

# ESTUDIO HISTOLOGICO, HISTOQUIMICO Y MICROEXTRACTIVO DE SUSTANCIAS ALCALOIDICAS y GRASAS DE LA SEMILLA DE *ANNONA CHERIMOLIA* MILL

VILLAR, A.\*; CABO, J.\*\*; BARBERA, J. M.\*

## RESUMEN

Hemos estudiado la histología e histoquímica de la semilla de *A. cherimolia* Mill. y se han puesto a punto y aplicado las técnicas histológicas adecuadas para determinar las condiciones idóneas de una posible extracción mediante disolventes, de principios que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides y materias grasas.

## ABSTRACT

We have studied the histology and histochemistry of *A. cherimolia* Mill. seed. In order to determine the most suitable conditions to extract, by means of solvents, substances Dragendorff positive and Sudan III positive, the appropriate histologic techniques were studied and then applied.

## RESUME

Nous avons étudié l'histologie et l'histochimie de la graine de *A. cherimolia* Mill. On a développé et appliqué les techniques histologiques convenables pour préciser les meilleures conditions pour la possible extraction par des dissolvants, des principes donnant positives les réactions habituelles des alcaloïdes et des matières grasses.

---

\* Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

\*\* Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

## INTRODUCCION

*A. cherimolia* Mill. es una Annonácea aclimatada y cultivada en las costas andaluzas de Málaga y sobre todo Granada. Popularmente se han aplicado macerados y cocimientos hidroalcohólicos de la semilla para combatir parásitos del cuerpo humano (*Pediculus capitis*). Los agricultores que cultivan el chirimoyo en estas zonas, han observado que en un determinado radio no se desarrollan nematodos, hecho que no ha sido constatado experimentalmente.

Las Annonáceas contienen numerosos alcaloides (11) de los que se han efectuado, tanto de extractos globales como de alcaloides aislados, estudios dirigidos sobre todo a determinar el poder insecticida (9) y el poder citotóxico (5) (10) (12) (16). También se han efectuado estudios para determinar el poder insecticida de las fracciones oleosas (1) (4).

## MATERIAL Y METODOS

Las muestras utilizadas fueron recolectadas en el llamado «Valle del chirimoyo» (Granada) circundado por las poblaciones de Jete, Otívar, Itrabo y Almuñécar, donde las condiciones climáticas y orográficas son las más parecidas a las tropicales. Se ha trabajado con material fresco, recientemente recolectado, entre los meses de Noviembre y Diciembre.

Nos hemos valido de tres tipos de microtomo: el manual, el criostato o microtomo de congelación, de la casa Byrygh Criostats modelo Freestanding, y el microtomo Erma con platina congeladora electrónica Komaysu.

Para la observación de los cortes, se ha empleado un microscopio binocular PZO serie ML-5 con un sistema fotográfico Nikon. También se ha utilizado un fotomicroscopio Zeiss modelo III, que nos ha permitido realizar estudios con luz ultravioleta.

Hemos empleado dos grupos de reactivos. En un primer grupo incluimos aquellos que nos permiten observar y dilucidar estructuras, clasificándolos en:

*Aclarantes* (3): Agua, glicerina, soluciones al 20% de sosa, potasa e hipoclorito sódico y mezcla aclarante (glicerina, hidrato de cloral y agua en proporción 5:3:3).

*De tinción de membrana:* Schweizer (3), cloroyoduro de zinc (6), rojo congo, floroglucina clorhídrica, sulfato de anilina y sudán III.

*Múltiples:* Steinmetz (14), Tucakov, verde de yodo acético y rojo congo (8) y hematoxilina verde de yodo acético (2).

En el segundo grupo incluimos aquellos que nos permiten localizar los diversos principios, posibles responsables de las acciones farmacológicas, clasificándolos en:

*Reactivos de grasas y esencias* (14): Alcohol de 96° y Sudán III.

*Reactivos de sustancias alcaloídicas* (14): Dragendorff, Boucharlat y técnica diferencial de Errera (15).

*Reactivos de taninos y otras sustancias polifenólicas* (14): Cloruro férrico, vainillina clorhídrica y dicromato potásico.

Se ha centrado nuestra atención en la extracción de sustancias que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides y grasas, a través de técnicas histológicas, por ser principios perfectamente identificados y localizados en el presente trabajo, y porque nos puede servir de base experimental para la extracción de principios en esta semilla. Para ello, preparamos tres medios diferentes: uno de agua neutra, otro de agua ácida ( $H_2SO_4$  1N) y un tercer medio con NaOH 1N (Fig. 1).

La técnica utilizada por nosotros, consiste en mantener los cortes histológicos en estos medios durante dos horas, haciendo un cambio del medio al finalizar la primera hora. Observamos los cortes de cada medio para ver las diferencias que pudieran experimentar los principios y, lavados, se preparan tres lotes de vasos en los que se colocan diferentes reactivos orgánicos (éter de petróleo, éter sulfúrico, alcohol de 96°, alcohol tartárico al 1%, acetato de etilo, cloroformo y benceno). Se mantienen los cortes en cada reactivo una hora, hacemos un cambio del mismo y los mantenemos otra hora. Tras teñir, cinco minutos en pocillo, se lavan y se observan (ver Fig. 1).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *I. Histología e Histoquímica*

La semilla presenta un epispermo totalmente lignificado (Fig. 2), muy duro, con una capa envolvente formada por grandes células desprovistas de contenido celular y gruesas paredes ligni-

ficadas (e), y fibras en las tres direcciones del espacio ( $f_1$ ,  $f_2$  y  $f_3$ ) alargadas y en forma de hueso, de manera que vistas en corte oblicuo (Fot. 1) dan la impresión de que se tratan de células pétreas, en corte perpendicular (Fot. 2) aparecen con una gruesa membrana y en corte longitudinal (Fot. 3) observamos que son alargadas y en forma de huso.

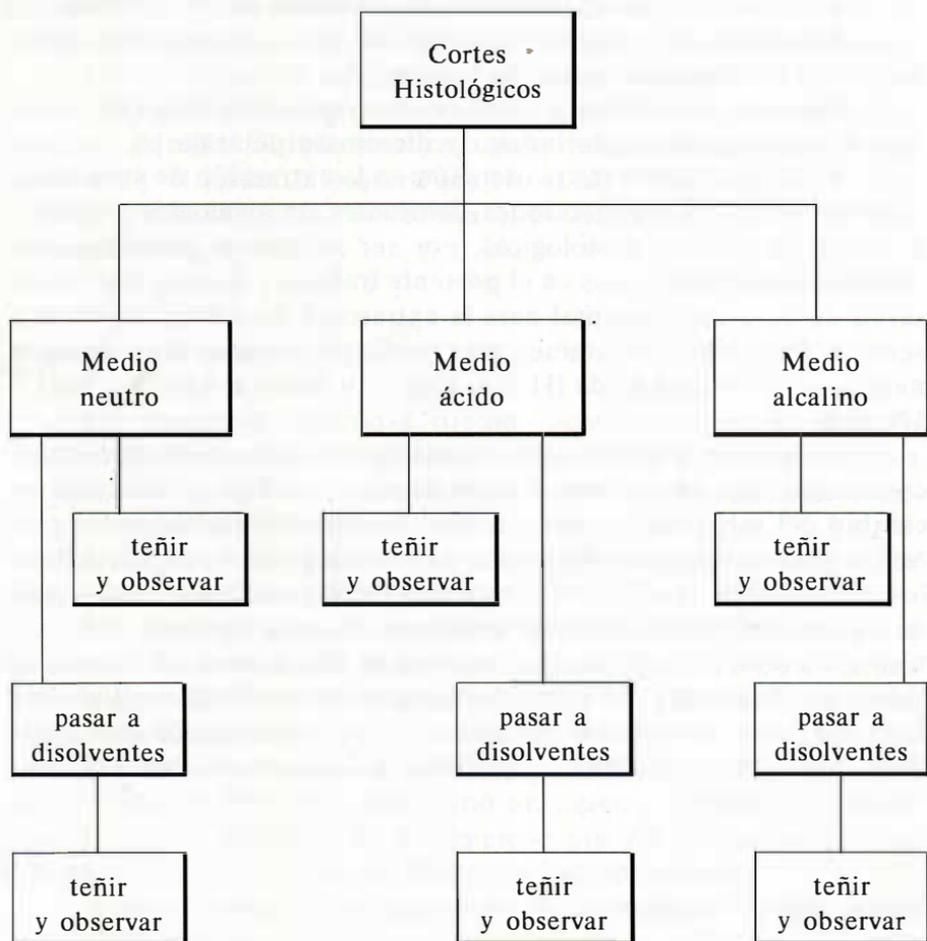


Fig. 1.—Esquema de la EXTRACCION DE PRINCIPIOS.—Los cortes histológicos se mantienen dos horas en cada medio con cambio del medio al finalizar la primera hora. Se lavan y se pasan a los reactivos disolventes (tomando muestras que se tiñen y observan) donde se mantienen otras dos horas con cambio del reactivo al finalizar la primera hora. Finalmente teñir y observar.

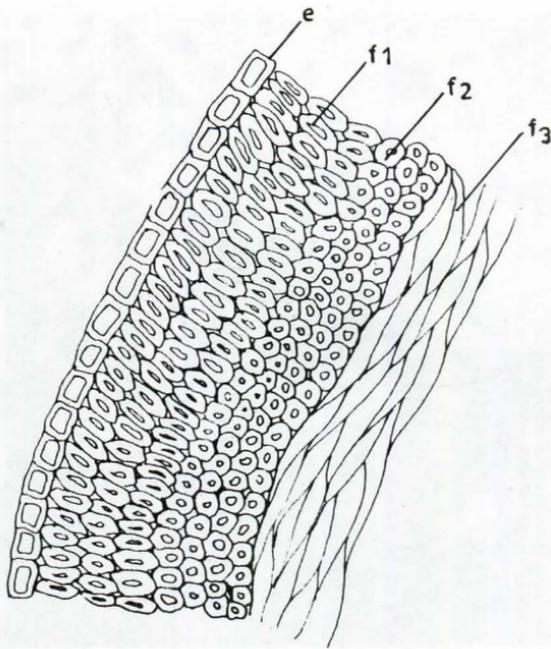
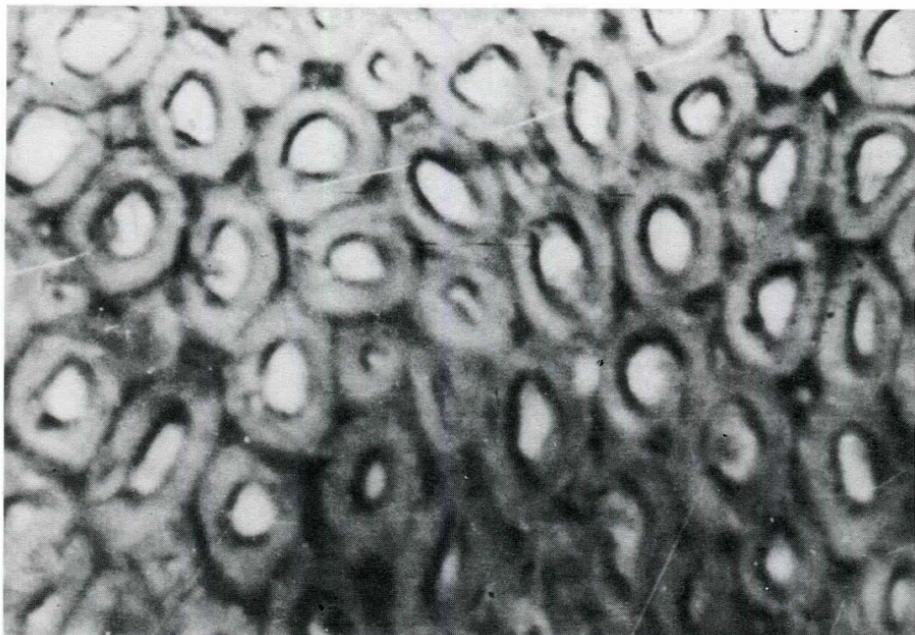


Fig. 2.—EPISPERMO. Células envolventes (e), fibras oblicuas (f<sub>1</sub>), fibras perpendiculares (f<sub>2</sub>) y fibras longitudinales (f<sub>3</sub>)



FOTOGRAFIA N.º 1

Epispermo: corte oblicuo. Espesor: 24  $\mu$ . Aumentos: 40 x 12,5



FOTOGRAFIA N.º 2

Epispermo: corte perpendicular. Espesor: 24  $\mu$ . Aumentos: 40 x 12,5



FOTOGRAFIA N.º 3

Epispermo: corte longitudinal. Espesor: 24  $\mu$ . Aumentos: 40 x 12,5

El albúmen ruminado (Fig. 3) es celulósico, sin ningún elemento lignificado, lo que diferencia las especies de las Annonáceas de las Magnoliáceas, muy cercana a ella (7) (13). Está formado por una cutícula envolvente (cu) y células parenquimatosas de contorno irregular más o menos poligonales (c).

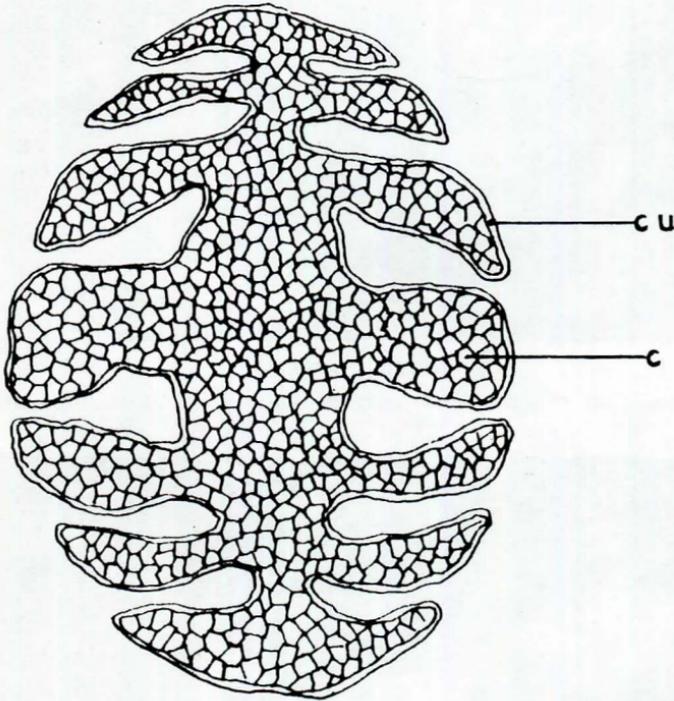
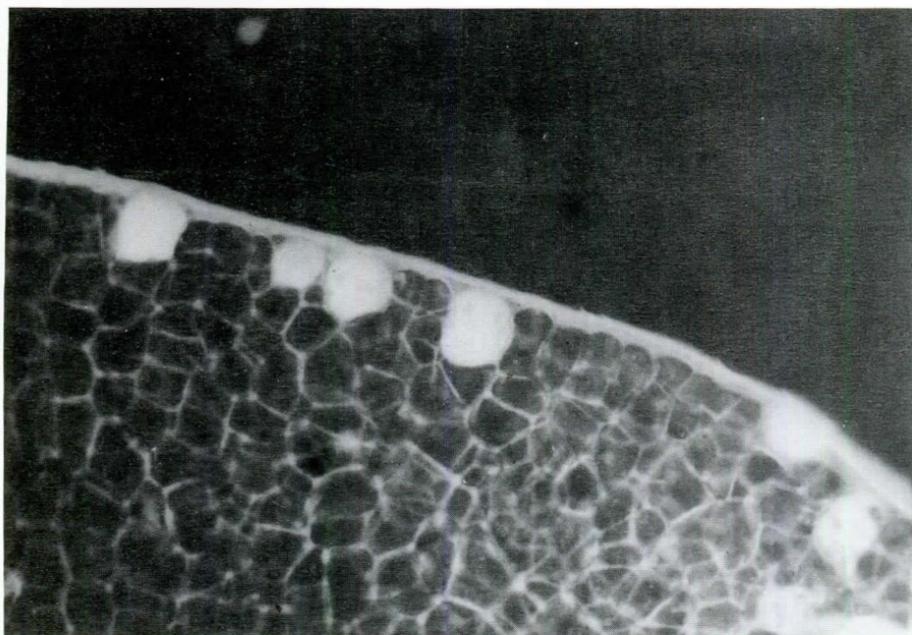


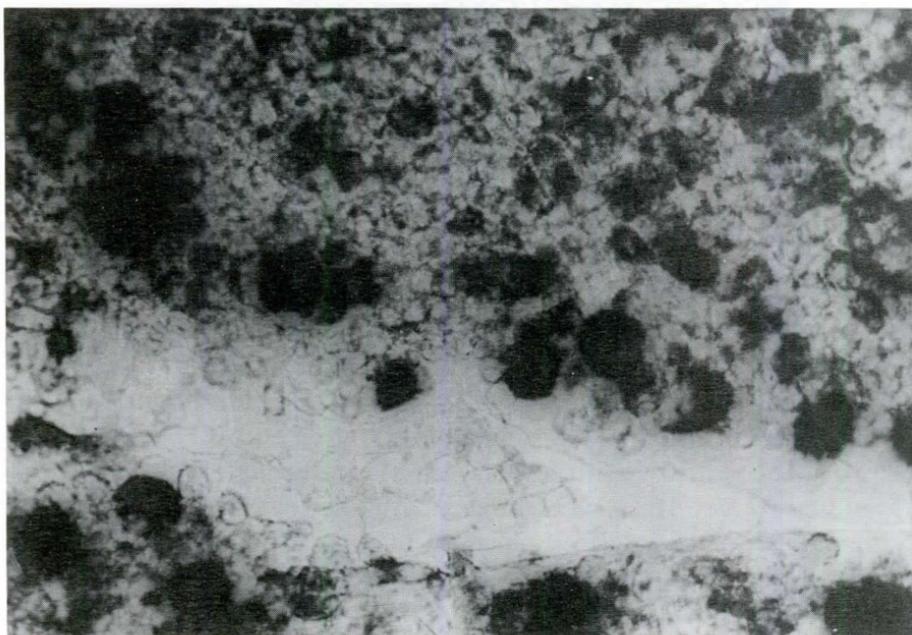
Fig. 3.-ALBUMEN. Cutícula (cu) y células parenquimatosas (c)

La observación de cortes del albúmen directamente al microscopio con luz ultravioleta, sin tinción ni tratamiento alguno, nos pone de manifiesto fluorescencia amarillo-blanquecina espacios intercelulares, y grandes, manchas amarillas fluorescentes dispersadas por el parénquima, pero más acentuadas en la periferia (Fot. 4). Estas sustancias fluorescentes dan positivas las reacciones habituales de alcaloides, Dragendorff, Bouchardat (Fot. 5) y diferencial de Errera.



FOTOGRAFIA N.º 4

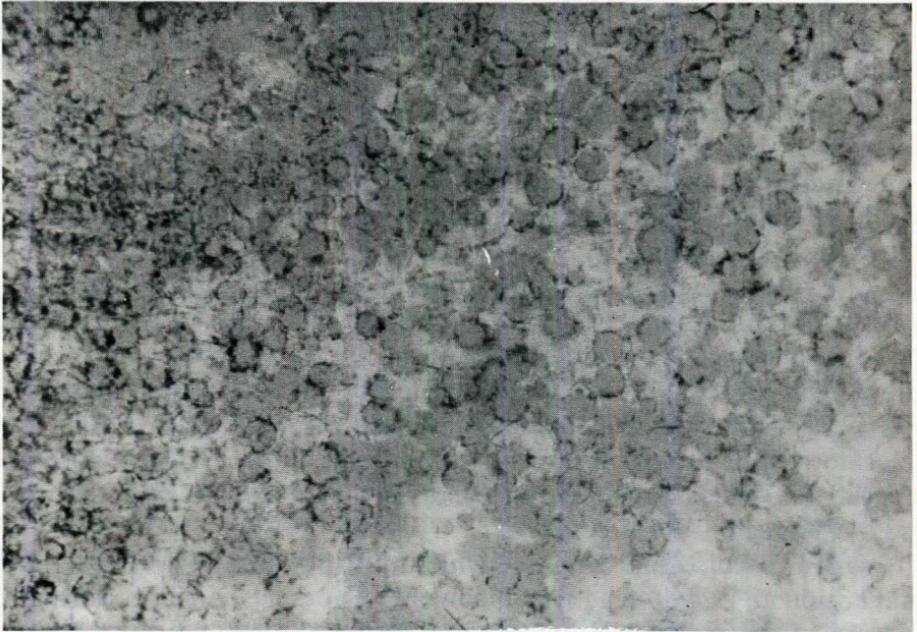
Albúmen: observación al ultravioleta. Espesor: 12. Aumentos: 10 x 10



FOTOGRAFIA N.º 5

Albúmen: tinción con Bouchardat. Espesor: 12. Aumentos: 10 x 10

Con el Sudán III aparecen gran cantidad de gotículas anaranjadas por todo el corte del albúmen (Fot. 6). Estas gotículas, al someter el corte a la acción del alcohol o del calor, y posterior tinción con el sudán III, no desaparecen, por lo que se tratan de grasas.



FOTOGRAFIA N.º 6

Albúmen: tinción con sudán III. Espesor: 12. Aumentos: 10 x 10

## *II. Extracción de sustancias que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides y grasas*

A. Se han establecido las bases idóneas de una posible extracción mediante disolventes, de principios que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides, obteniéndose los siguientes resultados que esquematizamos en la Tabla 1.

1.º Tras mantener los cortes durante dos horas en medio acuoso neutro, lo sometemos dos horas a la acción de los diversos reactivos disolventes, lavamos con agua y observamos al microscopio las posibles alteraciones.

El corte teñido y observado sin la acción de reactivos disolventes, aparece con precipitados especialmente en periferia.

En los cortes mantenidos dos horas a la acción del éter sulfúrico, desaparecen totalmente los precipitados, mientras que los sometidos a la acción del éter de petróleo siguen conteniéndolos.

Tanto los sometidos a la acción del alcohol de 96° como los sometidos a la acción del alcohol tartárico al 1%, no presentan apreciable variación en el contenido.

Los cortes sometidos a la acción del acetato de etilo y los sometidos a la acción del benceno, presentan pocos precipitados, lo que indica que son disueltos con lentitud.

El cloroformo también disuelve los precipitados, quedando el corte muy clarificado.

2.º El corte mantenido dos horas en medio alcalino (NaOH 1N), lavado y teñido sin someterlo a la acción de reactivos disolventes, a penas presenta precipitados. Tanto el éter sulfúrico como el éter de petróleo y el benceno, disuelven totalmente los principios.

El alcohol de 96°, alcohol tartárico al 1%, acetato de etilo y cloroformo, dejan alguna traza por periferia, sin lograr que desaparezcan los pocos precipitados observados en los cortes sometidos sólo a la acción del medio.

3.º El corte mantenido en medio ácido ( $H_2SO_4$  1N) y teñido sin acción alguna de reactivos disolventes, aparece con gran cantidad de precipitados, especialmente en la periferia, y con gran semejanza a los cortes mantenidos en medio neutro sin acción de reactivos disolventes.

El éter sulfúrico y el cloroformo disuelven los precipitados, pero no totalmente, ya que quedan trazas principalmente en la periferia.

El éter de petróleo y el alcohol tartárico al 1% no disuelven los precipitados, apareciendo por todo el corte, principalmente en periferia.

El alcohol de 96° y el benceno disuelven totalmente los precipitados, desapareciendo tanto de periferia como del resto del corte.

B. Por el mismo protocolo establecido anteriormente, se ha determinado las condiciones idóneas para la extracción de materias grasas, llegándose a las siguientes conclusiones (Tabla 2):

1.º Tras mantener el corte histológico dos horas en medio acuoso neutro, lo sometemos dos horas a la acción de diferentes reactivos disolventes, lavamos, teñimos durante cinco minutos en pocillo con

TABLA 1.—Resultados de la extracción mediante reactivos disolventes de sustancias que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides

<u>MEDIO</u>	<u>NEUTRO</u>	<u>ALCALINO</u>	<u>ACIDO</u>
Acuoso	—	++	—
Eter sulfúrico	+++	+++	++
Eter de petróleo	—	+++	—
Alcohol 96°	—	++	+++
Alcohol tartárico 1%	—	++	—
Acetato etilo	+	++	+
Benceno	++	+++	+++
Cloroformo	+++	++	++

No disuelve (—); Disuelve poco (+); Disuelve pero quedan trazas (++); Disuelve totalmente (+++).

sudán III, lavamos de nuevo con agua y observamos las distintas acciones de los reactivos disolventes en las diferentes condiciones de la experiencia.

El corte teñido y observado sin la acción de reactivos disolventes, aparece totalmente cubierto de manchas redondeadas lipídicas, no solubles en alcohol, no volátiles al calor y de color anaranjado.

Con el éter sulfúrico aparecen pequeñas gotas de grasa por el interior del corte y acúmulo en periferia.

Con el alcohol de 96° y con la disolución alcohólica de ácido tartárico al 1% aparece el corte cubierto de pequeñas gotas de grasa y acúmulo en periferia.

Los cortes sometidos al éter de petróleo presentan acúmulo en periferia, pero menos, y gotas pequeñas por todo el corte.

Tanto con el acetato de etilo como con el benceno, sólo aparece tinción de grasas en una delgada franja acumulada en la periferia.

Los sometidos a la acción del cloroformo, al igual que ocurría con los sometidos a la acción del acetato de etilo y el benceno, no presentan traza alguna de lípidos en su interior.

2.º Los cortes sometidos al medio alcalino (NaOH 1N), una vez lavados y teñidos con sudán III, sin la acción de reactivos disol-

ventes, observamos que aparecen con menos lípidos que en el medio acuoso neutro, pero hay acúmulo de grasa en la periferia.

Tanto el alcohol de 96° como el alcohol tartárico al 1%, aparecen pequeñas gotas por todo el corte y acúmulo de grasa en la periferia.

Con el éter sulfúrico y el éter de petróleo, aparecen bastantes gotas de grasa por todo el corte y algo de acúmulo en periferia.

Con el acetato de etilo a penas hay trazas en el corte y poco acúmulo en periferia.

Tanto con el benceno como con el cloroformo, se acumulan las grasas en la periferia y además aparecen pequeñas gotas coloreadas por todo el corte.

3.º Los sometidos a medio ácido ( $H_2SO_4$  1N), una vez lavados y teñidos con sudán III, sin acción de reactivos disolventes, aparecen cubiertos de gotas de grasas y con acúmulo en periferia.

Con éter de petróleo y éter sulfúrico, aparecen las grasa acumuladas en periferia y gotas sin a penas colorear por todo el corte. Igualmente ocurre con el alcohol de 96°.

En el alcohol tartárico al 1% aparece acúmulo en periferia y pequeñas gotas coloreadas por todo el corte. Lo mismo ocurre con el acetato de etilo.

Tanto con el benceno como con el cloroformo, aparece coloración sólo en periferia, encontrándose el resto del corte limpio de grasas.

TABLA 2.—Resultados de la extracción de materias de naturaleza grasa

<u>MEDIO</u>	<u>NEUTRO</u>	<u>ALCALINO</u>	<u>ACIDO</u>
Acuoso	—	+	—
Eter sulfúrico	+	++	++
Eter petróleo	+	++	++
Alcohol 96°	—	+	—
Alcohol tartárico 1%	—	+	—
Acetato etilo	++	++	+
Benceno	++	++	+++
Cloroformo	++	++	+++

No disuelve (—); Disuelve poco (+); Disuelve pero quedan trazas (++); Disuelve totalmente (+++).

Como RESUMEN-CONCLUSION podemos afirmar que:

1.º.—Se han establecido las bases idóneas de una posible extracción mediante disolventes, de principios que dan positivas las reacciones habituales de alcaloides, llegándose a las siguientes conclusiones:

- en medio neutro, los disolventes de elección son éter sulfúrico, cloroformo o mezcla de ambos.
- en medio alcalino, resultaron ser así mismo el éter sulfúrico, éter de petróleo y benceno.
- en medio ácido, los disolventes más adecuados serían el alcohol de 96° y el benceno.

2.º.—Por el mismo protocolo establecido anteriormente, se ha determinado las bases idóneas para la extracción de materias grasas que fueron, operar en medio ácido y realizar la extracción con benceno, cloroformo o mezcla de ambos.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BHOJRAJ, N.; BABU, M.; OSMANI, Z. M.; SALETORE, S. A. «*Annona squamosa* seed II: The insecticidal fatty oil». *J. Indian Chem. Soc.*, 16, 179, (1953).
2. BURCK, H. «*Histologische Technik*», Stuttgart, Georg Tieme Verlag, pág. 106, 1966.
3. CABO, J.; PARDO, P.; FRAILE, A. «*Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia*». 4.<sup>a</sup> ed., Granada, págs. 17-19, 1974.
4. CHEEMA, P. S.; DIXIT, D. S.; KOSHI, T.; PERTI, S. L. «Indigenous insecticides. II: Insecticidal properties of seed oil of *Annona squamosa*», *J. Sci. In. Research.*, 17c, 132, (1958).
5. DURODOLA, J. I. «Antitumors effects against sarcoma 180 ascites of *Annona senegalensis*», *Planta Med.*, 28, 32, (1975).
6. PHARMACOPEE EUROPEENNE, Vol. I. Strausbourg, Maisouneuve, págs. 127-222, 1969.
7. HEYWOOD, V. «*Flowering plants of the world*». Oxford, University Press, pág. 30, 1978.
8. HOTO, M. «Etude histochimique et chimique des feuilles de *Lonchocarpus sericus*», *J. Pharm. Belg.*, 18, 10, (1963).
9. JACOBSON, M.; REDFERN, R. E.; MILLS, G. D. «Naturally occurring Insect Growth Regulators. II. Screening of insect and plant extracts as insect Juvenile Hormone Mimics», *Lloydia*, 38, 455, (1975).

10. KAYODE, E.; DURODOLA, J. I. «Antitumor and antibiotic principles of *Annona senegalensis*», *Phytochemistry*, 15, 1.311, (1976).
11. LEBOEUF, M.; STREITH, J.; CAVE, A. «Alcaloides des Annonácees: Alcaloides des écorces de *Cananga odorata* Hook. et Thomson», *Ann. Franc.*, 33, 43, (1975).
12. LLEANDER, G.; SANTOS, A.; SALUD, E.; RIGOR, E. «Tumor inhibitors. I. Alkaloidal constituents of *Uvaria rufa* Blume», *Philippine J. Sci.*, 98, 151, (1969).
13. ROQUES, H. «*Précis de Botanique Pharmaceutique*», Vol. II, París, Libraire Malvine, pág. 245, 1959.
14. STAHL, E. «*Analyse chromatographique et microscopique des drogues*», Stuttgart, Enterprise moderne, pág. 231, 1970.
15. STERNON, W. «*Eléments de Chimie Végétale*», 2.<sup>a</sup> ed., París, págs. 55 y 58, 1942.
16. WARTHEM, D.; GOODEN, E. L.; JACOBSON, M. «Tumor inhibitors: Liriodenine, a cytotoxic alkaloids from *Annona glabra*», *J. Pharm. Sci.*, 58, 637, (1969).