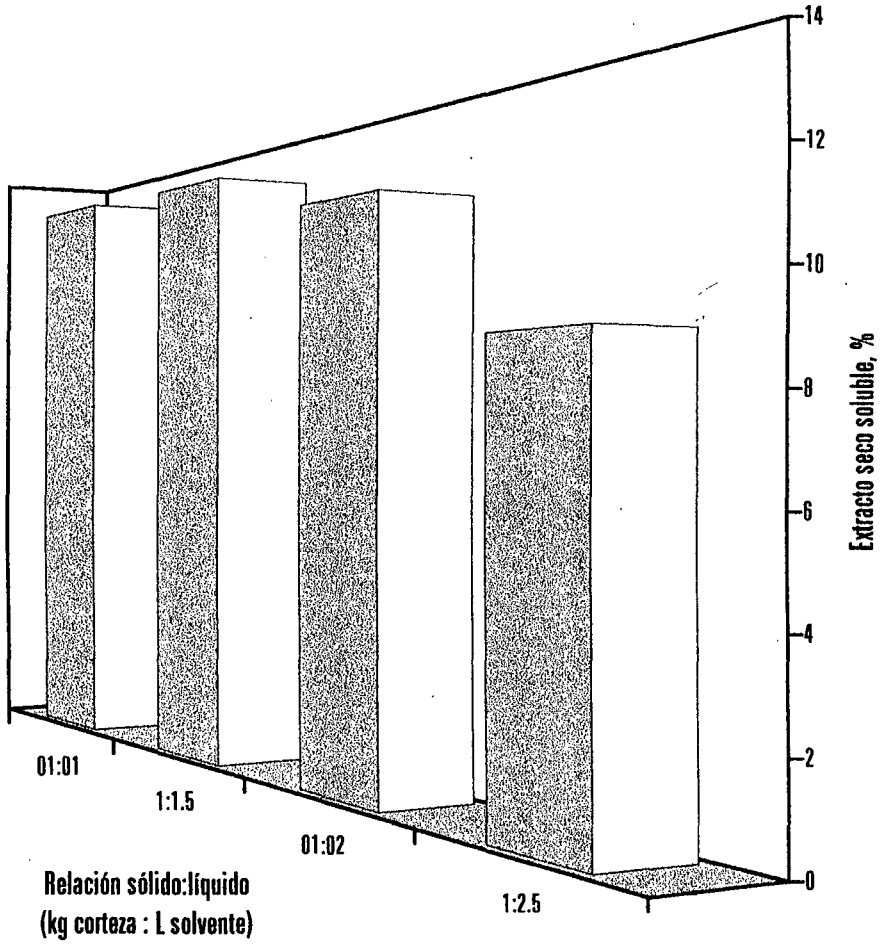


Figura 23: Gráfico de relación sólido:líquido *vs* extracto seco soluble en la extracción del residuo.

c. Concentración del extracto clarificado

Se obtuvo la correlación entre el contenido de extracto seco soluble (%) y el número de veces de concentración del extracto (Cuadro 23).

Los extractos concentrados hasta 3 y 5 veces se realizaron por destilación a 48-50°C y 21-22 pulgHg de presión de vacío. Los concentrados hasta 7 y 9 veces fueron realizados por evaporación a 48-50°C.

Cuadro 23: Relación del número de veces de concentración en el extracto final.

Relación de [ ] $vol_{inicial}$ clarificado(L) → vol_{final} concentrado(L)	Extracto seco soluble (%)
1 → 1	11.56
3 → 1	31.13
5 → 1	54.62
7 → 1	62.55
9 → 1	76.60

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

Con estos datos obtenidos se realizó la Figura 24, el cual detalla como el contenido en extracto seco soluble es directamente proporcional al n° de veces de concentración.

La disminución del olor a etanol también fue observada a medida que se concentraba el extracto, siendo más notorio luego de reducir hasta 7 veces el volumen inicial del extracto clarificado. Sin embargo, al concentrar hasta 9 veces se obtienen mejores resultados, pero los costos de secado son mayores.

También se logra un mejor manipuleo en el extracto para su posterior aplicación, al concentrar hasta 7 veces, que al hacerlo hasta 9.

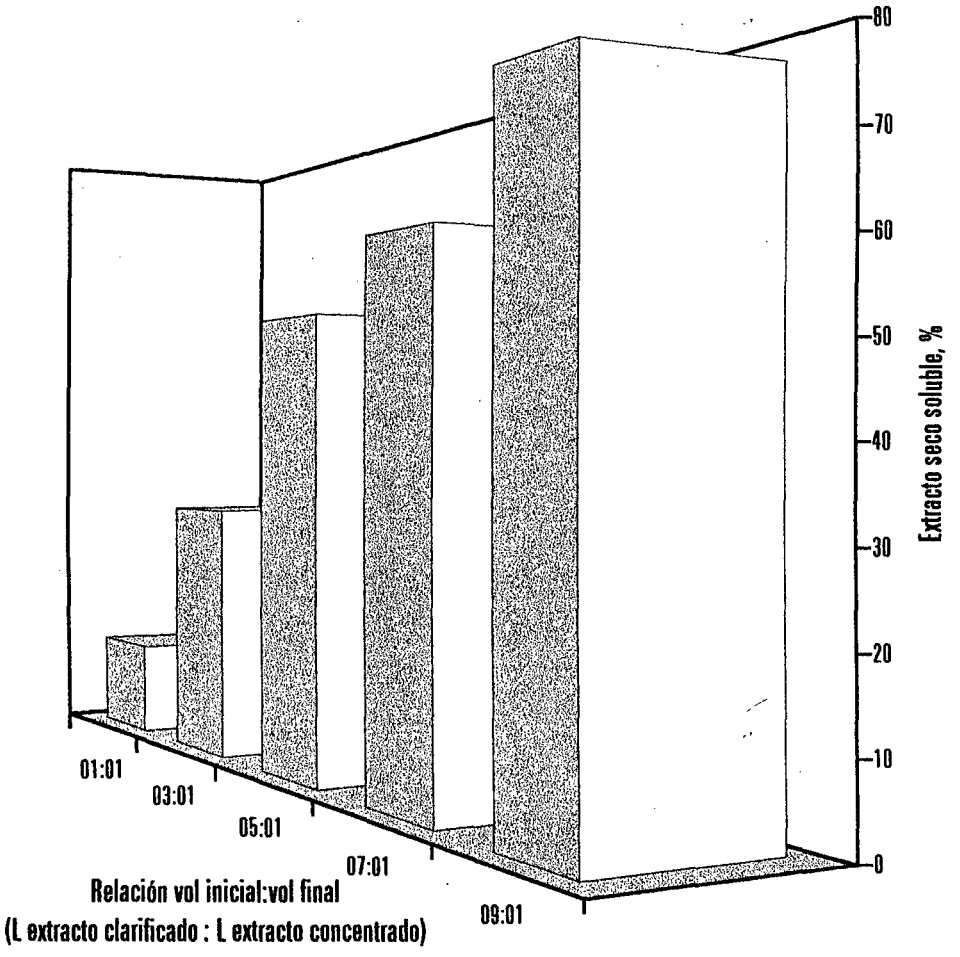


Figura 24: Gráfico de relación volumen inicial:volumen final *vs* extracto seco soluble en la concentración del extracto.

2. Obtención del extracto de uña de gato

Se realizó la lixiviación de los compuestos alcaloídicos con etanol EtOH 96°GL, acidificado con ácido tartárico $C_4H_6O_6$, (solución al 10% , p/p).

La primera extracción se realizo por reflujo, relación S:L = 1 : 10, tiempo de extracción = 40 min. La lixiviación del residuo fue realizado por percolación, con una tasa de flujo aproximado de 12 gotas.min^{-1} y relación S:L = 1:2. Se clarifico el extracto por filtración al vacío con papel Whatman N°42, obteniéndose un extracto con 11.83% de extracto seco soluble. El clarificado se concentró por destilación a 48-50°C, con 21-22 pulgHg de presión de vacío, hasta 5 veces, resultando un 76.25% de solvente recuperado. Luego se continuo esta operación por evaporación a 48-50°C, hasta lograr disminuir 7 veces el volumen inicial y así obtener un concentrado con 62.72% de extracto seco soluble.

3. Caracterización del extracto

El Cuadro 24 brinda el análisis físico-químico del extracto de uña de gato obtenido. Se observa que el rendimiento de extracción en alcaloides totales (90.40%) se incrementó, ya que el residuo fue tratado nuevamente para una segunda extracción.

La acidez elevada (si se compara con la corteza) se atribuye al ácido tartárico, puesto que fue utilizado para acidular el solvente. El solvente así preparado (pH 2.32), al ser recuperado incrementó su pH a 3.67. Esto demuestra que las moléculas del ácido tatárico son retenidas en el extracto cuando éste es concentrado, lo que conlleva al descenso del pH (0.68).

El contenido en azúcares reportados en el extracto de uña de gato se atribuye a los glúcidos encontrados en Cerri *et al* (1988), Aquino *et al* (1989) y Aquino *et al* (1991). Estos azúcares (glucosa, fucosa y quinovosa), se encuentran formando glicósidos con la aglicona ácido quinóvico en C-3, C-28 ó C-3,27.

Cuadro 24: Análisis físico-químico del extracto etanólico (EtOH-$C_4H_6O_6$) de uña de gato *U. tomentosa* [1]

Componentes	[ ]	*unidades*
Alcaloides totales [2]	11.59	$mg.g^{-1}$
Acidez total	5.109	miliequiv. $NaOH.g^{-1}$
Extracto seco soluble	62.72	%
Solvente	37.28	%
Cenizas totales	0.05	%
pH a 26°C	0.68	
Densidad a 25°C	1.19435	$g.mL^{-1}$
Viscosidad a 25°C	0.939	Poises
Azucares reductores	22.836	$mg.g^{-1}$
Azucares totales	29.638	$mg.g^{-1}$

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.
[2] Estos valores reportan el promedio de 2 repeticiones.

El contenido de minerales del extracto (en ppm) se reporta en el Cuadro 25, donde se aprecia la disminución notable de los constituyentes, comparado con el contenido inicial en la corteza, particularmente con el contenido de Ca^{2+}.

Casi en su totalidad Cu^{2+} y Mn^{2+} no fueron lixiviados de acuerdo con el modo de preparación del extracto. Solamente el elemento Na^{+} pudo lixiviarse en un 65.29% respecto al contenido de partida en la corteza seca.

Estos resultados pueden atribuirse al pH del medio de extracción (pH ácido), el cual aporta a la extracción cierta selectividad (evita la disolución de taninos y resinas amargas contenidas en la corteza, y con ello, la extracción de sustancias minerales).

Cuadro 25: Componentes minerales del extracto etanólico (EtOH-$C_4H_6O_6$) de uña de gato *U. tomentosa* [1]

Elemento	[ ], $\mu g.g^{-1}$	
	Extracto concentrado	Extracto seco
Ca^{2+}	64.3	102.5
Mg^{2+}	19.1	30.5
Na^{+}	89.5	142.7
Cu^{2+}	0.6	1.0
Fe^{2+}	4.5	7.2
Mn^{2+}	0.1	0.2
K^{+}	25.0	39.9
Zn^{2+}	1.0	1.6

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

4. Evaluación del extracto en almacenamiento

Según los datos resumidos en el Cuadro 26, la degradación de los alcaloides es mayor a los 30 días (26.75% de pérdida), comparado con el mismo a los 15 días (8.02%). Luego de este tiempo la degradación tendió a estabilizarse. El fenómeno ocurrido puede atribuirse a una oxidación por reacciones electrofílicas, entre el grupo carbonilo del indol en el alcaloide (con alta densidad electrónica) y los iones H^{+} libres presentes en el extracto (el valor del pH a 26°C fluctuó entre 0.44 a 0.68). Es así como podrían degradarse estas sustancias, por una modificación en el indol.

El solvente no eliminado en su totalidad también pueda que sea otro factor de degradación. Bourgeois(1986), reporta que el secado permite que el producto final quede estabilizado. Además el nitrógeno común a 2 anillos (el que no participa en el grupo indol), así como los

demás átomos de oxígeno, tienen disponible el par de electrones. McMurry(1994), menciona que sustancias como éstas actúan como bases de Lewis (donadores de un par de electrones), siendo obvia su neutralización con sustancias de carácter ácido.

También se observa un decremento en la acidez del producto, de 35.29% al cabo del final de la evaluación. Una explicación a esto puede deberse a que el ácido tartárico cristalizó. Negre ; Francot(1980), mencionan que el ácido tartárico cristaliza en los vinos almacenados, logrando que la acidez disminuya y formando una capa de tártaro en el interior de los recipientes, rica en sales de bitartráto potásico y tartráto cálcico.

El contenido en extracto seco soluble se incrementó durante toda la evaluación, en 0.62%, explicando así la tendencia del extracto a perder solvente.

Cuadro 26: Evaluación en almacenamiento a T° ambiente del extracto de uña de gato [1].

Días de almacenamiento	Componentes			
	Alcaloides totales [2] $mg.g^{-1}$	Acidez total meq. $NaOH.g^{-1}$	pH (a 26°C)	Extracto seco Soluble, %
0	11.59	5.1	0.68	62.72
1	-	-	0.6	-
8	-	4.9	0.44	-
15	10.66	4.2	-	62.70
17	-	-	0.5	-
30	8.49	3.8	0.52	62.83
45	8.19	3.5	0.58	63.04
60	8.06	3.3	0.64	63.11

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.
[2] Estos valores reportan el promedio de 2 repeticiones.

El gráfico para detallar el comportamiento de la acidez y el pH durante el almacenamiento se esquematiza en la Figura 25; para el contenido de alcaloides, en la Figura 26; y para el contenido de extracto seco soluble, en la Figura 27.

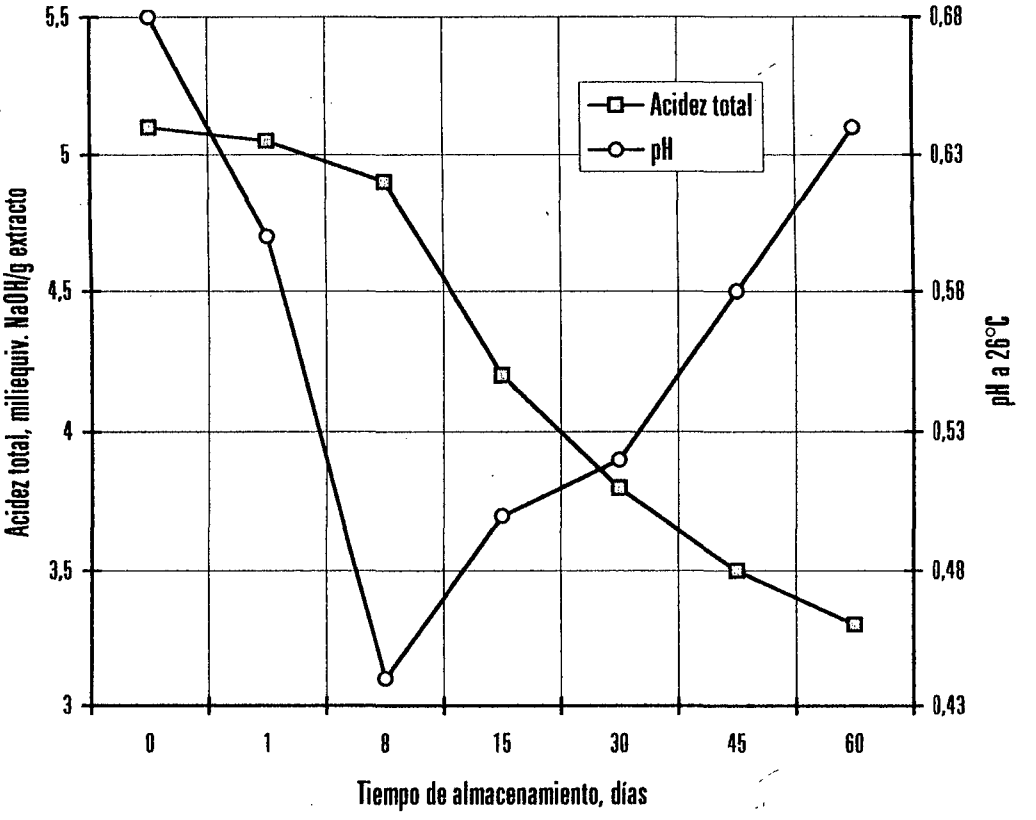


Figura 25: Gráfico de la variación en la acidez y el pH durante el almacenamiento, a T°ambiente.

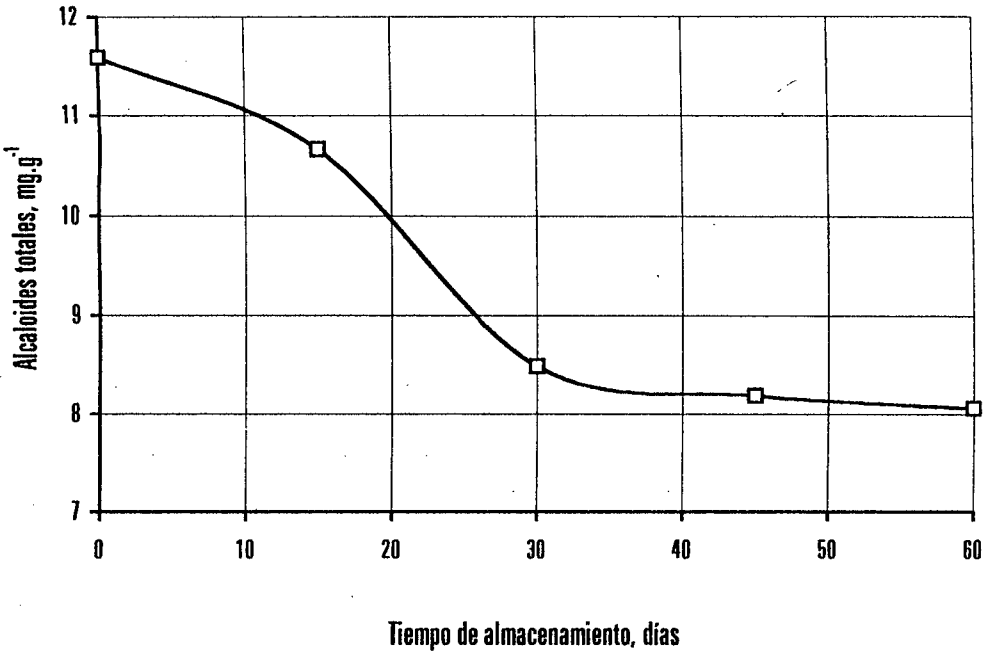


Figura 26: Gráfico de la variación en el contenido de alcaloides durante el almacenamiento, a T°ambiente

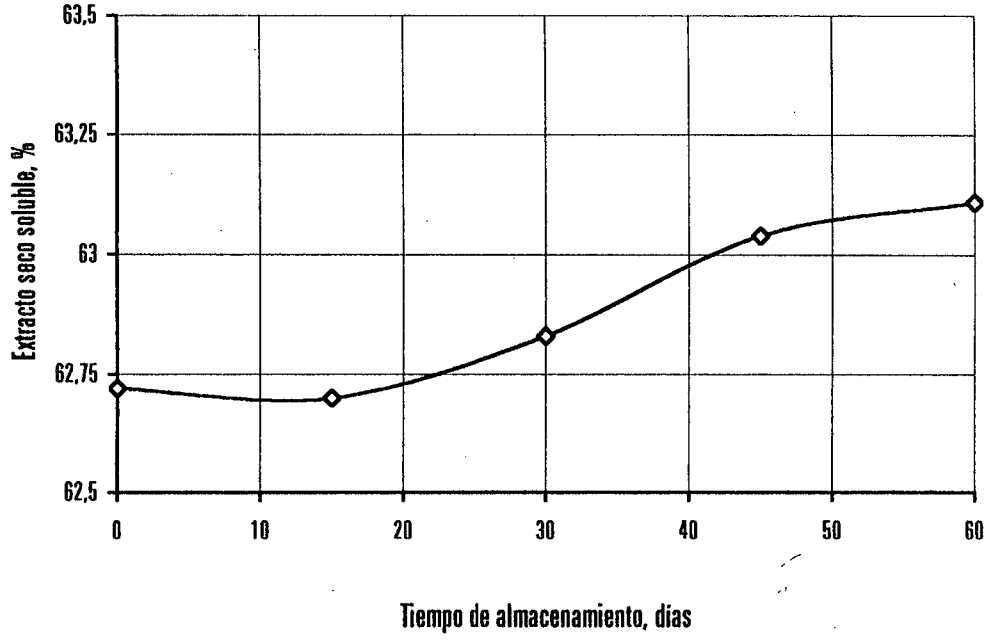


Figura 27: Gráfico de la variación en el contenido de extracto seco soluble durante el almacenamiento, a T°ambiente

D. APLICACIÓN DEL EXTRACTO EN LA FORMULACION DE UNA BEBIDA CARBONATADA

1. Evaluación sensorial

a. Bebida 1

Los resultados se presentan en el cuadro 38 (anexo G) y el análisis estadístico en los Cuadros 39 y 40 (anexo G). Se encontró diferencia significativa entre la media de los rangos de los tratamientos; en el Cuadro 27 se resumen los mismos.

Cuadro 27: Evaluación sensorial de la bebida 1 para el atributo sabor [1]

Bebidas (con uña de gato y jarabe simple)		Media del escore de las bebidas
0.05 % extracto concentrado y 58°Brix	D_1B_3	5.2±0.32 a
0.05 % extracto concentrado y 56°Brix	D_1B_2	5.1±0.19 a
0.10 % extracto concentrado y 58°Brix	D_2B_3	4.2±0.35 a b
0.05 % extracto concentrado y 54°Brix	D_1B_1	4.2±0.30 a b
0.10 % extractoconcentrado y 56°Brix	D_2B_2	3.8±0.27 a b
0.10 % extracto concentrado y 54°Brix	D_2B_1	3.7±0.30 a b
0.15 % extracto concentrado y 58°Brix	D_3B_3	3.5±0.29 b
0.15 % extracto concentrado y 56°Brix	D_3B_2	3.2±0.24 b
0.15 % extracto concentrado y 58°Brix	D_3B_1	3.1±0.34 b

[1] Estos valores reportan el promedio ± error estándar de la media, n=12

Las bebidas o tratamientos D_1B_3 y D_1B_2 son estadísticamente iguales ($p>0.05$) y son las que poseen mayor escore en la evaluación sensorial. Además estas bebidas son significativamente superiores a las bebidas formuladas con D_3 ($p<0.01$). Estos

resultados afirman que, a partir del nivel de dulzor B_2(56°Brix en el jarabe simple) y con D_1 en la formulación (0.05% del concentrado en la bebida final), los jueces aceptan el sabor del extracto de uña de gato.

b. Bebida 2

Los resultados y el análisis estadístico de los mismos se detallan en los Cuadros 41, 42 y 43 del anexo H. En el Cuadro 28, se resumen las significancias entre la media de los rangos de los tratamientos.

Cuadro 28: Evaluación sensorial de la bebida 2 para el atributo sabor [1]

Bebidas (con uña de gato)		Media del escore de las bebidas
0.05% extracto concentrado	D_1	4.5 ± 0.13 [a]
0.10% extracto concentrado	D_2	3.6 ± 0.23 [b]
0.15% extracto concentrado	D_3	3.3 ± 0.21 [b]

[1] Estos valores reportan el promedio ± error estándar de la media, n=15

La bebida formulada con D_1 es estadísticamente superior a D_2 ($p<0.05$) y a D_3 ($p<0.001$), sin emplear saborizante en la formulación de la bebida. También, D_2 y D_3 son estadísticamente iguales ($p>0.05$).

c. Bebida 3

Los resultados se analizaron estadísticamente (Cuadros 44, 45 y 46, ver anexo I). En el Cuadro 29, se resume las significancias entre la media de los rangos de los tratamientos.

Cuadro 29: Evaluación sensorial de la bebida 3 para el atributo sabor [1]

Bebidas (con uña de gato)		Media del score de las bebidas
0.05% extracto concentrado	D_1	4.3 ± 0.15^{a}
0.10% extracto concentrado	D_2	3.5 ± 0.22^{ab}
0.15% extracto concentrado	D_3	2.6 ± 0.27^{b}

[1] Estos valores reportan el promedio ± error estándar de la media, n=15

El cuadro 29 muestra que al formular la bebida sin emplear color y sabor, no existe diferencia significativa entre D_1 y D_2($p>0.05$), pero, D_1 sí es superior a D_3 ($p<0.001$). Además, D_2 y D_3 son estadísticamente iguales ($p>0.05$).

2. Caracterización de la bebida

En el Cuadro 30 se resumen los análisis realizados para la formulación D_1B_2 (bebida tipo 1) y, para la formulación D_1 (bebidas tipo 2 y 3).

Cuadro 30: Análisis físico-químico de bebidas carbonatadas con extracto de uña de gato [1]

Componentes	Bebida 1 D_1B_2	Bebida 2 D_1	Bebida 3 D_1	*unidades*
Acidez total	0.013	0.029	0.005	miliequi.NaOH.ml^{-1}
Sólidos solubles a 20°C	11.1	10.7	10.7	°Brix
pH a 25°C	2.34	2.25	2.90	%
Volumen de CO_2	3.59	-	-	volúmenes Bunse
Azucares reductores	18.460	18.407	-	mg.g^{-1}
Azucares totales	113.518	106.129	-	mg.g^{-1}

[1] Estos valores reportan el promedio de 3 repeticiones.

Se aprecia que, tanto el colorante como el saborizante influyen en el contenido global de ácidos libres presentes en la bebida. Los sólidos solubles de las bebidas se ven disminuidos respecto al valor teórico que se espera cuando los jarabes son diluidos (para B_1: 10.8°Brix y para B_2: 11.2°Brix). Esto se debe a que los aditivos empleados contienen ácidos y azúcares distintos a la sacarosa, y en consecuencia la concentración de esta última se ve en la necesidad de disminuir.

Las bebidas de cola están elaboradas con colorante caramelo, aciduladas con ácido fosfórico y aromatizadas con extractos de especias, aceites cítricos y nuez de cola. (Ranken,1993).

La bebida 2 es la que posee mayor acidez y menor pH, por la combinación de los ácidos tanto del colorante como del extracto de uña de gato.

La bebida 3 posee menor acidez comparada con la bebida 1. Esto muestra que las sustancias que constituyen el saborizante neutralizan los ácidos del colorante y del extracto de uña de gato.

El contenido en CO_2 de la bebida (3.59 volúmenes Bunse) esta en el rango establecido por Pepsi-cola(1975) que sugiere de 3.4 a 3.8 volúmenes Búnse. El contenido en CO_2 del agua carbonatada utilizada (4.12 volúmenes Bunse) permitió una menor pérdida de gas en la operación de llenado-mezclado, al quitar el volumen de agua correspondiente al jarabe terminado (47.5 mL agua carbonatada por botella de 285 mL de capacidad). Según Zapata(1966), las aguas carbonatadas contienen entre 4 a 5 volúmenes de CO_2.

Los azúcares totales que se encuentran en la bebida son la sacarosa como predominante y los azúcares del extracto de uña de gato, como se determinó antes en el Cuadro 26. Los azúcares reductores podrían atribuirse también a los azúcares del extracto y a una posible inversión de la sacarosa por efecto de los ácidos presentes en la bebida.

Los resultados del análisis microbiològico se presentan en el Cuadro 31. La cantidad reportada se encuentra dentro de los límites permisibles por las Normas Técnicas (los propuestos por la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos, y Consultas FAO/OMS), estando apto para el consumo humano.

Cuadro 31: Análisis microbiológico de la bebida carbonatada D_1B_2 [1]

Análisis realizado	Cantidad
Numeración de Microorganismos Aerobios Viables Mesófilos (NMAV) R.E.P. 35±2°C	=<10/mL
Numeración de coliformes totales N.M.P. 35±2°C	=<3/100 mL (negativo)
Numeración de Streptococcus del grupo D de Lancefield N.M.P. 35±2°C	=<3/100 mL (negativo)
Numeración de mohos y levaduras R.E.P. 35±2°C	=<10/mL

[1] Estos límites microbiológicos corresponden a una bebida almacenada durante 75 días, a T° ambiente.

La muestra analizada no presentó alteración biológica ya que se halla preservado por los ácidos que contiene y, también por el anhídrido carbónico. Según Zapata(1966), la carbonatación en la bebida ayuda a prevenir el crecimiento de mohos por su acción en el metabolismo respiratorio y desplazar el oxígeno; y la bacteria no sobrevive por mucho tiempo en una bebida carbonatada adecuadamente acidificada. La fermentación por levaduras también puede ser bloqueada si se emplea 3 gramos de ácido cítrico seco por galón de una solución de azúcar al 10%.

E. FLUJO DE PROCESAMIENTO DEFINITIVO EN LA OBTENCION DE EXTRACTO DE UÑA DE GATO Y BEBIDA CARBONATADA

Los tallos frescos de uña de gato se sometieron a las operaciones que se describen a continuación para obtener extracto de uña de gato y su aplicación en bebida carbonatada. En la Figura 28 se esquematiza el flujo de las operaciones descritas.

1. **Cosecha de cortezas.-** Se realizó con la ayuda de machetes previo a la identificación de la planta, observando sus hojas y/o uñas, así como el color del líber.
2. **Limpieza.-** Se realizó con un cuchillo de acero inoxidable. El 8.35% del peso de los tallos frescos corresponde al material adherido en la superficie de los tallos incluido el súber.
3. **Descortezado.-** Se realizó manualmente cortando en forma de tiras de 20 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho, siendo su contenido en agua de 66.48%.
4. **Secado.-** Se realizó con flujo de aire a 65-70°C en un secador de cabina, durante 4.2 h.
5. **Reducción de tamaño.-** En esta operación primero se redujo manualmente el espesor de la corteza aproximadamente a 1 mm y luego cortando con una tijera podadora las tiras delgadas de corteza seca en longitudes menores a 1 cm. Finalmente, con la ayuda de un molino manual y uno mecánico se concluyó esta operación.
6. **Tamizado.-** Se realizó empleando un tamiz con diámetro de luz de 315 μm, obteniéndose corteza pulverizada con un contenido en agua de 9.60%.
7. **Extracción I.-** Se realizó con EtOH 96°GL acidificado con $C_4H_6O_6$, (10% p/p), empleando el método de reflujo, relación S:L = 1 : 10, tiempo de extracción = 40 min.
8. **Sedimentación.-** El extracto de la primera extracción se sedimentó por gravedad, utilizando una ampolla de decantación de 2 000 mL de capacidad.
9. **Extracción II.-** La extracción del residuo fue realizado por percolación con EtOH 96°GL

acidificado con $C_4H_6O_6$, (10% P/P), con una tasa de flujo aproximado de 12 gotas.min^{-1} y relación S:L = 1:2.

10. **Clarificación.-** Se clarifico los extractos reunidos, por filtración al vacío con papel Whatman N°42, obteniéndose un extracto con 11.83% de extracto seco soluble.
11. **Concentración.-** Se realizó por destilación a 48-50°C, con 21-22 pulgHg de presión de vacío, hasta concentrarse 5 veces (1/5 del volumen inicial del extracto clarificado), resultando un 76.25% de solvente recuperado. Se continuó esta operación por evaporación a 48-50°C, obteniéndose un extracto concentrado con 62.72% extracto seco soluble.
12. **Envasado.-** El concentrado se envasó en forma manual en frascos ámbar con tapa hermética de 250 mL y se almacenó a temperatura ambiente.
13. **Preparación de jarabe simple.-** Se realizó mezclando agua purificada en un desionizador (44%) y azúcar refinada (56%), con agitación constante a 70°C por 15 min. Seguidamente se filtró al vacío y se dejó enfriar.
14. **Preparación de jarabe terminado.-** Se realizó mezclando los insumos: colorante (1.13% v/v), saborizante (0.33% v/v), agua (0.36% v/v) y finalmente, el extracto de uña de gato (0.30% v/v) con el jarabe simple enfriado hasta 20°C, con agitación constante por 30 min. Se dejó reposar por 24 h.
15. **Mezclado-Llenado.-** Se realizó el mezclado del jarabe terminado (enfriado entre 5-10°C) con agua carbonatada "San Luis" (enfriado entre 2 a 5°C), en una proporción en volumen + volumen de 1+5 respectivamente (47.5 mL agua carbonatada por botella de 285 mL de capacidad).
16. **Coronado.-** Se realizó inmediatamente después de la operación anterior, empleando chapas esterilizadas y un coronador manual.

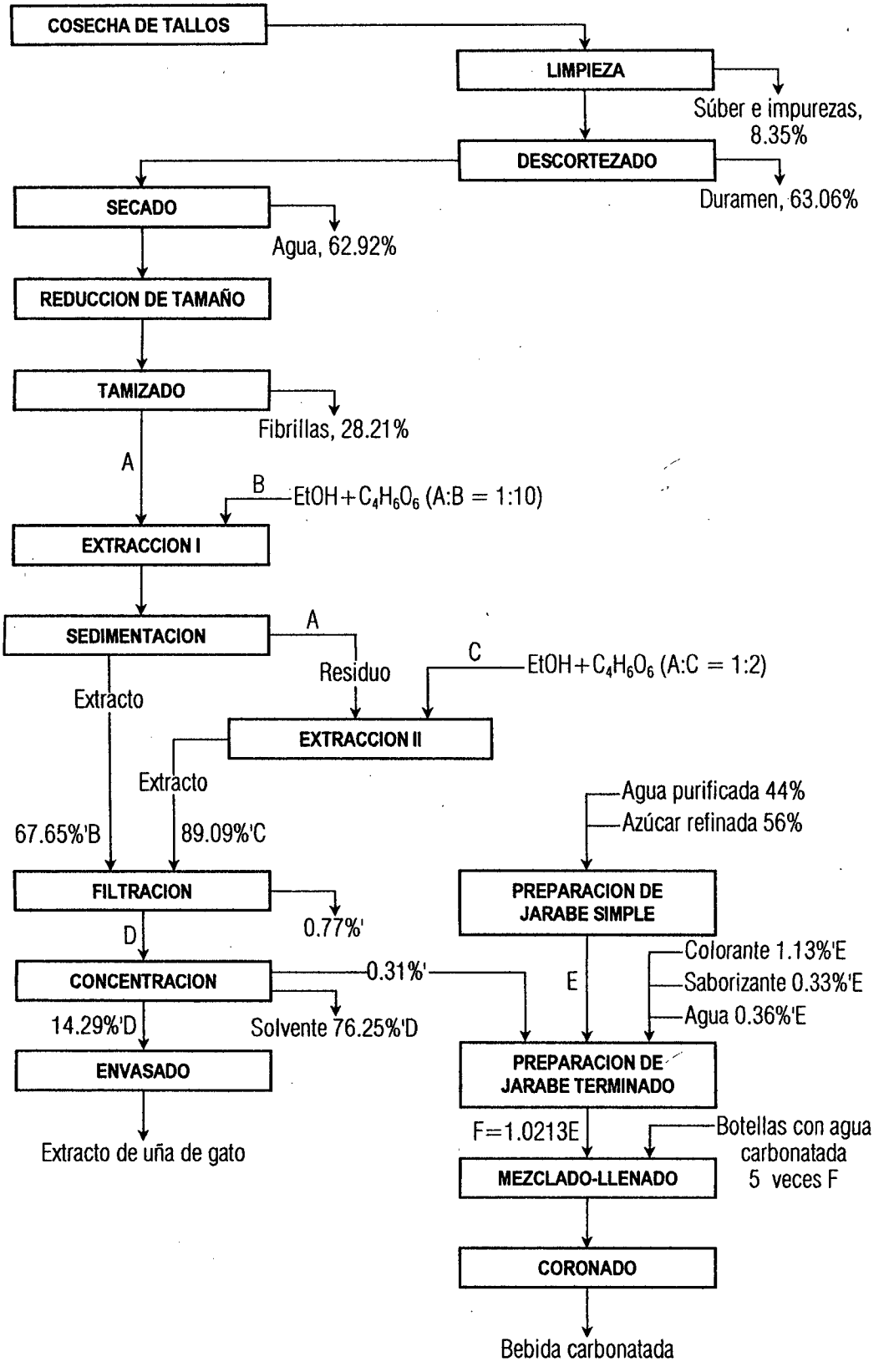


Figura 28: Flujo de procesamiento definitivo para elaborar extracto de uña de gato y bebida carbonatada (%'=%v/v).

F. BALANCE DE MATERIA

El balance de materia para la elaboración de extracto de uña de gato se resume en el Cuadro 32, tomando como base de cálculo 100 kg de tallos frescos de uña de gato.

Cuadro 32: Balance de materia en la elaboración extracto de uña de gato.

Operación	Entra kg	Sale kg	Sigue Kg	Rendimiento Operación %	Rendimiento proceso %
Cosecha	100.00	---	100.00	100.00	100.00
Limpieza	100.00	8.35	91.65	91.65	91.65
Descortezado	91.65	57.79	33.86	36.94	33.86
Secado	33.86	21.30	12.56	37.09	12.56
Reducción de tamaño	12.56	---	12.56	100.00	12.56
Tamizado	12.56	3.54	9.02	71.82	9.02
Extracción por reflujo	81.50	---	81.50	100.00	81.50
Sedimentación	81.50	61.02 L	Residuo=R	---	---
Extracción por percolación	R+14.50	16.07 L	---	---	---
Filtración	77.09 L	0.59 L	76.50 L	99.23 [a]	66.20
Concentración	76.50 L	65.57 L	10.93 L	14.29 [a]	12.25
	=66.20 kg		=12.25 kg		

[a] % en v/v.

En la elaboración de bebida carbonatada (bebida tipo 1) el balance de materia se detalla en el Cuadro 33, tomando como base de cálculo 100 L de jarabe simple.

Cuadro 33: Balance de materia en la elaboración de bebida carbonatada tipo 1.

Operación	Entra (viene) L	Entra (insumos)	Sigue L	Rendimiento Operación % [a]	Rendimiento Proceso % [a]
Preparación de jarabe simple	-	69.95 kg [b]	100.00	100.00	100.00
Preparación de jarabe terminado	100.00	2.13 L [c]	102.13	102.13	102.13
Mezclado-llenado	102.13	510.65 L [d]	612.78	600.00	612.78
Coronado	612.78	-	2150 botellas x 285 mL	100.00	612.75

[a] % en v/v.
[b] Azúcar blanca.
[c] Colorante =1.13 L, Saborizante =0.33 L, Agua=0.36 L y Extracto de uña de gato =0.31L.
[d] Agua carbonatada.

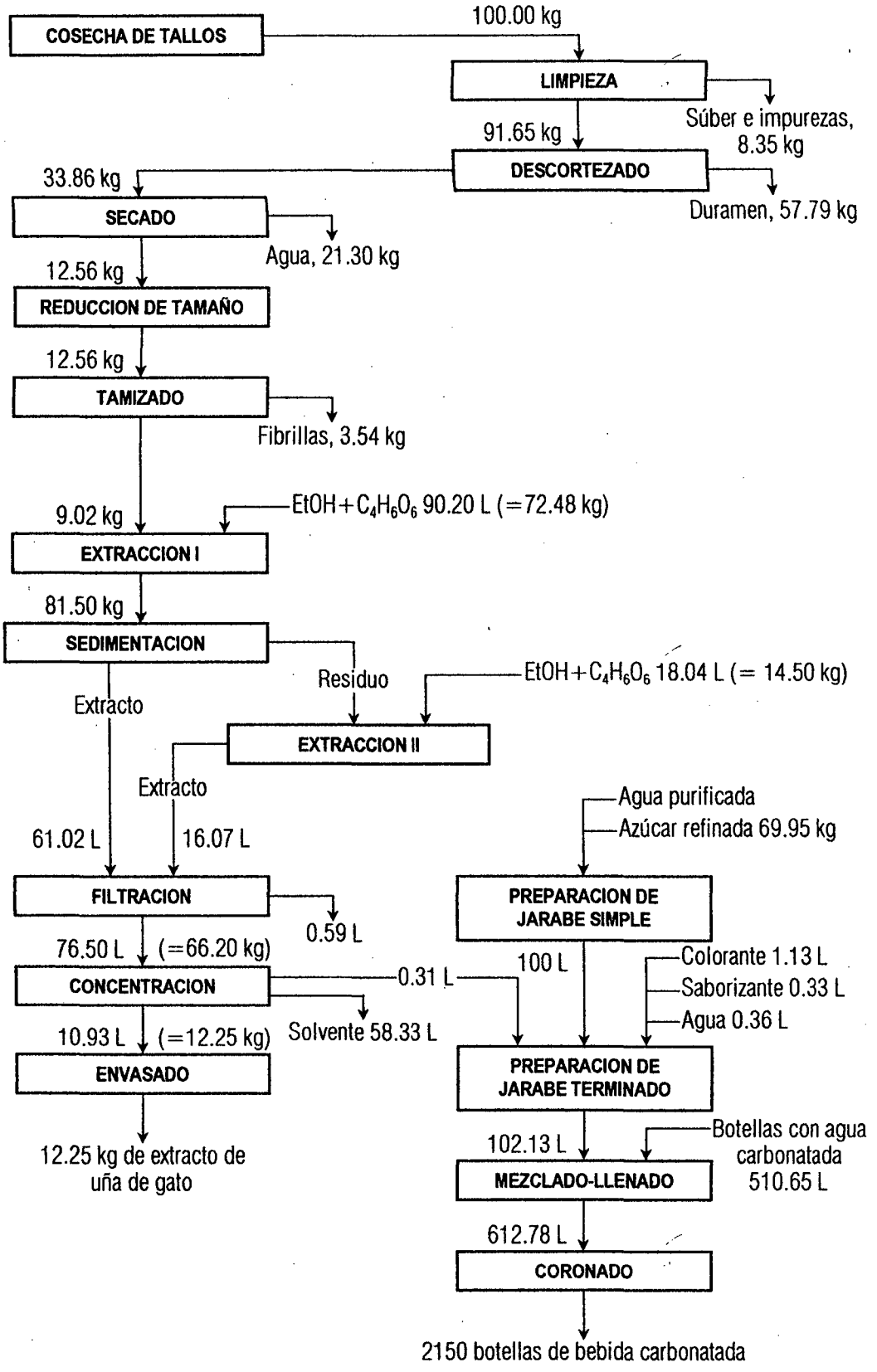


Figura 29: Balance de materia en el procesamiento definitivo de extracto de uña de gato y bebida carbonatada.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se establecen las siguientes conclusiones:

1. En el método reflujo, la relación 1:10 posee la ventaja de no diluir demasiado el extracto y extraer solutos en un 83.94% con respecto a la relación 1:25, que fue considerado como el 100% de extracción de solutos, determinados espectrofotométricamente.
2. El tiempo de extracción determinado espectrofotométricamente depende del método y solvente de extracción, siendo de 40 min en el método reflujo para todos los solventes; en el método maceración-Soxhlet, se requiere 7 h para el etanol, 3 h para el agua y 6 h para los solventes orgánicos.
3. La extracción ácida con etanol empleando el método continuo es el tratamiento que posee el mayor rendimiento de extracción en alcaloides (86.48%). Con el método reflujo se obtiene un rendimiento de extracción de 69.83% con etanol y 56.38% con agua.
4. Se obtiene una mejor selectividad en la extracción al acidular el etanol con ácido tartárico, además que, el extracto seco soluble aumenta en más de 7 veces, respecto al etanol acidulado con ácido acético.
5. La obtención del extracto de alcaloides de uña de gato se realizó en 2 extracciones. La primera fue por reflujo, relación S:L = 1 : 10, por 40 min, con un rendimiento en extracto de 67.65% en v/v respecto al solvente de la relación 1:10. La segunda (al residuo) fue por percolación, relación S:L = 1:2, con un rendimiento en extracto de 89.09% en v/v respecto al solvente de la relación 1:2. El extracto se clarificó y se concentró hasta 7 veces, obteniéndose un rendimiento por proceso de 12.25% respecto a los tallos frescos y, 135.81% respecto a la corteza pulverizada con

9.60% de agua.

6. El almacenamiento del extracto de uña de gato, indica una mayor degradación de los alcaloides a los 30 días (26.75%), comparado con el mismo a los 15 días (8.02%). La acidez del producto decreció en 35.29% al cabo del final de la evaluación, y el extracto seco soluble se incrementó en 0.62%. El valor del pH a 26°C, fluctuó entre 0.44 a 0.68.
7. La aplicación del extracto de uña de gato en la elaboración de una bebida carbonatada de cola requiere una dosis de 0.05% (v/v) del concentrado obtenido y, como mínimo, utilizar un jarabe simple de 56°Brix. En la bebida elaborada sin saborizante también se necesita que la dosis del extracto sea de 0.05% y la bebida elaborada sin saborizante y colorante es indiferente a las dosis de extracto de 0.05% ó 0.10%, por poseer los más bajos escores.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar la extracción de alcaloides de las hojas jóvenes de uña de gato *Uncaria tomentosa*, empleando los parámetros encontrados en este estudio, ya que es la parte de la planta que posee el mayor contenido en alcaloides.
2. Complementar el proceso de elaboración de extracto de uña de gato realizado en el presente estudio con el secado por aspersión, debido a que tal producto sería más estable.
3. Realizar el estudio biológico de las bebidas carbonatadas para complementar el estudio y de esta manera asegurar su contribución en el aspecto sensorial y en la salud.
4. Separar y purificar los alcaloides de uña de gato *Uncaria tomentosa* (pteropodina para los oxindólicos y ajmalicina para los indólicos), con la finalidad de encontrar la absortividad molar de cada uno y aplicarla en las cuantificaciones espectrofotométricas.
5. Realizar los cálculos de diseño para un equipo extractor de alcaloides de las hojas o cortezas de uña de gato.
6. Realizar estudios de extracción sólido-líquido de metabolitos secundarios de otras plantas medicinales, nativas de nuestra selva.

VII. BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 12 ed. Washington D.C., U.S.A., A.O.A.C. p. C.6.95 - C.15.240 - C.32.535.

A.O.A.C. INTERNATIONAL. 1997. Official methods of analysis of A.O.A.C. INTERNATIONAL; agricultural chemicals; contaminants; drugs. Ed. by Patricia Cunniff. 16 ed. Gaithersburg, Md., U.S.A. A.O.A.C. INTERNATIONAL. v.1, p. C.3.3.

AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M. 1989. Plant metabolites, structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycocides from *Uncaria tomentosa* and *Guetarda platypoda*. Journal of Natural Products. 52: 679-685.

AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; VINCIERI, F.; PIZZA, C.; GACS-BAITZ, E. 1990. New polyhydroxilated triterpenes from *Uncaria tomentosa*. Journal of Natural Products. 53: 559-564.

AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CIRINO, G. 1991. Plant metabolites, new compounds and antiinflamatory activity of *Uncaria tomentosa*. Journal of Natural Products. 54: 453-459.

BOHINSKI, R. 1991. Bioquímica. 5 ed. Delaware, Wash., EE.UU., Addison Wesley Iberoamericana. 739 p.

BOURDON, J. 1963. Jarabes, bebidas gaseosas, vinos de fruta, sidras. 2 ed. Barcelona, España, Sintes. 210 p.

BOURGEOIS, C.; LE ROUX, P. 1986. Proteínas animales; extractos, concentrados y aislados en la alimentación humana. México D.F., Méx., El Manual Moderno. 346 p.

BRUNETON, J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza, España,

Acribia. 594 p.

CERRI, R.; AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. 1988. New quinovic acid glycocides from *Uncaria tomentosa*. Journal of Natural Products. 51: 257-261.

CONNORS, K. 1981. Curso de análisis farmacéutico. Barcelona, España, Reverté. 678p.

DESROSIER, N. 1983. Elementos de tecnología de alimentos. México D.F., Méx., Continental. p. 663-671.

DOMINGUEZ, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. México, D.F., Méx., Limusa. 221 p.

EL COMERCIO. 1988. Reportaje de "uña de gato". Junio 17. Lima, Perú.

EL COMERCIO. 1993. Reportaje de "uña de gato". Nov. 28. Lima, Perú.

ESAU, K. 1959. Anatomía vegetal. Barcelona, España, Omega. 729 p.

FAO/OMS. 1981. Manuales para el control de calidad de los alimentos; análisis microbiológico. Roma, Italia, FAO. v.14/4. 161 p. (Estudio FAO: Alimentación y nutrición)

FIESER, L. 1960. Química orgánica. 2 ed. México D.F., Méx., Grijalvo. 1330 p.

GEANKOPLIS, C. 1982. Procesos de transporte y operaciones unitarias. México D.F., Méx., Continental. 759 p.

GERBER, R. 1988. Vibrational healing. Atrium Publishing Group. U.S.A.

GROS, E.; POMILIO, A.; SELDES, A.; BURTON, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales; programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington D.C., EE.UU., Secretaría General O.E.A. 146 p.

HART, F.; FISHER, H. 1991. Análisis moderno de los alimentos. Zaragoza, España, Acribia. 619 p.

HEMINGWAY, S.; PHILLIPSON, J. 1974. Alkaloids from south american species of Uncaria

(*Rubiaceae*). Journal of Pharmaceuticals and Pharmacology. 26: 113.

IACCARINO, F. 1988. Nuevos ácidos glicósidos de *Uncaria tomentosa*. II congreso internacional de medicinas tradicionales: Area de farmaćognocia. Lima, Perú.

IACCARINO, F. 1993. Alcuni effetti dell *Uncaria tomentosa* como preparato unitario a diluizione scalare. II congreso italo-peruviano de etnomedicina andina. Lima, Perú.

KEPLINGER, K. 1982. Cytostat, contraceptive and antiinflamatory agent from *Uncaria tomentosa* roots. Patent-PCT Int. Appl WO-8201. 130: 27.

KEPLINGER, K.; WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B. 1989. Oxindole alkaloids having the properties stimulating the inmunologic system. U.S. Patent. Nº4: 244 901, June 4th. U.S.A.

LAUS, G.; BROSSNER, D.; KEPLINGER, K. 1997. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. Phytochemistry. 45: 855-860.

LAUS, G.; KEPLINGER, D. 1994. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 662: 243-249

LEES, R. 1982. Análisis de los alimentos; métodos analíticos y de control de calidad. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia. 288 p.

LESCURE, J.; LASLSEV, H.; ALARCON, R. 1987. Plantas útiles de la amazonía ecuatoriana. Quito, Ecuador, ORSTOM-PUCE-INCRAE-PRONAREG. 282 p.

LEWIS, M. 1993. Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Zaragoza, España, Acribia. 494 p.

LOCK DE UGAZ, O. 1988. Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Perú, Fondo Pontificia Universidad Católica del Perú. 213 p.

LOCK DE UGAZ, O. 1994. Revisión del género Uncaria, *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis;*

Las "uña de gato". Lima, Perú, Boletín Sociedad Química del Perú. 12 p.

MAIER, H. 1981 . Métodos modernos de análisis de alimentos; métodos ópticos. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia. v.2, 106 p.

MADRID, V. 1994. Métodos oficiales de análisis de los alimentos. Madrid, España, Mundi-prensa. 570 p.

MAFART, P.; BÉLIARD, E. 1994. Ingeniería industrial alimentaria; técnicas de separación. Zaragoza, España, Acribia. v.2, 277 p.

McCABE, W.; SMITH, J. 1981. Operaciones básicas de ingeniería química. Barcelona, España, Reverté. v. 2, 498 p.

McMURRY, J. 1994. Química orgánica. México D.F., Méx., Grupo Iberoamericana. 1278 p.

MONTENEGRO DE MATTA, S., DELLE MONACHE, F., FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO G. 1976. Alkaloids and procyanicdins of an *Uncaria sp.* from Perú. Il farmaco. 7: 527-535.

MORRISON, R.; BOYD, R. 1990. Química orgánica. 5 ed. Wilmington, Del., EE.UU., Addison Wesley Iberoamericana. 1474 p.

NEGRE, E.; FRANCOT, P. 1980. Manual práctico de vinificación y conservación de los vinos. 3 ed. Barcelona, España, Editora José Montesó. 310 p.

OBREGON, L. 1994. Uña de gato; género Uncaria; estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa*, *Uncaria guianensis*. 2 ed. Lima, Perú, Instituto de fitoterapia americano. 162 p.

PAREDES, C. 1993. Nutrición; fundamentos bioquímicos, fisiológicos y clínicos. Lima, Perú, CONCYTEC. 524 p.

PEDRERO, F.; DANIEL, L.; PANGBORN, R. 1992. Evaluación sensorial de los alimentos; métodos analíticos. Zaragoza, España, Acribia. 192 p.

PEPSI-COLA. 1975. Manual de bebidas carbonatadas. "The company Pepsi-cola". EE.UU.

POTTER, N. 1992. La ciencia de los alimentos. México D.F., Méx., Harla. 749 p.

RANKEN, M. 1993. Manual de industrias de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia. 672 p.

REINHARD, K. 1997. *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.; Cat's claw, Uña de gato o "Katzenkralle". Presentación de una planta medicinal. Trad. por Jorge Haselbeck. Zeitschrift für Phytotherapie. 18: 112-121.

REYES, P. 1995. Bioestadística aplicada; agronomía, biología, química. 2 ed. México D.F., Méx., Trillas. 216 p.

RIZZI, R.; RE, F.; BIANCHI, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BIANCHI, L.; STIVALA, L. 1993. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. Journal of Ethnopharmacology. 38: 63-77.

ROBINSON, D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Zaragoza, España, Acribia. 516 p.

ROLLIN, E. 1953. Bebidas, gaseosas y jarabes. Barcelona, España, Sintes. 152 p.

RUIZ, H. 1994. Experiencias en el empleo de la planta peruana *Uncaria tomentosa* en clínica veterinaria. Ponencia presentada en el Seminario Internacional "Uña de gato". Ginebra, Suiza. 30-31 de mayo.

SANDOVAL, M. 1994. Las aplicaciones de la espectrofotometría de absorción/emisión atómica en programas de investigación en agricultura, biología y medicina. UNAS, Tingo María, Perú. 31 p.

SANDOVAL, M.; THOMPSON, J.; ZHANG, X.; LIU, X.; MANNICK, E.; SADOWSKA, H.; CHARBONNET, R.; CLARK, D.; MILLER, J. 1998. Antiinflammatory actions of cat's claw: the

role of NF-κB. Journal of Aliment Pharmacol Ther. 12: 1279-1289.

SENATORE, A.; CATALDO, A.; IACCARINO, F.; ELBERTI, M. 1989. Phytochemical and biological research on *Uncaria tomentosa*. Boletín Sociedad Italiana de Biología. 65-6: 517-520.

SCHULTES, C.; RAFFAUF, R. 1990. The healing forest, medicinal and toxic plants of the northwest amazonia. Portland, Or., Dioscoroides Press. U.S.A.

SHEWFELT, R. 1993. Posthoruest handing a systems approach. Academic Press. U.S.A.

STEINBERG, P. 1996. Cat's claw, a wonderous herb from the peruvian rainforest. Evergreen, C.O. U.S.A. 10 p.

STEVENSON, F ; MERTENS, T. 1990. Anatomía vegetal. México D.F., Méx., Limusa. 209p.

STUPPNER, H.; STURM, S. 1992. Capillary electrophoretic analysis of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. Journal of Chromatography. 609: 375-380.

STUPPNER, H.; STURM, S.; GEINSEN, G.; ZILLIAN, U.; KONWALINKA, G. 1993. A differential sensitivity of oxindole alkaloids to normal and leukemic cell lines. Planta Medica. 59, A-583. Supplement Issue.

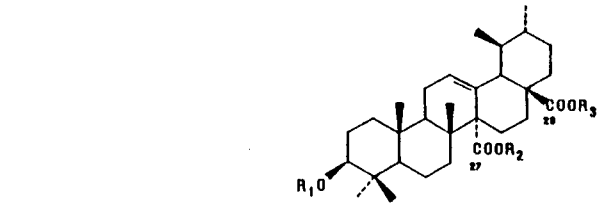
WAGNER, H., KREUTZCAMP, B. and JURCIC, K. 1985 . The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis increasing effect. Planta Medica. 51: 419-423.

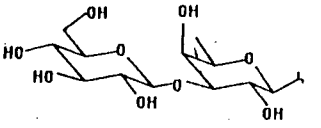
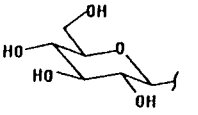
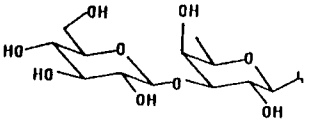
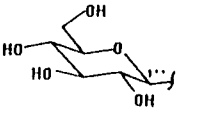
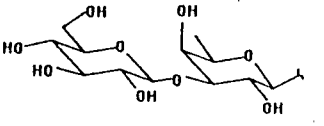
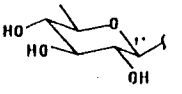
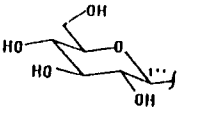
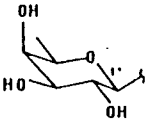
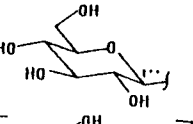
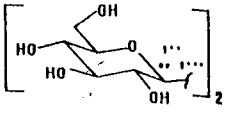
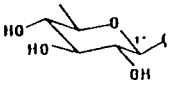
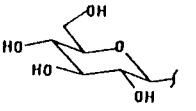
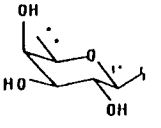
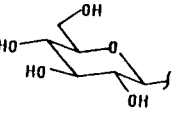
WAYNE, D. 1989. Bioestadística; base para el análisis de la ciencia de la salud. 3 ed. México D.F., Méx., Limusa. 667 p.

ZAPATA, J. 1966. Manual práctico de bebidas para la industria de refrescos. Illinois, Chicago. EE.UU., All Americas Publishers Service. 112 p.

VIII. ANEXOS

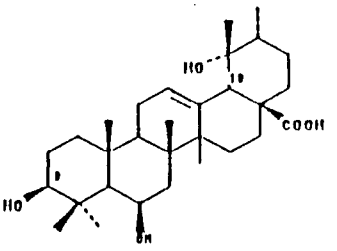
ANEXO A: "GLICÓSIDOS DEL ÁCIDO QUINÓVICO DE *UNCARIA TOMENTOSA*"



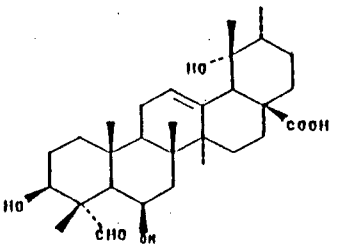
	R_1	R_2	R_3
1			H
2		H	
3		H	H
4		H	
5		H	
6	H	H	
7			H
8			H

Acido quinóvico-3β-o-(β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-fucopiranosil)-(27→1)-β-D-glucopiranosil éster. ($C_{48}H_{76}O_{19}$) 1
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-fucopiranosil)-(28→1)-β-D-glucopiranosil éster. ($C_{48}H_{76}O_{19}$) 2
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-fucopiranosido) ($C_{42}H_{66}O_{14}$) 3
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-quinovopiranosil-(28→1)-β-D-glucopiranosil éster.($C_{42}H_{66}O_{14}$) 4
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-fucopiranosil-(28→1)-β-D-glucopiranosil éster. ($C_{42}H_{66}O_{14}$) 5
Acido quinóvico-(28→1)-β–D-glucopiranosil D–β-D-glucopiranosil éster. ($C_{42}H_{66}O_{15}$) 6
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-quinovopiranosil-(27→1)-β-D-glucopiranosil éster. ($C_{42}H_{66}O_{14}$) 7
Acido quinóvico-3β-o-(β-D-fucopiranosil-(27→1)-β-D-glucopiranosil éster. ($C_{42}H_{66}O_{14}$) 8

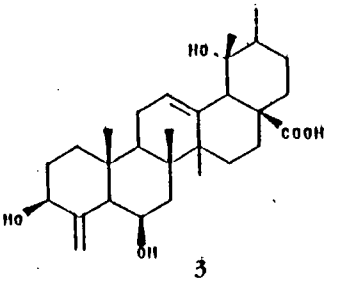
ANEXO B: "TRITERPENOS POLIHIDROXILADOS DE *UNCARIA TOMENTOSA*"



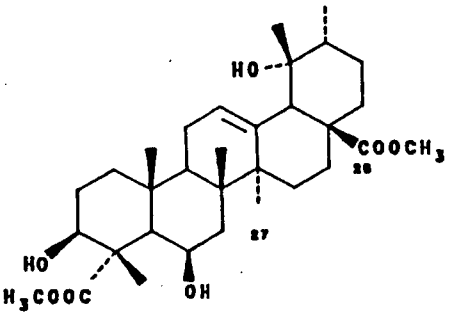
1



2



3



4

Acido 3β,6β,19α-trihidroxiurs-12-eno-28-oico. ($C_{30}H_{48}O_5$)	1
Acido 3β,6β,19α-trihidroxi-23-oxo-urs-12-eno-28-oico. ($C_{30}H_{46}O_6$)	2
Acido 23-nor-24-esometileno-3β,6β,19α-trihidroxiurs-12-eno-28-oico. ($C_{29}H_{44}O_5$)	3
Ester 3β,6β,19α-trihidroxiurs-12-eno-23,28-dimetiloato. ($C_{32}H_{50}O_7$)	4

ANEXO C: "DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS ALCALOIDES"

1. Método general de titulación (A.O.A.C.,1975).

Pesar la muestra finamente molida que contenga aproximadamente 100 a 200 mg de alcaloide, transferir a un erlenmeyer con aproximadamente 20 mL de agua, agregar 1 mL de H_2SO_4 al 2% y extraer con cloroformo (3 x 25 mL). Agregar aproximadamente 1 mL de NH_4OH concentrado (verificar la alcalinidad con papel indicador, en caso contrario adicionar gotas de NH_4OH concentrado), y extraer con cloroformo (4 x 25 mL). Filtrar y continuar por uno de los métodos alternativos:

a. Evaporar el extracto en un baño de vapor con corriente de aire hasta aproximadamente 10 mL Agregar exceso medido de H_2SO_4 0.02 *N*, y continuar la evaporación para remover el solvente. Enfriar, agregar rojo de metilo y titular el exceso de ácido con NaOH 0.02 *N*.

b. Evaporar el extracto en un baño de vapor con corriente de aire hasta sequedad, disolver el residuo en aproximadamente 2 mL de metanol, calentando si es necesario. Agregar rojo de metilo y titular con H_2SO_4 0.02 *N*.

2. Método de extracción alcalina para alcaloides de las hojas de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel (Lock de Ugaz,1988).

Las hojas secas y molidas de *Uncaria guianensis* (10 g) son desengrasadas con benceno (10 mL, 48 h) luego humedecidas con NH_4OH al 10%, secadas al ambiente, y finalmente, se maceran con acetato de etilo por 72 h. Comprobar el agotamiento total de la extracción con el reactivo de Mayer.

El extracto acetato de etilo se concentra y se extrae con H_2SO_4 al 2%. Se alcaliniza esta solución ácida con NH_4OH concentrado hasta pH 11 y se separa el precipitado formado para tratarlo con

cloroformo. Se comprueba el agotamiento de los alcaloides con el reactivo de Mayer.

El extracto clorofórmico obtenido, de color amarillo verdoso se filtra y se continua por uno de los métodos alternativos descritos anteriormente.

ANEXO D: "CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN UTILIZADOS"

1. Relixiviación o percolación fraccionada

Consiste en tomar un peso(en g) de sólido y dividirlo en tres porciones (50%, 30% y 20% del peso total). Cada porción se coloca en un percolador, y se humedece el sólido del primer percolador con un volumen(en mL) de disolvente en relación 1:1 con el peso de este sólido. Se deja en maceración durante 24 h y luego se ajusta el goteo de este primer percolador, añadiendo disolvente nuevo hasta recolectar un volumen de extracto igual al 20% del volumen total y cinco fracciones más, las cuales se agregan al segundo percolador. De éste se obtiene un volumen de extracto equivalente al 30% del volumen total y 5 porciones adicionales que se vierten al último percolador. De éste se obtiene el 50% del volumen de extracto que resta. Se juntan las tres porciones y se obtiene así el extracto total. Se concentra dicho extracto hasta que el volumen en mL este en relación 1:1 respecto al peso en gramos del marco relixiviado.

2. Reflujo o decocción

Se toma un peso de sólido y se traspasa a un matraz esférico. Se agrega el disolvente, se cierra el matraz con un tapón de jebe atravesado por un refrigerante de bolas de 30 cm de longitud colocado en posición vertical. Se calienta el matraz por un periodo prolongado, se deja enfriar, se clarifica el extracto y luego se concentra el extracto hasta un volumen en mL necesario para llegar a la relación de 1:1 con el peso en gramos de sólido empleado.

3. Continuo o maceración-Soxhlet

Se toma un peso(en g.) de sólido, se coloca en un recipiente hermético y se humedece con un volumen(en mL) de menstruo en relación 1:1, durante 24 h. Al término de este periodo se le empaca en un cartucho de papel para filtración rápida. El sólido así preparado se coloca en el interior de un extractor Soxhlet, se añade suficiente disolvente en el balón y se trabaja a la temperatura de ebullición del disolvente, por un periodo prolongado. Se reduce luego el extracto a un volumen en mililitros para obtener una relación de 1:1 con el peso en gramos de sólido empleado.

ANEXO E: "CARACTERISTICAS DE LOS SOLVENTES UTILIZADOS"

Cuadro 34: Algunas características de los solventes utilizados.

Solvente	Símbolo *	Peso molecular	Densidad ** $g.ml^{-1}$	P. ebullición (°C)	pH **
Cloroformo	$CHCl_3$	119.39	1.4735 [25]	61.7	---
Etanol	EtOH	46.07	0.7894 [20]	78.3	---
Acido acético	CH_3COOH	60.05	1.492 [20]	117.9	---
Etanol-ácido acético ***	$EtOH\text{-}CH_3COOH$	---	0.8228 [24]	80	2.93 [24]
Etanol-ácido tartárico ***	$EtOH\text{-}C_4H_6O_6$	---	0.8035 [24]	80	2.32 [24]
Agua	H_2O	18.0	1.0000 [4]	100	---
Agua-ácido acético ***	$H_2O\text{-}CH_3COOH$	---	---	---	2.01 [26]

* Es la representación de la fórmula abreviada de los solventes utilizados.
** Densidad y pH del solvente a la temperatura de medición.
*** Soluciones al 10% en peso.

ANEXO F

Cuadro 35: Resultados del contenido de alcaloides totales de extractos de *Uncaria tomentosa*, para el análisis estadístico en D.C.A. con arreglo factorial 3M*4S con 2 repeticiones.

Método	*n*	Solvente				M
		S_1	S_2	S_3	S_4	
M_1	1	0.456	2.213	6.345	4.687	3.425
	2	0.335	2.254	6.385	4.724	
	X	0.396	2.223	6.365	4.706	
M_2	1	0.783	2.733	8.807	7.230	4.867
	2	0.740	2.652	8.926	7.068	
	X	0.761	2.692	8.867	7.149	
M_3	1	1.267	3.428	11.074	5.896	5.437
	2	1.226	3.469	11.237	5.899	
	X	1.246	3.448	11.156	5.898	
S		0.801	2.791	5.917	8.796	

Cuadro 36: Análisis de varianza para la significancia de los datos del Cuadro 35.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F_c	Pr>F
M	2	17.21047	8.60523	2106.42	0.0001
S	3	222.23141	74.07714	18132.83	0.0001
M*S	6	13.95989	2.32665	569.52	0.0001
Error	12	0.04902	0.00409		
Total	23	253.4508			
R^2	C.V.	M.S.E.	Media		
0.999807	1.396638	0.063916	4.576		

Cuadro 37: Significancia de Tukey ($\alpha = 0.05$) para los factores: método(M) y solvente(S).

Significancia del factor M	Media	*n*	Método
a	5.437	8	M_3
b	4.8674	8	M_2
c	3.4249	8	M_1

Significancia del factor S	Media	*n*	Solvente
a	8.7957	6	S_3
b	5.9173	6	S_4
c	2.7915	6	S_2
d	0.8012	6	S_1

ANEXO G

Cuadro 38: Evaluación sensorial de la bebida 1 para el atributo sabor.

	Tratamientos								
Jueces	D_1B_1	D_1B_2	D_1B_3	D_2B_1	D_2B_2	D_2B_3	D_3B_1	D_3B_2	D_3B_3
1	4	5	6	3	4	4	4	3	3
2	3	6	5	4	3	4	5	3	5
3	5	5	5	3	3	6	3	3	4
4	4	4	6	5	5	5	3	4	5
5	4	4	6	3	5	5	3	4	3
6	4	5	5	5	2	4	2	5	3
7	4	5	3	2	3	4	3	3	2
8	6	5	6	5	4	6	3	4	4
9	5	6	5	4	4	3	3	1	4
10	5	5	6	5	4	3	2	1	2
11	2	6	3	3	5	2	4	3	3
12	4	5	6	3	4	5	3	3	4

Cuadro 39: Prueba del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	*n*	Suma de rangos	Media de rangos
D_1B_3	12	996	83.000
D_1B_2	12	994	82.833
D_2B_3	12	728	60.667
D_1B_1	12	709	59.083
D_2B_2	12	603	50.250
D_2B_1	12	573	47.750
D_3B_3	12	498	41.500
D_3B_2	12	402	33.500
D_3B_1	12	383	31.917

Cuadro 40: Prueba de comparación múltiple de Dunn.

Comparación	Diferencia de las medias		Valor P
D_1B_1 vs. D_1B_2	-23.750	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_1B_3	-23.917	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_2B_1	11.333	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_2B_2	8.833	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_2B_3	-1.583	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_3B_1	27.167	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_3B_2	25.583	ns	P>0.05
D_1B_1 vs. D_3B_3	17.583	ns	P>0.05
D_1B_2 vs. D_1B_3	-0.1667	ns	P>0.05
D_1B_2 vs. D_2B_1	35.083	ns	P>0.05
D_1B_2 vs. D_2B_2	32.583	ns	P>0.05
D_1B_2 vs. D_2B_3	22.167	ns	P>0.05
D_1B_2 vs. D_3B_1	50.917	**	P<0.01
D_1B_2 vs. D_3B_2	49.333	**	P<0.01
D_1B_2 vs. D_3B_3	41.333	*	P<0.05
D_1B_3 vs. D_2B_1	35.250	ns	P>0.05
D_1B_3 vs. D_2B_2	32.750	ns	P>0.05
D_1B_3 vs. D_2B_3	22.333	ns	P>0.05
D_1B_3 vs. D_3B_1	51.083	**	P<0.01
D_1B_3 vs. D_3B_2	49.500	**	P<0.01
D_1B_3 vs. D_3B_3	41.500	*	P<0.05
D_2B_1 vs. D_2B_2	-2.500	ns	P>0.05
D_2B_1 vs. D_2B_3	-12.917	ns	P>0.05
D_2B_1 vs. D_3B_1	15.833	ns	P>0.05
D_2B_1 vs. D_3B_2	14.250	ns	P>0.05
D_2B_1 vs. D_3B_3	6.250	ns	P>0.05
D_2B_2 vs. D_2B_3	-10.417	ns	P>0.05
D_2B_2 vs. D_3B_1	18.333	ns	P>0.05
D_2B_2 vs. D_3B_2	16.750	ns	P>0.05
D_2B_2 vs. D_3B_3	8.750	ns	P>0.05
D_2B_3 vs. D_3B_1	28.750	ns	P>0.05
D_2B_3 vs. D_3B_2	27.167	ns	P>0.05
D_2B_3 vs. D_3B_3	19.167	ns	P>0.05
D_3B_1 vs. D_3B_2	-1.583	ns	P>0.05
D_3B_1 vs. D_3B_3	-9.583	ns	P>0.05
D_3B_2 vs. D_3B_3	-8.000	ns	P>0.05

ANEXO H

Cuadro 41: Evaluación sensorial de la bebida 2 para el atributo sabor.

	Tratamientos		
Jueces	D_1	D_2	D_3
1	4	4	2
2	5	4	3
3	4	3	2
4	4	3	2
5	4	2	1
6	5	4	3
7	4	3	3
8	4	3	1
9	4	4	5
10	5	4	3
11	3	3	3
12	4	2	2
13	4	5	4
14	5	4	2
15	5	4	3

Cuadro 42: Prueba del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	*n*	Suma de rangos	Media de rangos
D_1	15	487	32.467
D_2	15	309.5	20.633
D_3	15	238.5	15.9

Cuadro 43: Prueba de comparación múltiple de Dunn.

Comparación	Diferencia de las medias	Significancia	Valor P
D_1 vs. D_2	11.833	*	$P<0.05$
D_1 vs. D_3	16.567	***	$P<0.001$
D_2 vs. D_3	4.733	ns	$P>0.05$

ANEXO I

Cuadro 44: Evaluación sensorial de la bebida 3 para el atributo sabor

Jueces	Tratamientos		
	D_1	D_2	D_3
1	4	4	2
2	4	2	3
3	5	2	4
4	4	4	4
5	5	4	3
6	5	4	4
7	4	4	3
8	5	5	4
9	4	4	3
10	5	4	4
11	4	4	2
12	5	3	3
13	5	4	3
14	4	2	3
15	4	4	5

Cuadro 45: Prueba del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tratamientos	*n*	Suma de rangos	Media de rangos
D_1	15	495.5	33.033
D_2	15	341.5	22.767
D_3	15	198	13.2

Cuadro 46: Prueba de comparación múltiple de Dunn.

Comparación	Diferencia de las medias	Significancia	Valor P
D_1 vs. D_2	10.267	ns	$P>0.05$
D_1 vs. D_3	19.833	***	$P<0.001$
D_2 vs. D_3	9.567	ns	$P>0.05$