



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS ESPECÍFICOS DE *Piper
carpunya*, CON ACCIÓN ANTI FÚNGICA.”**

AUTOR: LÓPEZ MORALES, LIZBETH NATHALY

DIRECTOR: CÁRDENAS TELLO, CARLOS DELFIN

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ESPECÍFICOS DE Piper carpunya, CON ACCIÓN ANTI FÚNGICA.”*** realizado por la señorita **LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los **requisitos** teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de febrero del 2017

CARLOS DELFÍN CÁRDENAS TELLO
DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES**, con cédula de identidad N° 1723965628, declaro que este trabajo de titulación "**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ESPECÍFICOS DE *Piper carpunya*, CON ACCIÓN ANTI FÚNGICA.**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 15 de febrero del 2017

LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES

C.C 1723965628



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ESPECÍFICOS DE *Piper carpunya*, CON ACCIÓN ANTI FÚNGICA.**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 15 de febrero del 2017

LIZBETH NATHALY LÓPEZ MORALES

C.C 1723965628

DEDICATORIA

Al mentor de mi vida Dios, sin el cual nada de esto hubiera sido posible, a mi familia, mi inspiración, la cual ha sido el motor y la fuerza durante todo el proceso de vida estudiantil.

Lizbeth Nathaly López Morales

AGRADECIMIENTO

A Dios, mi gran y mejor educador que me ha acompañado durante todo el trayecto de mi vida tanto estudiantil como diaria, por ser la luz para llegar a la meta.

Dedico mi tesis, todo mi esfuerzo y dedicación, a mis amados padres Iván y Lili el tesoro de mi vida, que con su infinito amor, enseñanza, paciencia y ejemplo fueron la clave para alcanzar este logro.

A mi hermano Anthony, gracias a su apoyo, comunicación diaria y sobre todo su cariño hizo posible que día a día las cargas sean más fáciles de sobrellevar.

Dedico todo mi estudio a mi hermana, mi compañera de vida, mi fuerza y mi mejor amiga Emely, que gracias a su amor infinito y su ejemplo a seguir, será mi motivadora y mi fuente de inspiración.

A mis amigos los cuales estuvieron pendientes durante todo el trayecto de mi carrera, con su apoyo y cariño logramos tener una gran y fortalecida amistad a pesar de distancia, sobre todo a mi gran e incondicional amigo Andrés y a mi amiga Grace que sin importar las circunstancias me hicieron sentir su apoyo y cariño durante este tiempo de vida estudiantil.

Agradezco a un gran hombre que con sus cualidades infinitas llenaron mi vida no solo de amor sino de enseñanzas diarias, la ayuda brindada ha sido sumamente importante.

A mi querida institución IASA la cual dejo personas valiosas en mi camino estudiantil, contando con su gran grupo de educadores impartiendo no solo conocimientos educativos, sino también conocimientos morales y culturales.

Lizbeth Nathaly López Morales

ÍNDICE DE CONTENIDOS**CARÁTULA**

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación del problema.....	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general de proyecto	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 Especie en estudio.....	3
2.2 Familia Piperáceae	3
2.2.1 Descripción Botánica de la especie <i>Piper carpunya</i> (Ruiz & Pav ...	4
2.2.2 Taxonomía	5
2.3 Extractos botánicos.....	6
2.3.1 Generalidades.....	6
2.3.2 Métodos para la obtención de extractos botánicos	7
2.3.3 Los extractos botánicos, una alternativa de control anti fúngico.....	7
2.3.3.1 Destilación por arrastre de vapor	8
2.3.3.2 Maceración	8
2.3.3.3 Percolación	9
2.3.3.4 Decocción	9
2.3.3.5 Infusión	9
2.3.3.6 Digestión	9

2.3.3.7	Destilación con agua.....	9
2.3.3.8	Extracción con disolventes.....	10
2.3.3.9	Extracción por fluidos supercríticos	10
2.4	Características Fitoquímicas de <i>Piper carpunya</i>	10
2.5	Acción anti fúngica	11
2.6	Metabolitos secundarios	11
2.6.1	Cromatógrafo de gases acoplada a masas.....	12
2.6.2	Capacidad del Equipo	13
2.6.3	Manejo del Equipo	14
2.7	Hipótesis	14
2.7.1	Ho:	14
2.7.2	H1:	14
CAPÍTULO III		
METODOLOGÍA		15
3.1	Materiales	15
3.1.1	Ubicación del lugar de investigación	15
3.1.1.1	Ubicación política	15
3.1.1.2	Ubicación geográfica.....	15
3.1.1.3	Ubicación ecológica	16
3.1.1.4	Material experimental.....	16
3.1.1.5	Material de laboratorio	16
3.1.1.6	Reactivos	17
3.1.1.7	Equipos de laboratorio	18
3.2	Métodos	18
3.2.1	Preparación de los Extractos	18
3.2.1.1	Recolección de la materia prima	18
3.2.1.2	Tratamiento de la muestra	18
3.2.1.3	Deshidratación de las muestras.....	18
3.2.1.4	Molienda y pesaje	19
3.2.2	Técnicas de extracción	19
3.2.2.1	Obtención del extracto por hidrodestilación.	19
3.2.2.2	Obtención del extracto por maceración.....	19

3.2.3	Tamizaje fitoquímico	20
3.2.4	Protocolos de tamizaje fitoquímico	21
3.2.4.1	Protocolo para reconocimiento de alcaloides.....	22
3.2.4.2	Protocolo para reconocimiento de taninos y fenoles.....	22
3.2.4.2.1	Ensayo del cloruro férrico	22
3.2.4.3	Protocolo para reconocimiento de saponinas	23
3.2.4.3.1	Ensayo de espuma	23
3.2.4.4	Protocolo para reconocimiento de cumarinas	23
3.2.4.5	Protocolo para reconocimiento de flavonoides	23
3.2.4.5.1	Ensayo de shinoda	23
3.2.4.5.2	Ensayo de antocianinas	24
3.2.4.6	Protocolo para reconocimiento de quinonas	24
3.2.4.6.1	Ensayo de böntrager	24
3.2.5	Condiciones del análisis cromatográfico	25

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27	
4.1	Evaluación del solvente orgánico.....	27
4.2	Identificación y caracterización de metabolitos secundarios por cromatografía de gases acoplado a masas.	30
4.2.1	Hidrolatos de <i>Piper carpunya</i>	31
4.2.2	Macerado de <i>Piper carpunya</i>	34
4.3	Caracterización de metabolitos secundarios Presentes.....	36
4.3.1	Macerado de <i>Piper carpunya</i>	37
4.3.2	Hidrolato de <i>Piper carpunya</i>	38
4.3.3	Caracterización de los componentes registrados en el Hidrolato de <i>Piper carpunya</i>	40
4.3.4	Caracterización de los componentes registrados en el macerado- etanol de caña de <i>Piper carpunya</i>	43
4.3.5	Caracterización de los componentes registrados en el Macerado en Etanol comercial de <i>Piper carpunya</i>	44
4.3.6	Caracterización de los componentes registrados en el Macerado en agua de <i>Piper carpunya</i>	45
4.4	Discusión	47

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1 Conclusiones	50
5.2 Recomendaciones	51
5.3 Bibliografía	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación botánica de <i>Piper carpunya</i>	5
Tabla 2	Pruebas de los principales metabolitos a describirse.....	21
Tabla 3	Significación considerada para reportar los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico.....	21
Tabla 4	Condiciones del análisis cromatográfico	26
Tabla 5	Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico, mediante hexano como solvente extractor de <i>Piper carpunya</i>	27
Tabla 6	Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico mediante etanol comercial EtOH como solvente extractor de <i>Piper carpunya</i>	28
Tabla 7	Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico mediante etanol de caña como solvente extractor de <i>Piper carpunya</i>	28
Tabla 8	Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico mediante agua como solvente extractor de <i>Piper carpunya</i>	29
Tabla 9	Metabolitos descritos en hidrolato y macerado de <i>Piper carpunya</i>	36
Tabla 10	Metabolitos descritos en hidrolato y los macerados de <i>Piper carpunya</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Especie <i>Piper carpunya</i>	4
Figura 2	Análisis de metabolitos secundarios presentes en <i>P. carpunya</i> mediante tamizaje fitoquímico con 4 solventes orgánicos Hexano (A), Etanol comercial (B), Etanol de caña (C) y agua (D).....	30
Figura 3	Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de <i>P. carpunya</i> , en donde se captó 2-Isopropoxietil-amina, perteneciente al grupo de aminas.	31
Figura 4	Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de <i>P. carpunya</i> en el cual se detectó 1-Propanamina.....	31
Figura 5	Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de <i>P. capunya</i> , en el cual se encontró D-Norleucina	32
Figura 6	Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de <i>P. carpunya</i> , en donde se captó Pent-4-enil-amina perteneciente al grupo de aminas	32
Figura 7	Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de <i>P. carpunya</i> , en donde se captó 2- 1,8-Diamino-octano, de igual forma perteneciente al grupo de aminas	33
Figura 8	Espectro de masas (GC-MS) del macerado de <i>P. carpunya</i> , en el cual se encontró Butanal, 3 Hidroxi.....	33
Figura 9	Perfil cromatográfico (GC-MS) del hidrolato de <i>P. carpunya</i> ; captándose a: 2- Isopropoxietil-amina barrido a 2653 a un (Tr) de 9.91 min; 1-Propanamina barrido a 2204, a un (Tr) de 11.64 min; D-Norleucina barrido a 2379, a un (Tr) de 12.56 min; Pent-4-enil-amina barrido a 2417, a un (Tr) de 12.76 min; 1,8-Diamino-octano, barrido a 2671 a un (Tr) de 14.09 min y Butanal, 3 Hidroxi barrido a 3165 a un (Tr) de 16.68 min.....	34
Figura 10	Espectros de masas (GC-MS) del macerado de <i>P. carpunya</i> . en Etanol-caña, en el cual se encontró Etil-amina.	34
Figura 11	Espectro de masas (GC-MS) del macerado de <i>P. carpunya</i> . en Etanol-caña, en el cual se encontró 1,4-Butan,di-amina	35

- Figura 12 Se muestra el perfil cromatográfico (GC-MS) del macerado de *P. carpunya*. en EtOH-caña, captándose a: Etil-amina barrido a 1338 a un (Tr) de 7.10 min, 1,4-Butan,di-amina a 2379 y a un (Tr) de 12.56 min 35
- Figura 13 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya* en Etanol-caña, en donde se captó picos a los 53.648; 58.589 ; 62.181min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas. 37
- Figura 14 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya*. en Etanol-comercial, en donde se captó picos más relevantes: 50.499; 53.659; 58.124; 58.274; 58.420; 62.080; 63.687; 65.161; 67.864; 70.287 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas. 37
- Figura 15 Perfil cromatográfico del hidrodestilado de *P. carpunya*, en donde se captó picos más relevantes tales como: 14.284; 30.150; 34.941; 39.608; 42.713; 49.040; 53.514; 58.535; 62.160 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas. 38
- Figura 16 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya* en agua en donde se captó picos más relevantes en la maceración en H₂O 39.620; 42.013; 52.291; 53.735; 53.904; 54.660; 58.614; 62.188; 65.195; 66.351 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas 38

RESUMEN

En la presente investigación se realizaron pruebas fitoquímicas para comprobar la presencia de los metabolitos secundarios mayoritarios, presentes en los fitofluidos de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) utilizados como potenciales extractos anti fúngicos. Estos ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y Centro de análisis ambiental y de aguas del EMAP, para identificar y caracterizar metabolitos secundarios específicos de *Piper carpunya*. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, los metabolitos secundarios presentes en los fitofluidos de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.), especie vegetal colectada en la comunidad de Chiguilpe, Santo Domingo de los Tsáchilas. Previamente se ejecutó un tamizaje fitoquímico en donde se comprobó la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas y quinonas, se realizaron dos métodos de obtención del extracto; por maceración e hidrodestilación, los métodos de obtención fueron empleando 4 solventes orgánicos (Etanol comercial, Etanol de caña, Agua y Hexano). Tanto en el hidrolato, como en el macerado en etanol de caña, los cromatogramas realizados registraron la presencia de Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1, 8-Di-amino-octano, Butanal y 3-hidroxi Etil-amina, 1,4-Butan, di-amina. Para corroborar los resultados, se realizó cromatografías complementarias que arrojaron 29 compuestos nuevos.

PALABRAS CLAVE:

- **CROMATOGRAFÍA**
- **HIDRODESTILACION**
- **METABOLITO SECUNDARIO**
- **MACERADO**
- ***Piper carpunya***

ABSTRACT

In the present investigation, we realize a phytochemical test to verify the presence of *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) major secondary metabolites in phytofluids, used like potential antifungal extracts. These tests were carried out in the Laboratory of Agropecuaria Engineering IASA I, University of Armed Forces ESPE and Center of environmental analysis and waters of the EMAP, to identify and to characterize specific secondary metabolites of *Piper carpunya*. The objective of the present investigation was to identify and to characterize by gas chromatography connected to spectrometry of mass (GC-MS) techniques, the plant secondary metabolites of *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.), collected from the community of Chiguilpe, Santo Domingo of the Tsáchilas. Previously a phytochemical screening was persuaded to identify the presence os various types of chemical compound such as Saponins, tannins, flavonoids, coumarins and quinones For the extraction of the plant secondary metabolites and for the cualitative determination were done two extraction methods such as maceration and hidrodestilation. The solvents used for this extraction methods were represent by (commercial ethanol, cane ethanol, water and hexane), determining itself to the best reliable extractor. In both the hydrolyzate and the cane ethanol macerated, the chromatograms performed revealed the presence of the compounds Isopropil-etil-amine, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amine, 1,8-Give-amino-octane, Butanal and 3-hidroxi Etil-amine, 1,4-Butan, di-amine. In order to corroborate the results, during complementary chromatographies have been identifier new registries of metabolites like 29 more.

KEY WORDS:

- CHROMATOGRAPHY
- HIDRODESTILACION
- SECONDARY METABOLITE
- MACERATED
- *Piper carpunya*

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación del problema

Varios extractos de plantas alelopáticas presentan características anti fúngicas, por el contenido de metabolitos secundarios (Cárdenas, 2014)

Los productos naturales son soluciones amigables al medio ambiente, y el desarrollo de los mismos son alternativas orgánicas inocuas (Pérez, 2012).

Las técnicas de obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios en plantas, son métodos analíticos que requieren protocolos específicos de identificación (Cárdenas, 2014).

Varios estudios dan a conocer que muchas plantas sintetizan metabolitos secundarios con principios activos potentes de acción biológica impredecible. (Moreno *et al.*, 2010).

El control ecológico utilizando plantas con propiedades medicinales y en especial aquellas consideradas alelopáticas por las propiedades que presentan están siendo cada vez más frecuentes (Cárdenas, 2014).

Piper carpunya es una especie que es utilizada con fines medicinales y otros de uso etno-biológicos por los Tsáchilas, es una planta endémica del Ecuador muy poco estudiada por lo tanto es prioritario verificar sus propiedades alelopáticas (RENAJABO, 2008).

El estudio de la especie *Piper carpunya* permite identificar una gran variedad de metabolitos secundarios entre los más importantes están los liganos, neoliganos, piperolidas, flavonas y flavononas entre otras, las cuales presentan una extensa gama de actividades biológicas (Rojas , 2015).

Los extractos del género *Piper* han sido probados en varios estudios contra bacterias y hongos en cultivos como alternativa de protección, las cuales representan una buena alternativa para la búsqueda de nuevos

métodos de control para hongos y bacterias y al aprovechar sus metabolitos secundarios como fitoalexinas es de gran ayuda para el control de fitopatógenos y de este modo minimizar el uso de agroquímicos (Córdova *et al.*, 2015).

En este estudio se analizó la capacidad anti fúngica que posee el material vegetal del genero *Piper carpunya* mediante hidrodestilación y diferentes técnicas de maceración con el uso de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (AGILENT) y (VARIAN 3600), tomando en cuenta que los aceites esenciales de este género Piper son conocidos por efectuar actividad antimicrobiana y anti fúngica el cual actúa destruyendo la membrana microbiana por los constituyentes lipofilicos que poseen (Alzate *et al.*, 2009).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general de proyecto

Identificar y caracterizar mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, los metabolitos secundarios presentes en los fitofluidos obtenidos de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.).

1.2.2 Objetivos específicos

Evaluar el solvente orgánico más eficaz en la extracción de metabolitos secundarios presentes de los fitofluidos de *Piper carpunya*.

Realizar pruebas de identificación cualitativa de los extractos obtenidos mediante tamizaje fitoquímico.

Caracterizar por cromatografía de gases a los metabolitos presentes en los fitofluidos de *Piper carpunya* y evidenciarlos en base al NIST 14

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Especie en estudio

Piper carpunya (Ruiz & Pav). Conocida como pinku o guaviduca, es una planta utilizada por la nacionalidad Tsáchilas para contrarrestar enfermedades dérmicas, aunque es muy frecuente también utilizar el zumo y la infusión de sus hojas en desinfecciones por las propiedades antisépticas, antifúngicas, estimulantes y relajantes que posee (Flores, 2006).

P. carpunya, es una planta que en el Ecuador se registra desde los 350 m s.n.m. hasta los 3000 m s.n.m., le conocen con varios nombres vernáculos según las zonas de vida y poblaciones, En el Ecuador es llamada matico tropical, matico de montaña, guaviduca y *Piper carpunya*, el “pinku” en *idioma safiqui* es una planta que se desarrolla entre los 500 a 1000 m s.n.m., es una especie de olor algo picante característico a especería, de la Familia Piperaceae (RENAJABO, 2008).

Esta especie vegetal es conocida y puesta en práctica nivel de todo el Ecuador tanto en la parte botánica como en la parte medicinal, estudios fitoquímicos nos permiten conocer una gran variedad de metabolitos secundarios contando con beneficios tanto para la salud como para controlar plagas, insectos y bacterias en la parte agrícola, el 12% de la especie *P. carpunya* han sido tomadas de diferentes zonas para análisis fitoquímicos correspondiendo así aproximadamente a 84 especies (Trabadela *et al.*, 2009).

2.2 Familia Piperáceae

La familia Piperácea cuenta con más de 3610 especies agrupadas de 10 a 12 géneros, de los cuales, el más representativo es el género *Piper*, debido a la diversidad de especies contenidas en él que son empleadas en una gran variedad de industrias, como: la alimenticia, farmacológica y agrónoma, representando una gran importancia económica (Riofrío, 2012).

Entre las especies del género *Piper* se encuentran distribuidos a nivel mundial tanto en regiones tropicales y subtropicales del mundo de las cuales se consideran como plantas medicinales en Latinoamérica, en la realización de estudios con este género se conoce el aislamiento de diferentes productos naturales biológicamente activos y sus aceites esenciales los cuales han sido evaluados e identificados valorando así sus propiedades bioactivas como actividad antimicrobiana, antimutagenica, antioxidante y larvicida. (Ordaz *et al.*, 2011).

Esta especie indica hojas que pueden o no tener glándulas aromáticas; pero que a lo largo se han descrito diferentes actividades biológicas, como las observadas en: *P. hispidium*, *P. tuberculatum*, *P. arboreum*, *P. scutifolium*, *P. hoffansggiam* y *P. ridleyi* contra el hongo del género *Cladosporium* (Parra , 2011).

La especie *P. carpunya* posee actividades antiinflamatorias, anti-secretoras y anti-*Helicobacter pylori* tanto de sus hojas, tallo, flor o semilla, de esta manera se realizan estudios para mediante diferentes tipos de obtención de extractos relacionarlos así, con su actividad biológica (Quilez *et al.*, 2010).

2.2.1 Descripción Botánica de la especie *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.)



Figura 1 Especie *Piper carpunya*

Piper carpunya es un árbol de aproximadamente 2-3m de alto, sus hojas son simples, alternas y de color verde oscuro en el haz y un poco más claro en el envés, son lanceoladas hasta elípticas, posee inflorescencias en espigas que van de color blanco a verde con 3mm de diámetro, sus flores son agrupadas, pequeñas, redondeadas y su característica principal es el de poseer 3 estigmas largos (Castillo , 2014).

Los patrones de distribución de *Piper carpunya* se diferencian desde especies endémicas hasta las que se encuentran extensamente distribuidas geográficamente Existen beneficios que brinda dicha especie las cuales son conocidas de acuerdo a las zonas en las que se encuentran tales como Zamora Chinchipe, Loja y Santo Domingo de los Tsáchilas (Quezada, 2012).

2.2.2 Taxonomía

Tabla 1
Clasificación Botánica de *Piper carpunya*

REINO	VEGETAL
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>
Especie:	<i>Piper carpunya</i>

Fuente: (Yong., 2004)

Varios géneros de Piperaceae han sido utilizadas como potenciales controladores de hongos y bacterias que suelen causar infecciones cutáneas, otitis, osteomielitis, artritis, neumonía, tos, entre otras (Áricarpa, 2012). Pero han sido nulos los estudios sobre la aplicación de los extractos vegetales de

estas plantas en el control de fitopatógenos, que atacan a otras plantas ornamentales.

Recientemente, durante el estudio de varias plantas con propiedades medicinales se han detectado e identificado metabolitos secundarios que suelen ser los responsables de los efectos fungicidas, insecticidas y bactericidas en contra de los agentes patógenos frecuentes, dándole un resurgimiento a la alelopatía, y convirtiéndola en un “fenómeno diagnóstico” para la búsqueda de moléculas con actividades biológicas importantes (Olivero *et al.*, 2009).

En la actualidad, la alelopatía se la considera como la base para identificar compuestos y biomoléculas de efectos fungicidas, herbicidas, acaricidas y otros biocontroladores alternativos orgánicos. Así, una gran diversidad de productos con potencial alelopático ha sido registrados y evaluados como moléculas bases para desarrollar varios compuestos como herbicidas, insecticidas y fungicidas donde se encuentran terpenos, cumarinas, benzoquinonas, alcaloides, entre otros (Olivero *et al.*, 2009).

2.3 Extractos botánicos

2.3.1 Generalidades

Las plantas se caracterizan por poseer extractos medicinales debido a la presencia de determinados compuestos de origen natural con principios activos, además de ser el producto final del metabolismo secundarios de las plantas, se encuentran formados por una gran diversidad de químicos volátiles especialmente de terpenoides, compuestos aromáticos y alifáticos, se los puede obtener de cualquier parte de la especie vegetal ya sea hojas, rices, tallo, flores, capullos, etc (Ordaz *et al.*, 2011).

Los aceites esenciales son constituyentes principales de terpenos y cumplen funciones ecológicas como la atracción de polinizadores y causar efectos alelopáticos además de ser utilizados como una alternativa control, dentro de las nuevas tendencias en el marco de una agricultura sostenible y en reemplazo de los plaguicidas sintéticos (Díaz , 2012).

2.3.2 Los extractos botánicos, una alternativa de control anti fúngico

Ecuador es uno de los países en donde se cultiva ampliamente flores de verano, es uno de los rubros más importantes tomando en cuenta el de mayor relevancia es el cultivo de rosas con más de 60 variedades cultivadas, en donde el 80% representa a las exportaciones anuales (Álvarez , 2013).

La nueva tendencia en producir flores orgánicas mediante un manejo ecológico, ha sido una de las prioridades en los últimos años, por la exigencia de los mercados internacionales. (Proecuador, 2013).

El uso de los extractos vegetales está siendo frecuente en varios cultivos florícolas para el control de plagas en especial hongos. Su utilización ha generado gran interés en las plantas que muestran este potencial. En varias especies utilizadas se han registrado sustancias bioactivas, metabolitos secundarios o ingredientes activos que de acuerdo con las investigaciones son los posibles precursores de los efectos anti fúngicos (Marcano *et al.*, 2005).

En la investigación que se presenta, se ha considerado a los extractos de la especie *Piper carpunya* como uno de los potenciales anti fúngicos más efectivos para el control de fitopatogenos teniendo en cuenta que este efecto se da debido a la presencia de metabolitos secundarios en ciertas partes de la planta (Rodríguez *et al.*, 2000).

2.3.3 Métodos para la obtención de extractos botánicos

Para la obtención de extractos vegetales existen diferentes métodos, por lo general se utilizan procesos extractivos simples, debido a que hay partes de la planta que no son volátiles o inestables con la temperatura, mediante agua o con solventes orgánicos, estos se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

-Extracción con agua: infusión, destilación por arrastre de vapor y decocción.

-Extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhelt, digestión y por fluido supercrítico.

La selección de uno de los métodos dependerá siempre de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con la que se disponga para la extracción (Gonzales , 2004).

2.3.3.1 Destilación por arrastre de vapor

Esta técnica es llamada comúnmente también hidrodestilación, extracción por arrastre, hidrodifusión o hidroextracción; pues, el principio fundamental del proceso es el mismo. Por lo general, se usa vapor sobrecalentado o saturado, que fluye a través del material vegetal para calentar la materia prima y así liberar los componentes volátiles de la muestra, que son condensados por un refrigerante, y del cual se obtiene un extracto líquido (hidrodestilado) y el aceite esencial contenido en las células vegetales, en dicha destilación se puede utilizar un gas inerte, la cual condensa formando una fase inmiscible, aquí cada líquido cumple con su propia presión de vapor (Cerpa, 2007).

2.3.3.2 Maceración

La maceración es una técnica de extracción donde la materia prima, debidamente fragmentada, se coloca en un solvente (agua, etanol o metanol) durante un tiempo prolongado o hasta que penetre y disuelva los principios activos de las porciones solubles. Este proceso genera dos productos, el sólido propio del extracto y el líquido de extracción; que pueden ser empleados de acuerdo a las necesidades del usuario (Gonzales , 2004).

Para extraer el aceite esencial, depende que tipo de líquido se utilice para el tiempo de reposo. Si es en agua se lo reserva durante un día y si es en alcohol o agua se lo deja dos días, conociendo previamente las características de cada especie (Orozco, 2014).

2.3.3.3 Percolación

El método de percolación se realiza una vez obtenido el material macerado con agua, se adiciona agua fría hasta cubrir por completo al material vegetal se lo deja en reposo durante 1 día para lograr así que los elementos solubles en agua lleguen a equilibrio con el líquido, transcurrido este tiempo se separa el líquido y mediante evaporación se llega a la concentración deseada.

2.3.3.4 Decocción

El objetivo de la decocción es utilizar partes duras de la planta que tengan un poco de dificultad obtener sus principios activos como corteza, frutos, hojas, raíces o semillas, mediante este método puede degradar algunos principios activos debido a las altas temperaturas (Cañigüeral *et al.*, 2015).

2.3.3.5 Infusión

Sobre el material vegetal se coloca agua hirviendo luego se lo cierra herméticamente y muy seguro para evitar la pérdida de principios activos, se deja reposar de 5-15 minutos, posterior a este tiempo se filtra y se utiliza su aceite esencial (Estrada, 2010).

2.3.3.6 Digestión

En el proceso de Digestión se coloca el solvente caliente sin sobrepasar temperaturas de 50°C junto con el material vegetal molido, dicha temperatura ayuda a una mejor extracción de compuestos debido a que la solubilidad de las especies vegetales aumenta junto con la temperatura (Gonzales , 2004).

2.3.3.7 Destilación con agua

Este método se encuentra dentro del arrastre de vapor aquí el material vegetal se encuentra en contacto con el agua hirviendo, esto se encuentra separado del agua hirviendo en la parte inferior el cual se lo coloca en una

rejilla y así si se calienta lentamente se reduce notablemente el olor causado por el componente vegetal (Cerutti *et al.*, 2004).

2.3.3.8 Extracción con disolventes

Este método de extracción se lo realiza con disolventes volátiles tales como alcohol o cloroformo con la muestra seca y molida, los disolventes solubilizan la esencia además de extraer grasas y ceras, este método se lo realiza solo a nivel de laboratorio debido a que en escalas más grandes resulta muy costoso (Peredo *et al.*, 2009).

2.3.3.9 Extracción por fluidos supercríticos

Cuando un compuesto se somete a condiciones mayores de su punto crítico se encuentra en estado supercrítico, este estado es similar a la del líquido y en viscosidad a la de un gas. Este método permite controlar propiedades como difusión, viscosidad y densidad del fluido mediante cambios de temperatura (Esquivel *et al.*, 2007). Por lo general se utiliza dióxido de carbono y se trata con una temperatura moderada en donde son controlados por un regulador de contrapresión y un calentador (Peredo *et al.*, 2009).

2.4 Características Fitoquímicas de *Piper carpunya*

Piper carpunya cuenta con un sin número de sustancias con bajo peso molecular como son los metabolitos secundarios que son esenciales y una gran alternativa ya que actúa como biocontrolador. Por esta razón seleccionamos la especie en estudio por sus diversos usos y actividad biológica para el debido control de enfermedades que se presentan en el ámbito agrícola (Celis *et al.*, 2008).

La familia piperaceae en especial *Piper carpunya*, especie en estudio, son de gran alternativa y una gran fuente de beneficios para el control de plagas en general por las sustancias con alto potencial insecticida, las hojas de dicha especie se recolectaron en Santo Domingo y esto indica que en varios lugares

de la zona se puede utilizar esta especie como manejo integrado de plagas y control anti fúngico mostrando grandes resultados (Krinski *et al.*, 2016).

2.5 Acción anti fúngica

Las familias Piperáceas cuentan con metabolitos secundarios las cuales tienen propiedades cicatrizantes por los taninos que poseen y la capacidad de metabolizar con las proteínas del tejido epitelial (Cruz , 2009).

Varios géneros de Piperáceas han sido utilizadas como potenciales controladores de hongos y bacterias que suelen causar infecciones cutáneas, otitis, osteomielitis, artritis, neumonía, tos, entre otras (Áricarpa, 2012). Pero han sido nulos los estudios sobre la aplicación de los extractos vegetales de estas plantas en el control de fitopatógenos, que atacan a otras plantas ornamentales (Áricarpa, 2012).

Las piperazinas, piperinas y piperidina, son ingredientes activos obtenidos de plantas del género Piper, nombrados originalmente debido a su similitud química y sintetizadas como antihelmínticos son de uso en medicamentos veterinarios (Campodocs, 2012).

El número de anti fúngicos que se encuentran disponibles para el tratamiento de infecciones por hongos son muy escasos, y el hallazgo de los mismos se fundamenta en la investigación de varias fuentes de compuestos bioactivos y aquí intervienen especies de plantas, estas plantas sintetizan metabolitos como fitoanticipinas y fitoalexinas que se utilizan para controlar la infección (Alzate *et al.*, 2009).

2.6 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que se sintetizan por el organismo tomando en cuenta que no poseen una actividad directa en el crecimiento, la inexistencia de algún metabolito secundario no impide la vivencia del mismo, los metabolitos actúan de manera que mantiene el funcionamiento de sistemas metabólicos cuando no hay crecimiento, estos se producen por rutas anabólicas específicamente cuando no se encuentra en actividad (García *et al.*, 2007).

Los metabolitos secundarios los cuales son producidos por los microorganismos establecen la interfase química entre estos y el resto de seres vivos y esta interacción es de gran importancia y relevancia para la obtención de nuevos metabolitos activos. La interacción permite conocer el nivel de origen microbiano y de naturaleza diferente a los antibióticos (García *et al.*, 2007).

Para la identificación de metabolitos secundarios que se reconocieron mediante tamizaje fitoquímico en los extractos de *Piper carpunya* se realizaron mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas según los protocolos de (Áricarpa, 2012).

2.6.1 Cromatógrafo de gases acoplada a masas

Los equipos de cromatografía, por lo general suelen ir acoplados a distintas herramientas como un espectro de masas, un detector de flama inducida, los gases ideales que lo acompañan, una biblioteca de espectros que detectan la señal, filtros de emisión y otras características.

Se realizaron dos cromatografías indistintamente con las mismas muestras de los extractos vegetales separadas en un periodo de ocho días. Esta técnica está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas, una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado (Andrade, 2010).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica analítica que permite separar los componentes de una mezcla compleja y analizar individualmente cada uno de los componentes, asignándoles un espectrograma de masas (Parra , 2011).

La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas es capaz de identificar sustancias puras, pero es necesario el separar previamente sus componentes ya que cuenta con un espectro complejo, por lo tanto, debido a esto la asociación de las técnicas de Cromatografía de gas

y masas de espectros da como resultado a una técnica combinada GC-MS, dicha técnica nos permitirá separar e identificar mezclas de mayor grado de dificultad (Gallego, 2011).

Esta técnica integra un sin número de herramientas que nos ayudan a separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. Existen grandes ventajas al utilizar cromatografía de gases debido a que dispone detectores, de igual manera los métodos son más simples, rápidos, económicos y más sensibles comparados con cromatografía líquida (Gutierrez et al., 2011).

El resultado del fraccionamiento de una molécula en iones positivos o moléculas neutras que identifican cualitativamente uno o varios compuestos en la muestra se les conoce como espectrogramas (Parra , 2011).

En la cromatografía el gas transportador Helio, por ser inerte, no interfiere en las moléculas de la muestra, cuando se analizan extractos esenciales de plantas la certeza de la determinación y caracterización están basadas en picos máximos de absorbancia y tiempos de retención. Las muestras analizadas pueden ser estimadas con mínimas cantidades (Gallego, 2011).

2.6.2 Capacidad del Equipo

El factor limitante en la cromatografía de gases acoplada a masas es la posibilidad de vaporización de la muestra, la condición necesaria para que se pueda obtener el espectro de un compuesto es que su presión de vapor sea igual o superior a 10^{-6} mm de mercurio, no es necesario vaporizar toda la muestra, sino únicamente la cantidad necesaria para alcanzar la presión de vapor indicada (Jarrin, 2006).

La vaporización de la muestra se realiza en un recipiente externo al cromatógrafo, las superficies que se encuentran en el interior deben ser tratadas cuidadosamente para prevenir posibles efectos de catálisis que puedan alterar la naturaleza de la muestra (Andrade, 2010).

2.6.3 Manejo del Equipo

En este equipo la muestra es inyectada en la fase móvil, es un gas inerte (Helio), en dicha fase los componentes de la muestra en estudio pasan a través de la siguiente fase que es la fase estacionaria que se encuentra fija en una columna de las cuales las más utilizadas son columnas capilares, esta columna está dentro del horno de programación de temperatura. Cada soluto que se encuentra en la muestra tiene una afinidad diferente hacia la fase estacionaria y de esta manera permite su separación, se debe tomar en cuenta que la presión de vapor es importante para el equilibrio (Guitierrez *et al.*, 2011).

2.7 Hipótesis

2.7.1 Ho:

La técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas permiten identificar y caracterizar los metabolitos secundarios específicos con acción antifúngica de los fitofluidos de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.)

2.7.2 H1:

La técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, no permiten identificar y caracterizar los metabolitos secundarios específicos con acción antifúngica de los fitofluidos de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Ubicación del lugar de investigación

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica de la carrera de Ingeniería Agropecuaria (IASA I) ubicado en la hacienda el Prado Sangolquí-Ecuador, adicionalmente algunos de los análisis se efectuaron en el Centro de Análisis Ambiental de la empresa de Agua Potable EMAP-Quito, planta Bellavista.

3.1.1.1 Ubicación política

- Laboratorio de Bioquímica (ESPE-IASA 1)

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: San Fernando, Hacienda el Prado (IASA I)

- Empresa municipal de agua potable EMAP-Quito

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Bellavista

3.1.1.2 Ubicación geográfica

- Laboratorio de Bioquímica (ESPE-IASA 1)

Longitud: 78° 24' 44"

Latitud: 0° 23' 20"

Altitud: 2748 msnm

- Empresa municipal de agua potable EMAP-Quito

Longitud: 78° 52' 49"

Latitud: -0° 11' 56" (E)

Altitud: 2856 msnm

3.1.1.3 Ubicación ecológica

Proyecto de investigación se encuentra ubicado ecológicamente de acuerdo a los siguientes parámetros.

Precipitación media anual:	1285 mm/año
Temperatura media anual:	13.89 °C
Humedad relativa:	69.03 %
Piso altitudinal:	Montano bajo
Región latitudinal:	Templada
Zona de vida:	Bosque Húmedo
Clasificación Bioclimática:	Húmedo-Temperado
Provincia de Humedad:	Húmedo

Fuente: (Estación Meteorológica IASA I., 2016)

3.1.1.4 Material experimental

-Hojas secas de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.)

3.1.1.5 Material de laboratorio

-Probeta

-Pipeta

-Tubo de ensayo

-Tubos viales

-Fracos para muestras

- Fundas de papel
- Frascos de vidrio
- Papel filtro
- Tijeras
- Toalla de papel
- Papel Aluminio
- Guantes
- Mascarillas
- Alcohol
- Algodón
- Marcadores de vidrio

3.1.1.6 Reactivos

- Dragendorff
- Wagner
- Cloruro férrico al 5%
- Mayer`s
- Etanol
- Etanol de caña
- N-hexano
- Hidróxido de potasio 10%
- Ácido clorhídrico
- Cinta de magnesio
- Shinoda

-Borntrager

3.1.1.7 Equipos de laboratorio

-Cromatógrafo de gases acoplado a masas (ALIGENT)

-Cromatógrafo de gases acoplado a masas (VARIAN 3600)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de los Extractos

3.2.1.1 Recolección de la materia prima

Se recolecto alrededor de 6kg de muestra de hojas de la especie arbustiva *Piper carpunya* conocida también como guaviduca en los senderos del río Baba, en la comunidad Chigüilpe perteneciente a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en el cantón Santo Domingo, Ecuador; se procuró que las muestras vegetales sean de un color homogéneo y eliminando hojas viejas o que presenten manchas o residuos como polvo e insectos.

3.2.1.2 Tratamiento de la muestra

Se procedió a lavar con agua común y luego con agua destilada a las muestras de hojas de la especie vegetal de *Piper carpunya* previamente pesadas y seleccionadas, para eliminar cualquier tipo de impurezas que puedan modificar los ensayos, dejando secarlas al ambiente para llevarlas luego al proceso de deshidratación.

3.2.1.3 Deshidratación de las muestras

Las hojas colectadas de *Piper carpunya* se sometieron a un proceso de deshidratación, el cual, consistió en introducir las hojas en una estufa a una temperatura de 60°C durante 20 min.

3.2.1.4 Molienda y pesaje

Se trituro alrededor de 100 g de la muestra vegetal colectada de *Piper carpunya* para luego someterlas a hidrodestilación y otra cantidad igual para someterlas a maceración y su posterior tamizaje.

3.2.2 Técnicas de extracción

3.2.2.1 Obtención del extracto por hidrodestilación

En este proceso se utilizó un equipo de destilación por arrastre de vapor, provisto de un refrigerante vertical que condensa el hidrodestilado (Cerpa, 2007).

Para ello se tomó 100 g de muestra deshidratada que se dispuso en destilación; colocando 2,5 litros de agua destilada, para que su vapor fluya sobre la muestra y arrastre los compuestos hacia un recipiente colectando los fitofluidos hidrodestilados en el transcurso de 1 hora aproximadamente.

Las características organolépticas del hidrodestilado se registraron en base a su color, olor y sabor con los siguientes parámetros, siendo:

- (-) No registrado
- (+/-) Escasa presencia
- (+) Ligera presencia
- (++) Estable presencia
- (+++) Constante presencia
- (++++) Abundante presencia.

3.2.2.2 Obtención del extracto por maceración

Las muestras se prepararon previo a la maceración en base a 10.5 g de *P. Carpunya* trituradas previamente y se colocaron junto con los solventes orgánicos (Etanol, Etanol comercial, Hexano y aguas) en frascos ámbar, se mantuvo durante una hora y a 30 rpm en el agitador orbital, después se

colocaron durante 7 días en refrigeración para lograr la sedimentación, para luego efectuar una filtración, la primera se realizó con algodón esterilizado y la segunda con papel filtro No 45.

Los extractos macerados e hidrolatos fueron disueltos en dicloro metano, se realizó una extracción líquido a líquido, en un embudo de decantación por tres ocasiones, hasta obtener la mayor concentración.

El sobrenadante fue colectado mediante un embudo de decantación y almacenado en frascos ámbar hasta ser inyectados al cromatógrafo.

De las muestras maceradas en los solventes orgánicos, se tomó alícuotas de 10.5 g, que se colocaron en 4 diferentes frascos de color ámbar de 300 ml de capacidad luego se añadió 150 ml del hidrosolvente, conformado por 50 % de agua y 50% de Etanol comercial, Etanol caña, agua y N- hexano al 100%.

-El primer solvente se formó con 75ml de alcohol de caña y 25 ml de agua destilada.

-El segundo solvente se formó con 75ml de etanol comercial y 25 ml de agua destilada.

-El tercer solvente se formó exclusivamente por agua al 100 %

-El cuarto solvente se formó con Hexano.

Con estos solventes se procedió a seguir un protocolo de acuerdo a las recomendaciones de (Moreno *et al.*, 2010).

Los extractos fueron sometidos con agitación orbital, luego se macero por 8 días, se filtró mediante papel filtro N°45, se rota evaporo para concentrar y recuperar el solvente y posteriormente se identificaron mediante un tamizaje fitoquímico general.

3.2.3 Tamizaje fitoquímico

Siguiendo los protocolos de (Moreno *et al.*, 2010) y (Rivera, 2008) se ejecutaron pruebas fitoquímicas generales para evidenciar la presencia de

alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas y quinonas como principales metabolitos secundarios de actividad anti fúngica (Tabla 2). Los resultados se identificaron en base a las pruebas de colorimetría (Cerpa, 2007) respecto a la apreciación y registro cualitativo y cuantitativo de los metabolitos secundarios contenidos en las muestras de *Piper carpunya*.

Tabla 2
Pruebas de los principales metabolitos a describirse

Reactivos y pruebas fotoquímicas	Metabolitos registrados
Reactivo de Mayers	
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides
Reactivo de Wagner	
Ensayo con cloruro férrico	Taninos y fenoles
Ensayo de saponificación espumante	Saponinas
Ensayo hidróxido de potasio al 10%	Cumarinas
Ensayo de shinoda	Flavonoides
Ensayo de borntrager	Quinonas

Fuente: (Rivera., 2008)

3.2.4 Protocolos de tamizaje fitoquímico

Para reportar los resultados de las pruebas del tamizaje fitoquímico, se considera las especificaciones registradas en la tabla 3.

Tabla 3
Significación considerada para reportar los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico

Significación	Especificación	Comentario
(-)	No registrado	No hay cambio de coloración.
(+/-)	Escasa presencia	Mínimo cambio de coloración.
(+)	Ligera presencia	Leve cambio de coloración.
(++)	Estable presencia	Notable cambio de coloración.
(+++)	Constante presencia	Prolongado cambio de coloración.
(++++)	Abundante presencia	Cambio de coloración.

3.2.4.1 Protocolo para reconocimiento de alcaloides

De Las muestras maceradas e hidrodestiladas de *Piper carpunya*, se tomaron una alícuota de 1 ml por cada tubo de ensayo y se disolvió en 2 ml de ácido clorhídrico al 10%. Se agitó vigorosamente por 5 min hasta obtener una cierta transparencia del extracto. Se recuperó 1 ml y se procedió a ensayar el reactivo de Mayer's, Dragendorff y Wagner.

Mediante reactivo de Mayer's: al 1 ml recuperado del extracto macerado e hidrodestilado se adicionó 5 gotas del reactivo. Éste formó un precipitado de color crema, lo cual indicó la presencia de alcaloides.

Mediante reactivo de Dragendorff: al 1 ml recuperado del extracto macerado e hidrodestilado se adicionó 3 gotas del reactivo. Éste formó un precipitado de color anaranjado, lo cual indicó la presencia de alcaloides.

Mediante el reactivo de Wagner: al 1 ml recuperado del extracto macerado e hidrodestilado se adicionó 3 gotas del reactivo. Éste formó un precipitado de color que va del amarillo al anaranjado, lo cual indicó una prueba positiva.

3.2.4.2 Protocolo para reconocimiento de taninos y fenoles

3.2.4.2.1 Ensayo del cloruro férrico

Mediante éste procedimiento se permitió reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en las muestras maceradas e hidrodestiladas, descrito en el siguiente proceso: se tomó una alícuota de 1 ml por cada tubo de ensayo, se añadió 3 gotas de acetato de sodio para neutralizar las muestras y 0.5 ml de una solución de Cloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.

El ensayo dio positivo para las alícuotas de los macerados e hidrodestilado de piper, los cuales desarrollaron una coloración azul intensa, indicando la presencia de taninos del tipo pirogalotánicos. El mismo ensayo efectuado en alícuotas, macerado como hidrodestilado, dio negativo, no

registrándose reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

3.2.4.3 Protocolo para reconocimiento de saponinas

3.2.4.3.1 Ensayo de espuma

Mediante éste procedimiento se permitió reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica en las muestras maceradas e hidrodestiladas, que se describe a continuación: se tomó una alícuota de 1 ml por cada tubo de ensayo y se las diluyó con 5 veces su volumen en agua. Se agitó la mezcla fuertemente de manera manual y vertical entre 5 a 10 minutos.

El ensayo dio positivo al aparecer espuma con burbujas de forma hexagonal en la superficie del fitofluido, con alturas entre 4 mm hasta 20 mm, por más de 2 minutos, lo cual se considera prueba viable. Lo contrario ocurrió cuando en los ensayos, la presencia de espuma después de la agitación no permanecía en los rangos para considerarse una prueba positiva.

3.2.4.4 Protocolo para reconocimiento de cumarinas

De las muestras maceradas e hidrodestiladas, se tomó una alícuota de 1 ml por cada tubo de ensayo, y se les añadió 3 gotas de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%, dando una coloración amarillenta. Luego se adicionó 0.5 ml de HCl 1N.

El ensayo dio positivo, en la prueba de coloración, cuando se desvaneció el color amarillento de las muestra maceradas e hidrodestiladas al acidularlos con el HCl 1N. El ensayo dio negativo al no registrarse la reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

3.2.4.5 Protocolo para reconocimiento de flavonoides

3.2.4.5.1 Ensayo de shinoda

De las muestras maceradas e hidrodestiladas, se tomó una alícuota de 1 ml para cada tubo de ensayo, y se las diluyó con 1 ml de HCl concentrado,

enseguida se añadió un segmento de aproximadamente 0.5 cm de cinta de magnesio metálico como indicador. En éste procedimiento se produjo una reacción exotérmica con efectos efervescentes y ascendentes registrados en el tubo de ensayo, para lo cual se esperó 5 minutos para que se establezca la reacción y enseguida se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que éstas vuelvan a separarse.

El ensayo dio positivo de acuerdo al protocolo establecido, cuando el alcohol amílico agregado se coloreó con gamas que fueron del amarillo al naranja, carmelita o rojo intenso, para varias pruebas realizadas. El ensayo dio negativo, cuando el alcohol amílico no reaccionó dando las colorimetrías esperadas.

3.2.4.5.2 Ensayo de antocianinas

Éste protocolo permitió conocer antocianinas generales en los extractos vegetales macerados e hidrodestilados, la presencia se determinó, cuando a 1 ml de la muestra se calentó por 2 minutos, luego se añadió 1 ml de HCl concentrado y se siguió calentando hasta aproximadamente 10 minutos, se dejó enfriar y luego se añadió 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Por último se agitó el tubo de ensayo y se dejó separar las 2 fases.

El ensayo dio positivo, cuando el alcohol amílico agregado a las muestras maceradas e hidrodestiladas en diferentes tubos de ensayo, se coloreó de rojo a marrón en varios de ellos. El ensayo dio negativo, cuando el alcohol amílico agregado, no registró la reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

3.2.4.6 Protocolo para reconocimiento de quinonas

3.2.4.6.1 Ensayo de börntrager

De las muestras maceradas en Hexano, etanol de caña y etanol comercial, se tomó como alícuota 1 ml para cada tubo de ensayo y se sometieron a baño maría para acelerar su evaporación. Luego el residuo se re disolvió en 1 ml de cloroformo. Posteriormente se adicionó 1 ml de hidróxido

de potasio al 10 %, se agitó el tubo de ensayo mezclando las fases y se lo dejó en reposo hasta su separación. Para las muestras maceradas e hidrodestilados de *P. carpunya*, se añadió directamente el cloroformo y se siguió con el mismo procedimiento.

El ensayo dio positivo cuando al agregar el cloroformo a cada tubo de ensayo, las fases se separaron y aquella que migró a la superficie, se coloreó de rosado a rojo. El ensayo se consideró negativo, cuando la fase superior formada no registró la reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

3.2.5 Condiciones del análisis cromatográfico

Para este tipo de análisis se prefieren utilizar columnas capilares espirales con diámetros de 0,20 y 0,25 mm ID, con longitudes entre 20 a 30 m debido a que los compuestos se volatilizan en un horno que contiene a las columnas y al entrar en el DIF (Detector de Flama Inducida) son capturados para cuantificarse. Las temperaturas programadas antes de ingresar al inyector deben estar entre 200 ° C y 250 ° C, esto permitirá la fragmentación de la molécula en iones cuantificables que al estar acoplado a un espectrómetro de masas son absorbidos y caracterizados en base a una biblioteca de espectros (Scientific Instrumen Services, NIST 14- 2014).

Los fitofluidos y los estándares fueron inyectados en un equipo cromatográfico marca AGILENT, modelo 6890-B y para las pruebas complementarias también se inyectaron a un equipo VARIAN 3600, acoplado a un detector de masas modelo 5975-N. La columna utilizada fue un capilar SHIM-S;HP-5 estandar en espiral de 30 m de longitud x 0,25 mm de ID, film de 0,25 µm. Cada equipo fue calibrado y acoplado a tanque de Helio (He) como gas transportador, calibrado a 1ml/min y programado a una temperatura del inyector a 250° C, la temperatura de la fuente de electrones fue calibrada a 220 °C. Preparada la columna se determinó la absorbancia y se analizaron 250 µl de los hidrolatos diluidos a 25 ml con di cloro metano, de esta muestra se inyectaron 2 µl en el equipo y se esperó el tiempo en que se realizaba el

barrido. Las condiciones del análisis fueron similares, las mismas que se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4
Condiciones del análisis cromatográfico

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Permanencia (min)	Total (min)
50	0	2	2
100	20	0	4.5
220	5	1.5	30

Se inyectaron muestras con el respaldo de estándares con un 99.5% de pureza correspondiente piperonal, piperalin y 1-piperoylpiperidine, cada estándar fue diluido e inyectado previo a la calibración de la rampa para su absorbancia. El desarrollo del método para correr los extractos se estableció en 30 min y 60 min, la energía de ionización fue de 70 eV Corriente de Emisión: 40 mA Rango de masas: 40 – 650 m/z, temperatura condicionada a 220 °C.

Se registraron varios perfiles cromatográficos y espectros de masas que corresponden a componentes fitoquímicos asociados a los estándares cuyos picos y tiempos de retención se verificaron en la biblioteca del NIST-14 y se compararon también con aquellos reportados en la literatura.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación del solvente orgánico

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en el tamizaje fitoquímico de *Piper carpunya* utilizando 4 solventes orgánicos (Hexano, etanol comercial, etanol de caña y agua). Se establece que los metabolitos secundarios más frecuentes extraídos mediante hexano como solvente extractor (Tabla 5) son flavonoides, cabe recalcar que el registro de quinonas no reaccionó positivamente y por tanto no se registró en la presente tabla.

Tabla 5
Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico, mediante hexano como solvente extractor de *Piper carpunya*

	Alcaloides			Taninos y fenoles	Saponinas	Cumarinas	Flavonoides	Antocianinas
	Mayer	Dragendorff	Wagner					
1° Rep.	0	1	0	0	0	1	3	0
2° Rep.	0	1	0	2	0	1	5	1
3° Rep.	1	3	1	3	1	2	4	2
Promedio	1	2	1	2	1	1	4	1

Los resultados que se obtuvieron en el tamizaje fitoquímico de *Piper carpunya* mediante la utilización de 4 solventes orgánicos (Hexano, etanol comercial, etanol de caña y Agua). En la tabla 6 se presentan los metabolitos secundarios más frecuentes extraídos mediante Etanol como solvente extractor, cabe recalcar que el registro de quinonas no reaccionó positivamente y por tanto no se registró en la presente tabla. Como se puede apreciar el metabolito con mayor detección corresponde a Saponinas, Flavonoides seguido de Alcaloides con el reactivo de Wagner.

Tabla 6
Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquimico mediante etanol comercial EtOH como solvente extractor de *Piper carpunya*

	Alcaloides			Taninos y fenoles	Saponinas	Cumarinas	Flavonoides	Antocianinas
	Mayer	Dragendorff	Wagner					
1° Rep.	1	0	4	1	5	1	3	0
2° Rep.	0	0	3	2	3	1	5	1
3° Rep.	2	1	3	1	4	2	4	2
Promedio	1	1	3	1	4	1	4	1

En los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de *Piper carpunya* mediante la utilización de 4 solventes orgánicos (Hexano, etanol comercial, etanol de caña y agua). Se utilizó Etanol de caña como extractor en donde se presentan los componentes con mayor presencia (Tabla 7) tales son Alcaloides con el reactivo de Wagner, taninos y fenoles, saponinas, cumarinas seguido de flavonoides y antocianinas en donde se mostró que este solvente orgánico fue el mayor solvente extractor y se obtuvo mayor cantidad de metabolitos, se menciona además que el registro de Alcaloides con el reactivo de Dragendorff no reaccionó positivamente y por tanto no se registró en la tabla.

Tabla 7
Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquimico mediante etanol de caña como solvente extractor de *Piper carpunya*

	Alcaloides		Taninos y fenoles	Saponinas	Cumarinas	Flavonoides	Antocianinas	Quinonas
	Mayer	Wagner						
1° Rep.	1	5	3	5	5	4	3	1
2° Rep.	3	5	5	3	4	5	5	2
3° Rep.	4	5	4	4	5	4	4	3
Promedio	3	5	4	4	5	4	4	2

En el tamizaje fitoquímico de *Piper carpunya* se obtuvieron como resultados mediante la utilización de 4 solventes orgánicos (hexano, etanol comercial, etanol de caña y agua), de los cuales en la tabla 8 se aprecian los metabolitos secundarios más frecuentes extraídos mediante agua como solvente extractor. Como se puede apreciar el metabolito con mayor detección corresponden a saponinas, cumarinas y antocianinas, seguido de alcaloides con el reactivo de wagner. Se toma en cuenta que los alcaloides con el reactivo de dragendorff no reaccionaron positivamente y por tanto no se registró en la tabla.

Tabla 8
Metabolitos secundarios obtenidos por tamizaje fitoquímico mediante agua como solvente extractor de *Piper carpunya*

	Alcaloides		Taninos y fenoles	Saponinas	Cumarinas	Flavonoides	Antocianinas	Quinonas
	Mayer	Wagner						
1° Rep.	1	4	1	5	5	1	2	1
2° Rep.	1	3	1	0	2	3	5	1
3° Rep.	2	4	3	4	4	2	4	2
Promedio	1	4	2	3	4	2	4	1

En los análisis efectuados a *P. carpunya* mediante tamizaje fitoquímico, se describe la presencia de varios componentes fitoquímicos mayoritarios con los cuatro solventes utilizados (Hexano, Etanol comercial ETOH, Etanol de caña y Agua). En la figura 2 se presentan cuatro paneles con los distintos metabolitos registrados, las barras indican la mayor prevalencia de los metabolitos. En el gráfico A, se encontró mayor presencia de Flavonoides, en el gráfico B se encontró mayoritariamente saponinas y flavonoides, en el gráfico C, se encontraron alcaloides, cumarinas, flavonoides y antocianinas y finalmente en el gráfico D hubo mayor presencia de alcaloides, cumarinas y antocianinas.

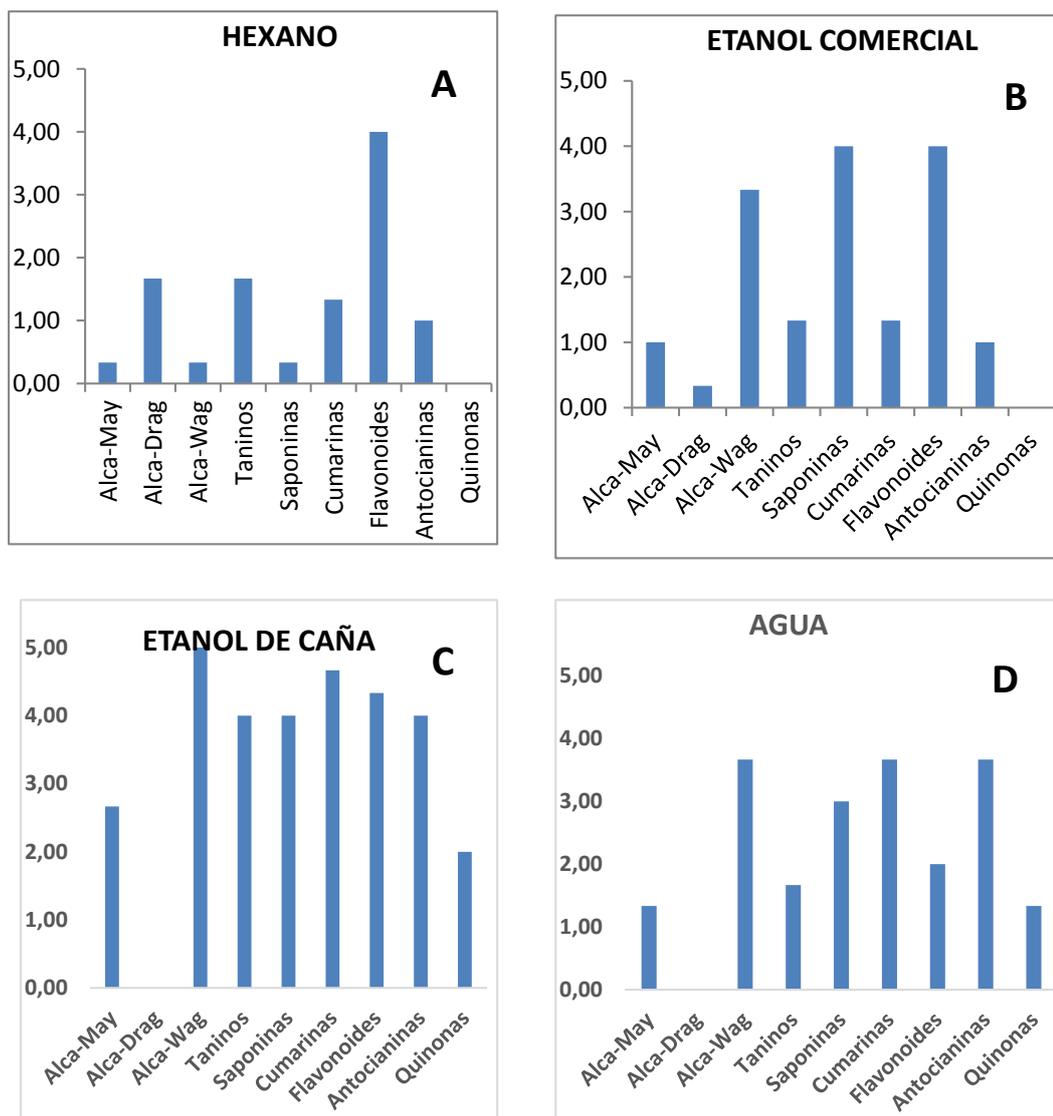


Figura 2 Análisis de metabolitos secundarios presentes en *Piper carpunya* mediante tamizaje fitoquímico con 4 solventes orgánicos Hexano (A), Etanol comercial (B), Etanol de caña (C) y agua (D)

4.2 Identificación y caracterización de metabolitos secundarios por cromatografía de gases acoplado a masas

Se muestran los perfiles cromatográficos y espectros de masas correspondientes al hidrolato y macerado de *Piper carpunya*, en etanol de caña. Los cromatogramas analizados de estos dos fitofluidos, revelan la absorbancia, los picos detectados y tiempos de retención (Tr) en minutos, de los compuestos evidenciados en cada muestra. Los espectros de masas identificaron los analitos específicos y se determinaron sus componentes

mediante captura de electrones, que se analizaron en la base de datos NIST 14 de la librería de espectros.

4.2.1 Hidrolatos de *Piper carpunya*

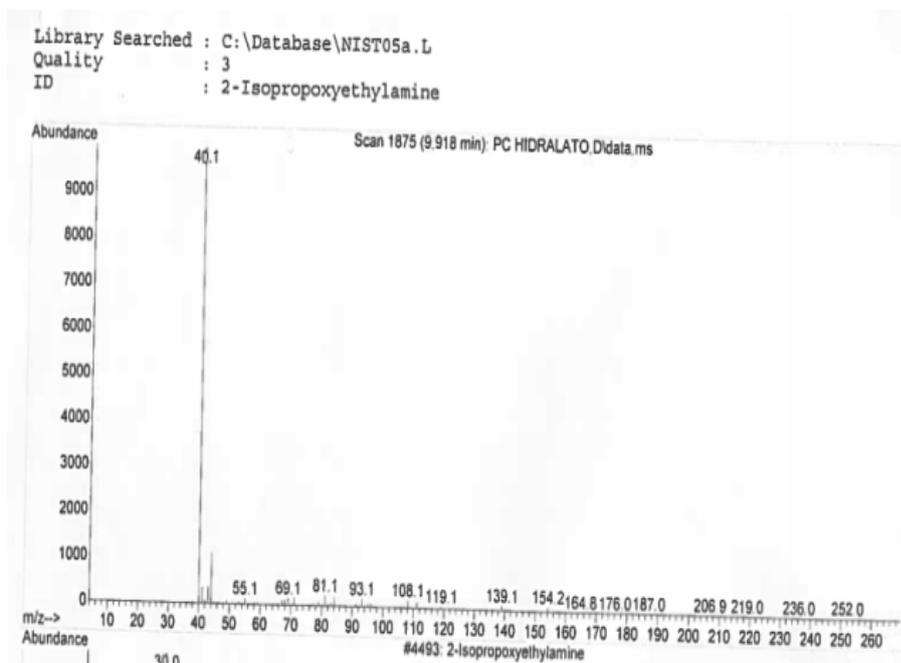


Figura 3 Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de *P. carpunya*, en donde se captó 2-Isopropoxietil-amina, perteneciente al grupo de aminas

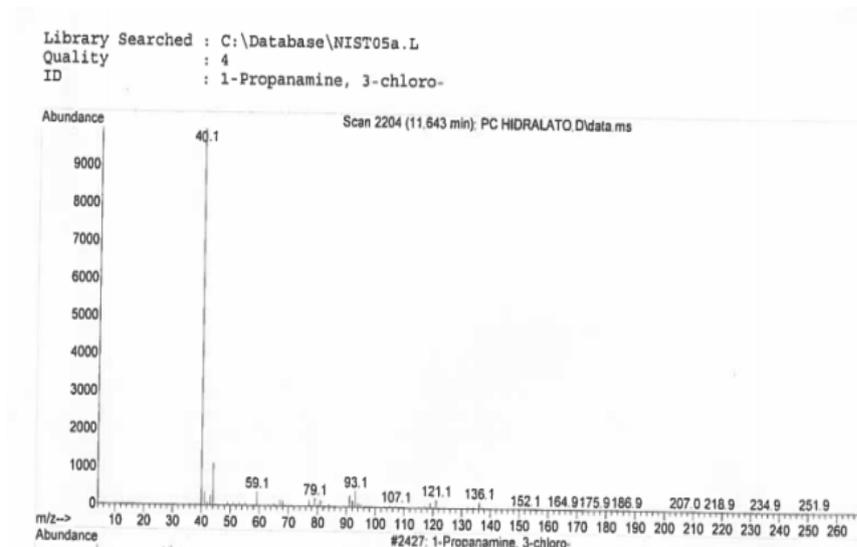


Figura 4 espectro de masas (gc-ms) del hidrolato de *p. carpunya* en el cual se detectó 1-propanamina

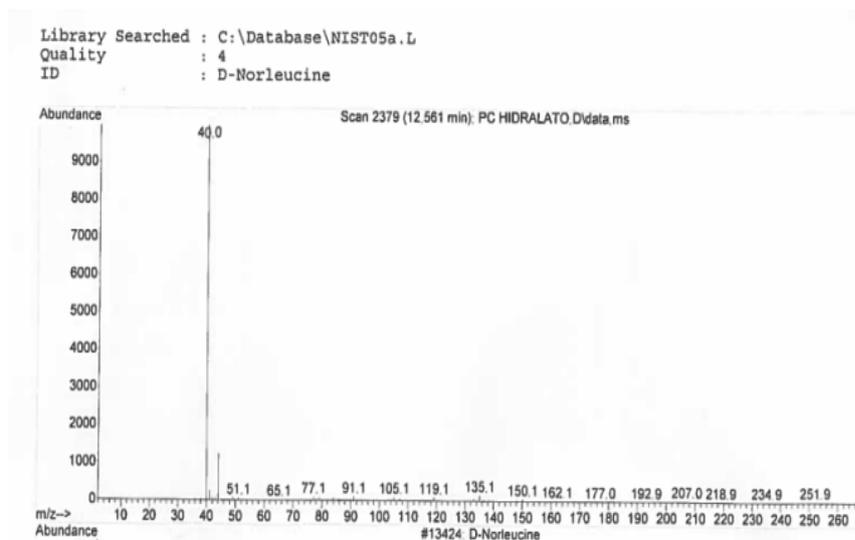


Figura 5 Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de *P. capunya*, en el cual se encontró D-Norleucina

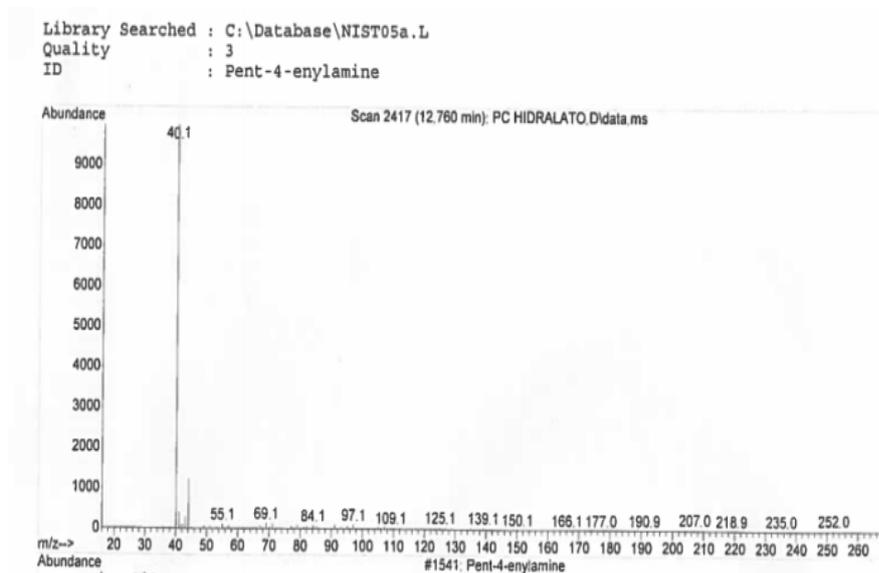


Figura 6 Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de *P. carpunya*, en donde se captó Pent-4-enil-amina perteneciente al grupo de aminas

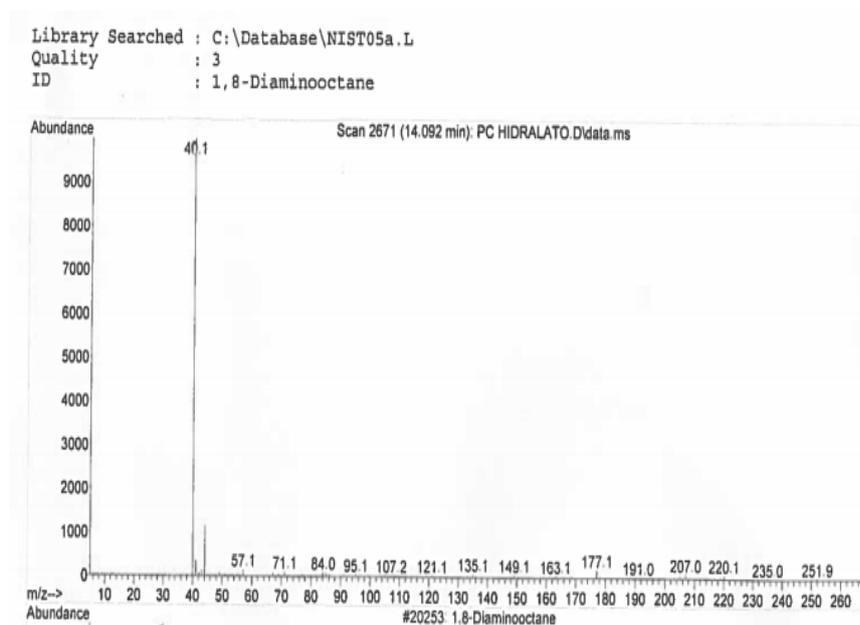


Figura 7 Espectro de masas (GC-MS) del hidrolato de *P. carpunya*, en donde se captó 2- 1,8-Diamino-octano, de igual forma perteneciente al grupo de aminas

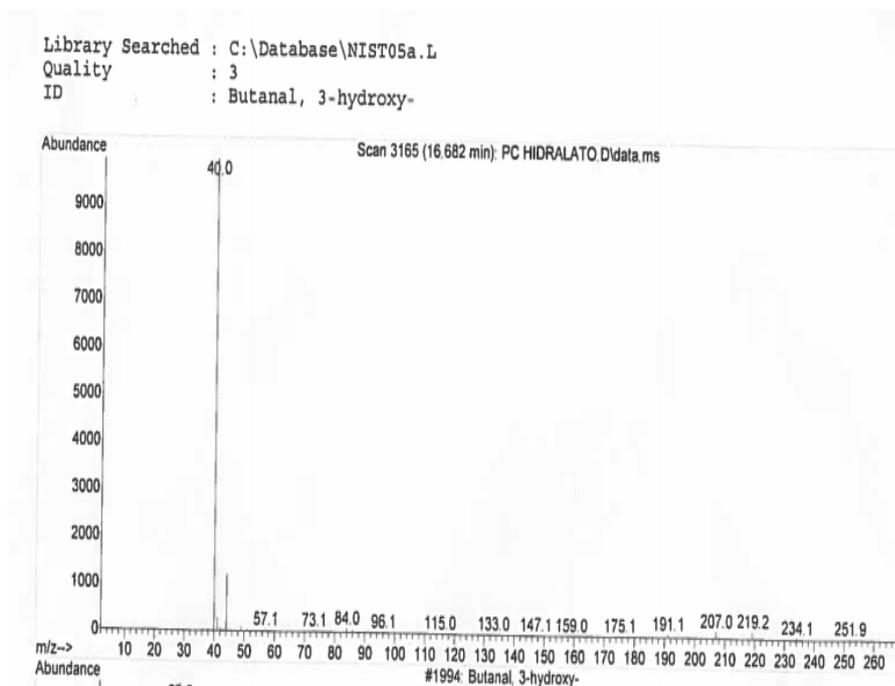


Figura 8 Espectro de masas (GC-MS) del macerado de *P. carpunya*, en el cual se encontró Butanal, 3 Hidroxi

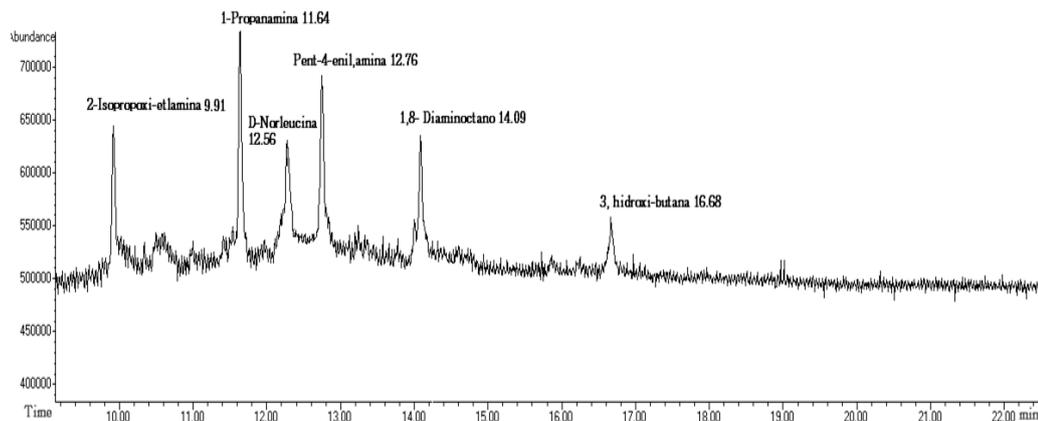


Figura 9 Perfil cromatográfico (GC-MS) del hidrolato de *P. carpunya*; captándose a: 2- Isopropoxietil-amina barrido a 2653 a un (Tr) de 9.91 min; 1-Propanamina barrido a 2204, a un (Tr) de 11.64 min; D-Norleucina barrido a 2379, a un (Tr) de 12.56 min; Pent-4-enil-amina barrido a 2417, a un (Tr) de 12.76 min; 1,8-Diamino-octano, barrido a 2671 a un (Tr) de 14.09 min y Butanal, 3 Hidroxi barrido a 3165 a un (Tr) de 16.68 min

4.2.2 Macerado de *Piper carpunya*

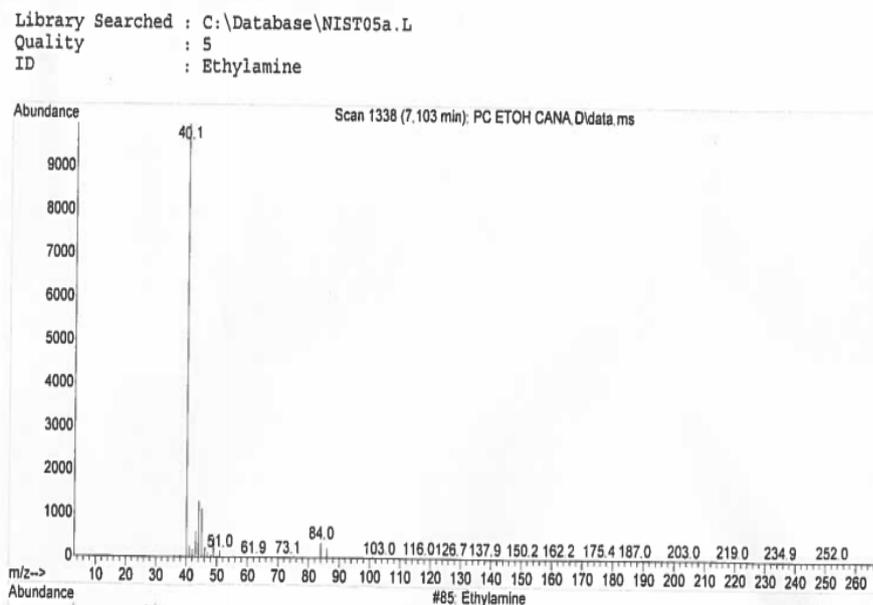


Figura 10 Espectros de masas (GC-MS) del macerado de *P. carpunya* en Etanol de caña, en el cual se encontró Etil-amina

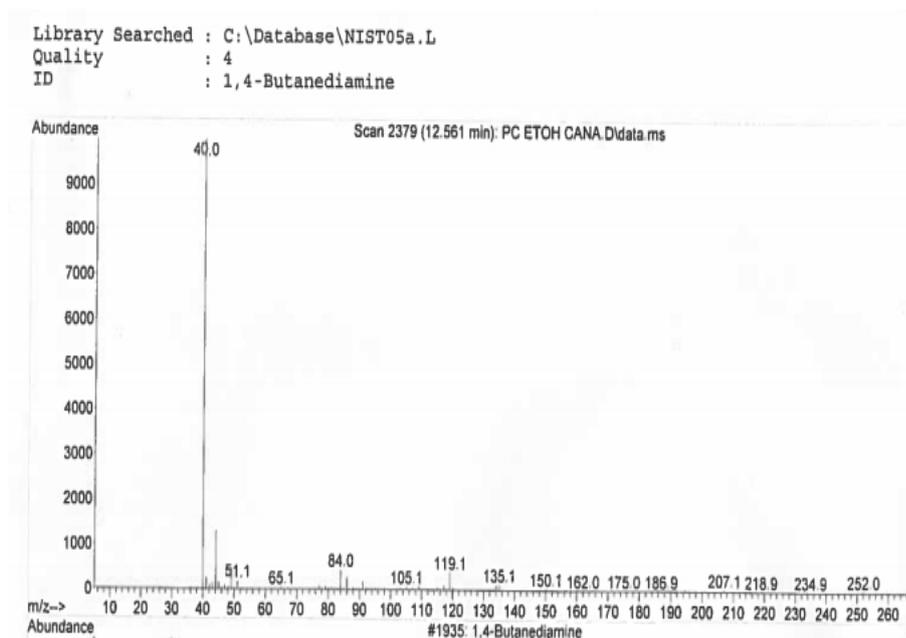


Figura 11 Espectro de masas (GC-MS) del macerado de *P. carpunya* en etanol de caña, en el cual se encontró 1,4-Butan,di-amina

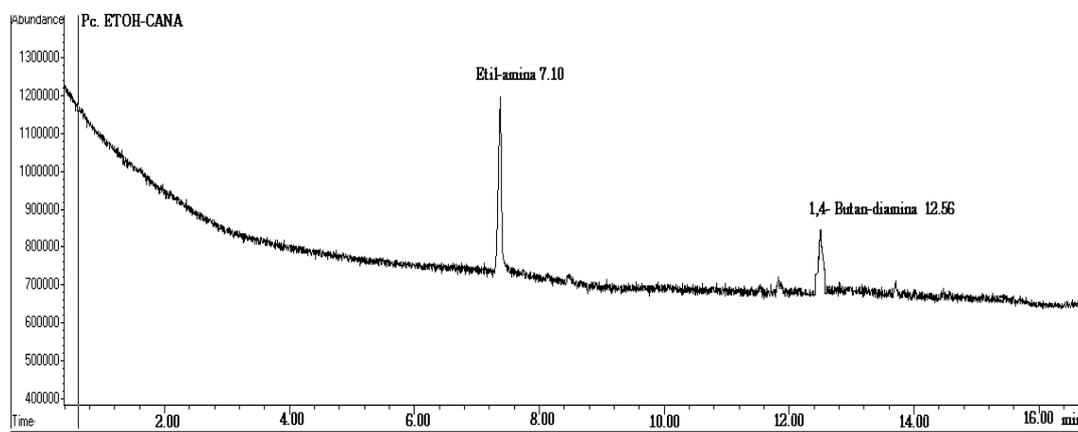


Figura 12 Se muestra el perfil cromatográfico (GC-MS) del macerado de *P. carpunya* en Etanol de caña, captándose a: Etil-amina barrido a 1338 a un (Tr) de 7.10 min, 1,4-Butan,di-amina a 2379 y a un (Tr) de 12.56 min

Se presentan en la tabla 9 los compuestos detectados en el hidrolato y macerado de *Piper carpunya* en EtOH-caña, que fueron: 2-Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1,8-Di-amino-octano, Butanal, 3-hidroxi, Etil-amina y 1,4-Butanamina. Estos metabolitos en

su mayoría se asume son moléculas pertenecientes a terpenos, isoprenos, fenoles y componentes aminos.

Tabla 9
Metabolitos descritos en hidrolato y macerado de *P. carpunya*

Extracto analizado	Barrido	Metabolito descrito	Tiempo de retención (Tr) min	# identificación	Método analítico
Hidrolato	2653	2-Isopropoxietil-amina.	9.91	4493	GC-MS
	2204	1-Propanamina.	11.64	2427	GC-MS
	2379	D-Norleucina.	12.56	13424	GC-MS
	2417	Pent-4-enil-amina.	12.76	1541	GC-MS
	2671	1,8-Diamonio-octano.	14.09	20253	GC-MS
	3165	Butanal, 3hidroxi	16.68	1994	GC-MS
Macerado EtOH-caña	1338	Etil-amina	7.10	85	GC-MS
	2379	1,4-Butan,di-amina	12.56	1935	GC-MS

4.3 Caracterización de metabolitos secundarios presentes

Se realizaron otras pruebas complementarias, utilizando un equipo VARIAN 3600 y de esta manera corroborar los resultados registrados, y compararlos con los obtenidos en los cromatogramas realizados por AGILENT. En las pruebas efectuadas se ratifican los compuestos más relevantes.

4.3.1 Macerado de *Piper carpunya*

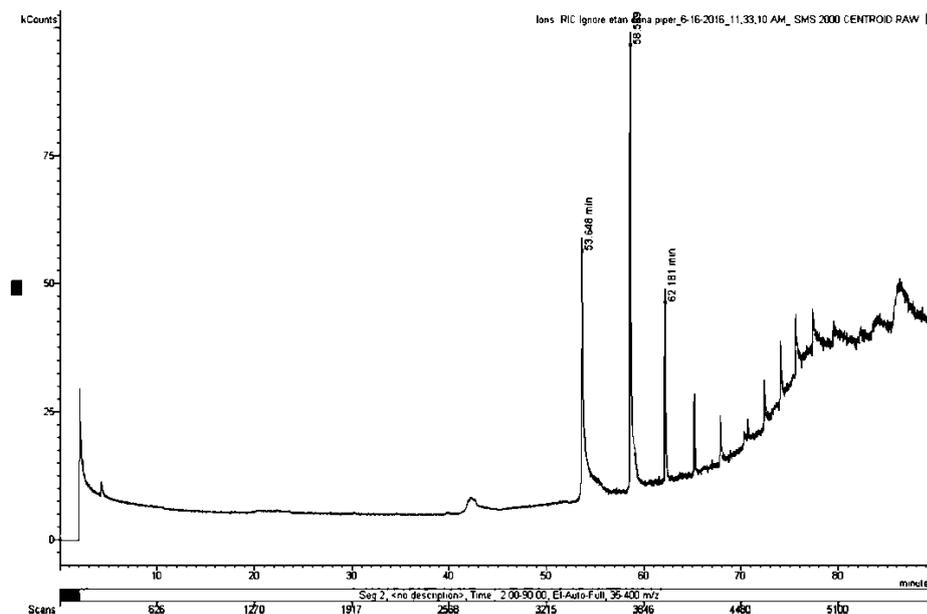


Figura 13 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya* en Etanol de caña, en donde se captó picos a los 53.648; 58.589 ; 62.181min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas

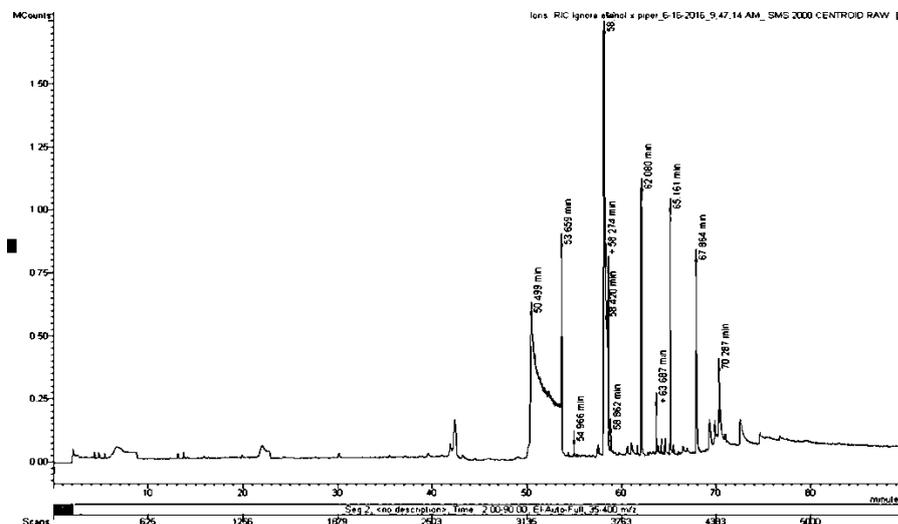


Figura 14 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya* en Etanol comercial, en donde se captó picos más relevantes: 50.499; 53.659; 58.124; 58.274; 58.420; 62.080; 63.687; 65.161; 67.864; 70.287 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas

4.3.2 Hidrolato de *Piper carpunya*

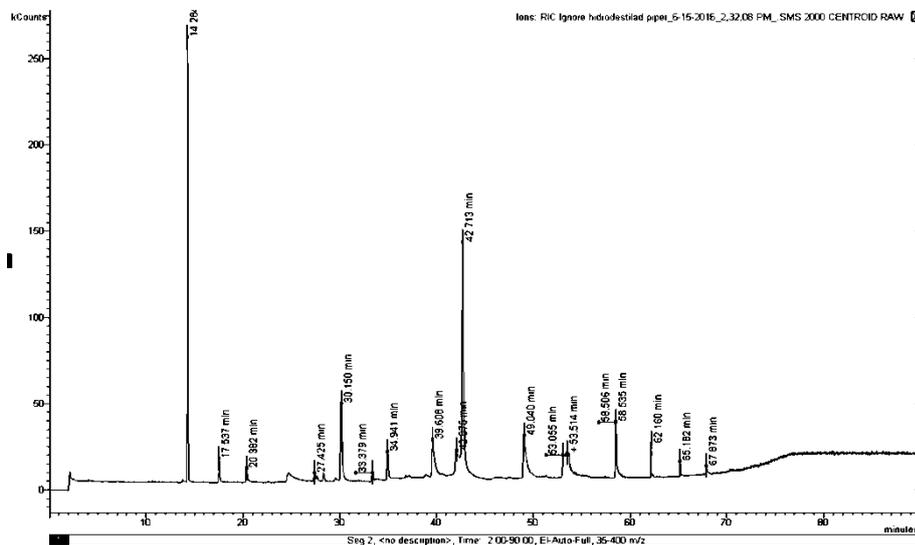


Figura 15 Perfil cromatográfico del hidrodestilado de *P. carpunya* en donde se captó picos más relevantes tales como: 14.284; 30.150; 34.941; 39.608; 42.713; 49.040; 53.514; 58.535; 62.160 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas

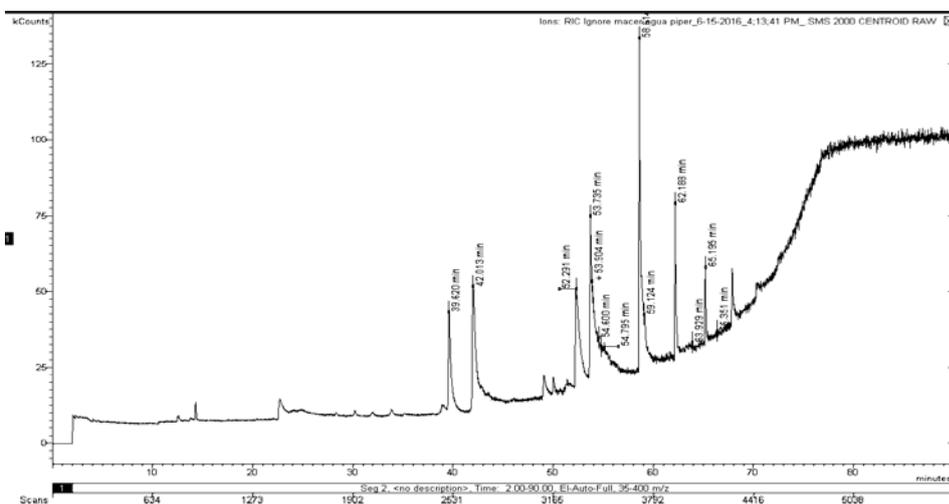


Figura 16 Perfil cromatográfico del macerado de *P. carpunya en agua*, en donde se captó picos más relevantes tales como 39.620; 42.013; 52.291; 53.735; 53.904; 54.660; 58.614; 62.188; 65.195; 66.351 min, que posiblemente corresponden a trazas no identificadas

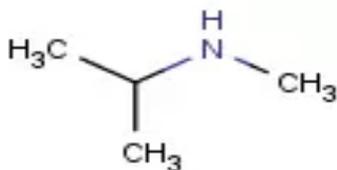
En la tabla 10, se presentan los compuestos detectados en el hidrolato y macerado de *Piper carpunya* en agua, etanol de caña y etanol comercial.

Tabla 10
Metabolitos descritos en hidrolato y los macerados de *P. carpunya*

Extracto analizado	Metabolito descrito	Tiempo de retención (Tr) min
Hidrolato	1-8 cineol	14.28
	4-Isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol	17.53
	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	20.38
	27.42	
	alfa-terpineol	30.15
	L-à-terpineol	33.37
	à-Limonene diepoxide	34.94
	4,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	39.60
	Kemitracin-50	42.07
	trans-2-Caren-4-ol	42.71
	Ascaridol	49.04
Macerado Agua	6-Isopropyl-3-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one	
	Miristicina	27.42
	z-carpacin	30.15
	Dilapiol	33.37
	Globulol	34.94
Macerado EtOH-caña	Kemitracin-50	39.60
	trans-2-Caren-4-ol	42.07
	Actylol	4.30
Macerado EtOH-comercial	α - Muuroleno	20.38
	Cadaleno	27.42
Macerado EtOH-comercial	Oxido cariofileno	14.28
	β - Cubebeno	17.53
	Aloaromadendreno	20.38
	Campesterol	27.42
	Estigmasterol	30.15
	β -sitosterol	33.37
Stigmasterol	34.94	
	2E)-3,7,11,15 Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	65.18

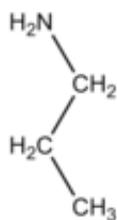
4.3.3 Caracterización de los componentes registrados en el Hidrolato de *Piper carpunya*

2- Isopropoxietil-amina (Isopropil Metil-amina)



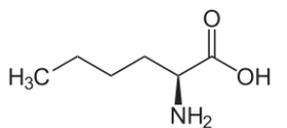
Es un gas derivado del amoniaco, es la amina primaria más sencilla dentro de este grupo, se prepara por la reacción entre amoniaco con metanol, este compuesto se emplea como materia prima para síntesis de compuestos comerciales que estén disponibles en el mercado (Carda *et al.*, 2011).

1-Propanamina



Es una amina primaria que se condensa desde la reacción de neopentanol y amoniaco a una Temperatura que va de 200 °C y 300 °C tomando en cuenta que debe existir un catalizador de hidrogenación, la reducción de propanamida da como resultado 1-Propanamina (Butch *et al.*, 2016).

D-Norleucina



Norleucina es un aminoácido no natural el cual se utiliza para conocer la estructura y función de proteínas, su estructura es parecido a la metionina pero no contiene azufre. La metionina es el antecesor para la síntesis de S-adenosil metionina (SAM) el cual es el principal donante de grupos metilos celulares de ADN, ARN proteínas y fosfolípidos (Renjifo *et al.*, 2014).

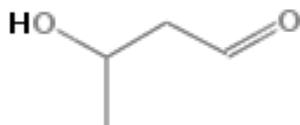
Pent-4-enil-amina

1,8-Diamino-octano (1,8 octanodiamina)

PUTRESCINA



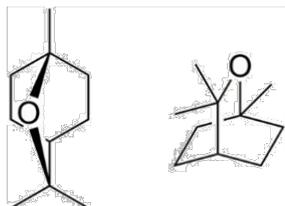
Este compuesto orgánico es una masa cristalina solidificada de blanco a amarillento, es una diamina lineal compuesta de ocho átomos de carbono con dos grupos amino primario (Peluso *et al.*, 2006).



Butanal, 3 Hidroxi

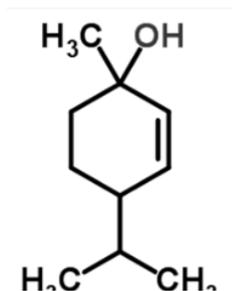
Butanal, 3 Hidroxi es un Aldehído más denso que el agua tiene un grado moderado de irritabilidad en la piel y en los ojos y de toxicidad por ingesta, inhalación o absorción por la piel (Butch *et al.*, 2016).

1-8 cineol



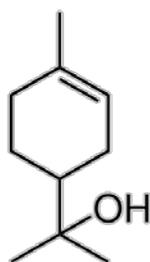
Este compuesto es también llamado aceite de eucalipto el cual se obtiene de las hojas de dicha especie y se lo puede encontrar en cremas, ungüentos y linimentos. Este compuesto se lo puede encontrar en otros aceites de plantas (Hidalgo M, 2011).

4-Isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol



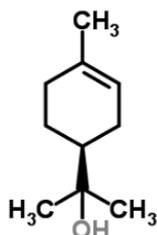
Como su fórmula molecular lo indica C₁₀H₁₈O, o su fórmula química Isopropyl-2-methylbicyclo [3.1.0] hexan-2-ol, este compuesto es conocido como Cironelal, el cual es uno de los componentes principales para la mezcla de compuestos químicos que dan como resultado el aceite de Citronela con un olor muy peculiar a limón, cumple con funciones de repelencia y anti fúngicas (Zambón *et al.*, 2015).

Alfa-terpineol

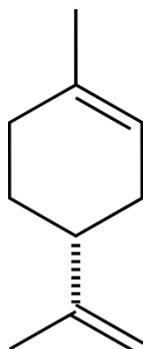


Es un monoterpeneo alcohol que se la puede aislar de diferentes aceites como pino. Este compuesto se forma mediante la mezcla de isómeros, tiene un agradable olor y es común en perfumes cosméticos etc (Lenma A, 2008).

L-à-terpineol

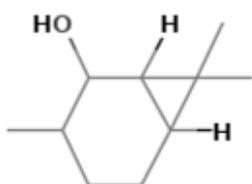


Este compuesto es uno de los nombres con los que se llama a todo el grupo de terpineol por lo tanto todos cumplen con la misma función, aunque las formulas desarrolladas sean distintas.



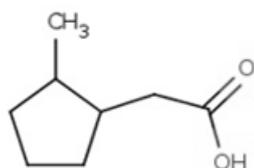
à-Limonene-diepoxide

Es un compuesto que se lo puede obtener de la extracción de los cítricos, pertenece al grupo de los terpenos el cual actúa como un disolvente biodegradable, se forma mediante la unión de dos componentes que son 1,2-epóxido de limoneno y H₂O para de esta forma obtener Limoneno (Fernandez G, 2012).



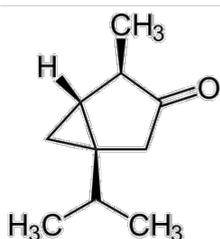
4,7,7-Trimethyl bicyclo[4.1.0]heptan-2-ol

Su fórmula desarrollada es conocida como 5-Caranol, su fórmula molecular es C₁₀H₁₈O y pertenece a los terpenos y monoterpenos como por ejemplo Eucaliptol, cumple con la función antibacteriana el cual evita la resistencia de patógenos para minimizar el aumento en la resistencia de patógenos (Rueda *et al.*, 2012).



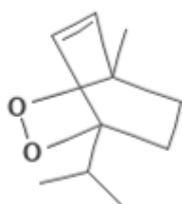
Kemitracin-50

Kemitracin-50 o C₈H₁₄O₂ es un líquido incoloro transparente menos denso que el agua, este compuesto es utilizado para fabricar resinas adhesivas y aditivos para aceites (UNAM, 2015).



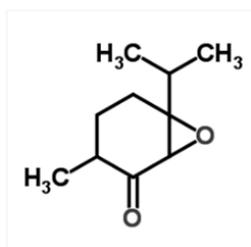
Trans-2-Caren-4-ol

El Alcanfor o como su fórmula molecular lo indica C₁₀H₁₆O, es un terpenoide de agradable olor se la puede obtener del árbol o sintéticamente a partir de pineno, este compuesto se utiliza para anestésias locales, analgésicas y antipruritis (Ramos A, 2010).



Ascaridol

Es un compuesto natural perteneciente a un monoterpene cíclico, pertenece principalmente al aceite de paico, tiene gran efectividad terapéutica y de alto grado de toxicidad, además es usado para el control de nematodos entre otros usos (Lázaro *et al.*, 2005).



6-Isopropyl-3-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one.

El Ácido Geránico con su fórmula molecular correspondiente a $C_{10}H_{16}O_2$ es una feromona utilizada por ciertos organismos, es un isómero de doble enlace del ácido nerólico, el cual cuenta con apitoxinas (UNAM, 2015).

4.3.4 Caracterización de los componentes registrados en el macerado- etanol de caña de *Piper carpunya*.

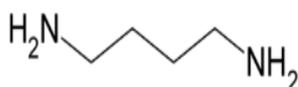
Etil-amina

Es una amina primaria que no reacciona con el agua pero tiene alto nivel de toxicidad por inhalación o contacto, reacciona fuertemente con ácidos, oxidantes fuertes y compuestos orgánicos. Este compuesto es una amina responsable de olores en estaciones de depuración tiene un olor característico a descomposición (Iglesias A, 2012).



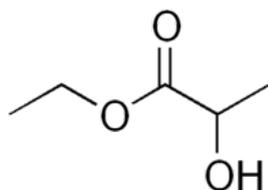
1,4-Butan,di-amina

1,4 Butan di amina es un compuesto sólido y a partir de los 27,5 O C se vuelve líquida, tiene un olor parecido y no tan agradable como de putrefacción. Este compuesto está relacionada con la actividad de la lisina y la producción de putrescina requiere ser combinada de bacterias ácidas lácticas y de enterobacteriáceas ya que su precursor no es un aminoácido proteico (Izquierdo *et al.*, 2006)

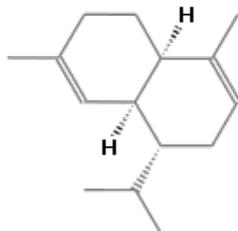


Actylol

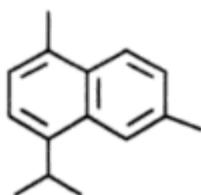
El Actylol se lo conoce también como lactato de etilo el cual pertenece a los ésteres, se lo obtiene mediante reacción química entre ácido láctico y el etanol, otra manera de la cual se obtiene este compuesto es mediante la fermentación de maíz, tiene propiedades biodegradables (Anfoteris, 2017).



α - Muuroleno



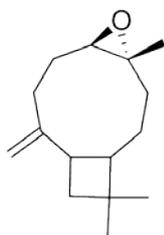
C₁₅H₂₄ pertenece a la fórmula molecular del compuesto α -Muuroleno, α -Zingibereno o como también se le conoce α -Cubebeno es un compuesto que actúa como un aceite repelente e insecticida para el control en plantaciones (Bermudez R, 2011).



Cadaleno

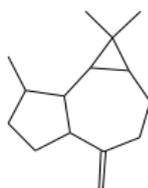
El cadaleno pertenece a los sesquiterpenos los cuales poseen solo 15 átomos de carbono, a este compuesto se lo obtiene a partir de cadineno que es otro componente que pertenece a este grupo (UNAM, 2015).

4.3.5 Caracterización de los componentes registrados en el Macerado en Etanol comercial de *Piper carpunya*.



Oxido cariofileno

Dicho oxido pertenece al grupo de los Sesquiterpenos el cual posee características tales como actividad anti fúngica analgésica, antiinflamatoria y larvicida, se lo puede obtener de la extracción del aceite esencial del clavo de olor. (UNAM, 2015).

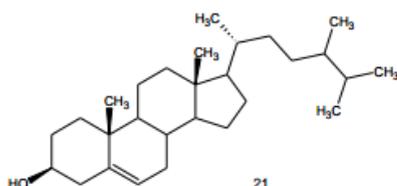


Aloaromadendreno

Como su nombre químico lo indica Copaeno, o su fórmula desarrollada y fórmula molecular C₁₅ H₂₄, es un compuesto derivado de las resinas tropicales provenientes del árbol de copaiba y de otras plantas productora de aceites esenciales, es un isómero de doble enlace (UNAM, 2015).

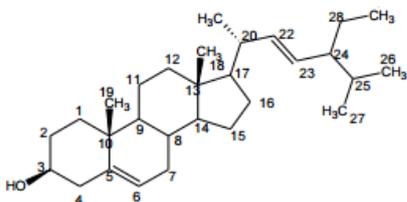
Campesterol

Es un tipo de fitoquímico (fitoesteroles) los cuales tienen propiedades para tratar enfermedades cardiovasculares, además de tener propiedades anti-inflamatorias, este compuesto es parecido químicamente al colesterol y se lo puede encontrar en frutas (Colomer *et al.*, 2014).



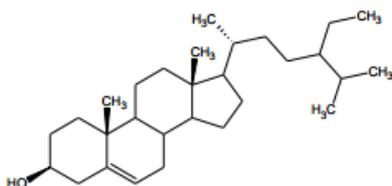
Estigmasterol

El estigmasterol pertenece al grupo de los fitosteroles son de origen vegetal y se encuentran presentes en grasas de las plantas y de la misma manera que el Campesterol es muy similar su estructura química la del colesterol (Ostlund *et al.*, 2003).



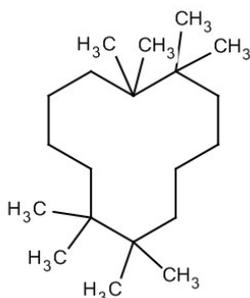
β-sitosterol

Este compuesto se encuentra dentro de los fitoesteroles y lo producen únicamente las plantas, el B-sitosterol es un esteroide sin colesterolero es similar a su estructura química, se lo puede encontrar en alimentos basadas en plantas como frutas vegetales etc. (Saeidnia *et al.*, 2014).



2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

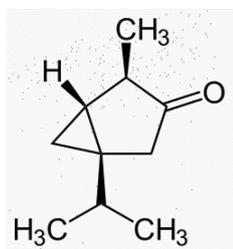
La fórmula molecular de este compuesto es $C_{20}H_{40}$ la cual es Buteno, pertenece al grupo de los alquenos el cual se encuentra formado por 4 átomos de carbono y 8 de hidrogeno, con la halpogenación y síntesis de este compuesto se obtiene butadieno que se utiliza en la formación del caucho artificial (Bressa S, 2001).



4.3.6 Caracterización de los componentes registrados en el Macerado en agua de *Piper carpunya*.

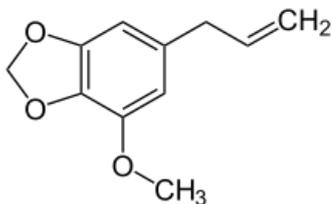
Trans-2-Caren-4-ol

El Alcanfor o como su fórmula molecular lo indica $C_{10}H_{16}O$, es un terpenoide de agradable olor se la puede obtener del árbol o sintéticamente a partir de pineno, este compuesto se utiliza para anestésicos locales, analgésicos y antipruríticos (Ramos A, 2010).



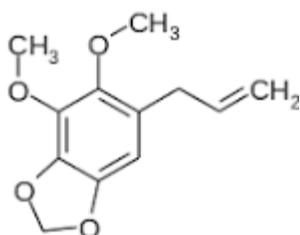
Miristicina

La miristicina, metabolito también conocido como Z-carpacin, químicamente corresponde a un fenilpropano, su fórmula es C₁₁H₁₂O₃ es un aceite volátil y de cantidades pequeñas de uso provenientes de la nuez moscada, pimienta negra y perejil, este compuesto es un estupefaciente que afecta al sistema nervioso central cuando se lo ingiere en grandes cantidades (Nuño A, 2009).



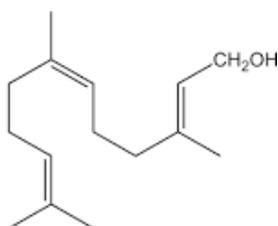
Dilapiol

Piper aduncum es un árbol más conocido como matico de aquí se extrae para diversos usos la sustancia específica Dilapiol el cual es un componente natural que se lo extrae del aceite de diferentes planta pero en mayo cantidad se lo encuentra en esta especie de piperaceae. Dilapiol cumple con la función de biodefensa agrícola, combate insectos y plagas que dañan en su totalidad los cultivos causando enfermedades (Azambuja, 2013).



Globulol

Globulol es una de las sustancias más relevantes y de mayor uso para que con la extracción de su aceite esencial de diferentes especies de plantas actué como agente microbiano e insecticida para controlar insectos y dar como una alternativa a los plaguicidas sintéticos (Russo S, 2013).



4.4 Discusión

(García *et al.*, 2007) utilizando GC-MS, indican que en el aceite esencial obtenidos de las hojas de *Piper auritum* Kunth, identificaron como componentes mayoritarios a safrol en un 94,0 % y miristicina en un 3.2 % . En los estudios efectuados en esta investigación con la misma técnica, se determinaron a -Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1,8-Di-amino-octano, Butanal, 3-hidroxi, metabolitos que se asume presentan una actividad antifúngica frente a *P. pannosa*.

En los estudios efectuados por (Sánchez *et al.*, 2012), se obtuvieron por hidrodestilación, aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq, los mismos fueron probados *in vitro* frente a *Xanthomonas albilineans*, fitopatógeno que ataca a la estructura foliar de caña de azúcar, generándose una actividad bactericida, ocasionada por el isosafrol y notosmirnol, metabolitos fueron determinados por GC/EM. En la presente investigación también se estudió el hidrolato esencial de *P. carpunya*, mediante GC-MS y se determinó metabolitos secundarios con efectos antifúngicos frente a *P. pannosa*.

Según (Barbosa *et al.*, 2008) en la composición química del aceite esencial de las hojas de *Piper divaricatum* analizadas mediante GC-MS, se identificaron compuestos fenilpropanoides tales como metileugenol (63,8%) y eugenol (23,6%), además, terpenos como linalol (29%), β -pineno (25%) y alfa -pineno (18,8%). En este estudio, con la técnica citada, se analizó a -Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1,8-Di-amino-octano, Butanal, 3-hidroxi Etil-amina y 1,4-Butan,di-amina tanto de hidrolato como de macerado el cual actúa como anti fúngico contra *P. pannosa*.

En un estudio realizado por (Ferraz *et al.*, 2012), la composición química del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de *Piper amalago*, *Piper mikanianum*, y *Piper xylosteoides* la cual se realizó mediante cromatografía de gases. En donde *Piper mikanianum* y *Piper xylosteoides* presentan fenilpropanoides, mientras que *Piper amalago* presento más abundancia de hidrocarburos monoterpenos y sesquiterpenos. En la cromatografía de gases

efectuado al hidrolato y los macerados de *Piper carpunya* también se detectaron compuestos fenólicos y terpenicos mediante la misma técnica de GC/MS.

De acuerdo con (Sánchez *et al.*, 2012), para la determinación de la composición química del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con un inyector del tipo «split splitless» acoplado con un espectrómetro de masas de la misma manera en el presente estudio para identificar la composición química de *Piper carpunya*, se utilizó una columna con un capilar SHIM-S;HP-5 en espiral de 30 m de longitud x 0,25 mm de ID, film de 0,25 µm. El equipo estuvo acoplado a Helio (He) como gas transportador calibrado a 1ml/min y programado a una temperatura del inyector a 250° C.

(Olivero *et al.*, 2009) colectaron plantas del genero piperaceae y sus extractos fueron caracterizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC-MS), encontrándose varios metabolitos secundarios tales como trans-*B*- cariofileno, elemecina, germacreno D ,hidrato de trans sabineno y alfa-felandreno. En otra investigación realizada por (Jaramillo *et al.*, 2015), estudiaron varias especies de piperáceas, encontrándose principios activos tales como: *Piper dilatatum* (apiol y trans-cariofileno), *Piper aduncum* (dilapiol y cineol), *Piper divaricatum* (eugenol y metil eugenol), *Piper sp* (guaieno y elemol) y *Piper sanctifelicis* (3- careno y limoneno) a los cuales se les atribuyo actividad repelente contra insectos. El estudio efectuado en este documento en el extracto hidrodestilado y macerado de *Piper carpunya* se detectaron Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1,8-Di-amino-octano, Butanal, 3-hidroxi Etil-amina y 1,4-Butan,di-amina; cuya principal acción fue la antifúngica en contra de *P.pannosa*.

De acuerdo con (Noriega *et al.*, 2016) la especie de *Piper pubinervulum* C. la utilizan en el sur de Ecuador como planta medicinal de esta manera se analizaron propiedades químicas y de actividad biológica del aceite esencial que proviene de las hojas de dicha especie utilizando GC-MS, se identificaron

44 compuestos dentro los mayoritarios fueron β cariofileno, isoeugenol-metil éter, asarona y el nerolidol. En la presente investigación mediante la misma técnica de cromatografía acoplado a masas de encontraron Isopropil-etil-amina, 1-Propanamina, D-Norleucina, Pentil-4 enil-amina, 1,8-Di-amino-octano, Butanal, 3-hidroxi Etil-amina y 1,4-Butan,di-amina tanto de hidrolato como de macerado.

Los diferentes usos de la cromatografía son de gran importancia en el análisis de métodos de acuerdo al nivel de interés. De acuerdo con (Rodríguez *et al.*, 2011) se utilizó cromatografía complementaria (gaseosa-espectrometría de masas) para la medición de plaguicidas organoclorados en grasa de ganado porcino, encontrando gran cantidad de principios activos, en el presente estudio con la especie *P. carpunya* se utilizó cromatografía de gases acoplado a masas para determinar la cantidad de metabolitos de secundarios en el control del hongo *P. pannosa*.

Según el (Guitierrez *et al.*, 2011) se caracterizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas extractos obtenidos de *Phyllanthus orbicularis* macerados en hexano y acetato de etilo en donde se identificaron 17 compuestos en el primero y 19 en el segundo. En este estudio, se determinaron 8 compuestos en los extractos de *Piper carpunya* macerados en etanol de caña, etanol comercial, agua y su respetivo hidrolato y mediante cromatografías complementarias se encontraron además 24 analitos y trazas no identificadas

De acuerdo con (Marrero *et al.*, 2012) se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, ingredientes activos de un extracto lipídico obtenido a partir de los frutos de la palma real cubana, encontrándose un contenido total de 0.18 y 5.10% de componentes alcohólicos, determinándose que la cromatografía, no solo ayuda a identificar metabolitos secundarios específicos en extractos vegetales, sino que además identifica otros analitos con diferentes propiedades.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El etanol de caña, fue el solvente orgánico con mayor capacidad extractiva para mantener inmersos los metabolitos secundarios presentes de *Piper carpunya*, respecto a los demás solventes empleados.
- Los metabolitos descritos e identificados por cromatografía, son un aporte y contribución al estudio fitoquímico de *Piper carpunya* una especie utilizada etnobiológicamente por la comunidad de los Tsáchilas como planta medicinal.
- En los cromatogramas efectuados, se da a conocer que los picos y tiempos de retención evidenciados con el cromatógrafo AGILENT mejoran el nivel a absorbancia de los componentes, que a la vez son expresados en los espectros de masas correspondientes;
- Los componentes detectados en el equipo VARIAN, puntualizan el analito y al mismo tiempo permiten registrar mayor porcentaje de compuestos de una misma muestra, además de registrar trazas no identificadas.
- Los metabolitos secundarios descritos, son de amplio potencial anti fúngico, de acuerdo a la literatura especializada consultada, y los componentes evidenciados participan en este tipo de procesos.

5.2 Recomendaciones

- Utilizar solventes orgánicos polares, con el propósito de mejorar el nivel extractivo de las muestras vegetales
- Usar compuestos orgánicos de amplia volatilidad, para mejorar la captación de analitos presentes en los extractos botánicos
- Programar temperaturas ideales que permitan el fraccionamiento de iones cuantificables y de esta manera se puedan ser absorbidos y caracterizados en base a la biblioteca de espectros.
- Verificar a través del identificador de espectros NIST 14 los analitos presentes, ya que este software de búsqueda que permite identificar una serie de espectros de masas.

5.3 Bibliografía

- Álvarez D. (2013). Proyecto de factibilidad para ampliación de 5 hectareas de cultivo en la parroquia Alaquez - Provincia de Cotopaxi. Obtenido de Universidad Tecnológica Equinoccial. Guía para la protección y nutrición vegetal, (SATA). Oidio del rosal, Powdery mildew. Uruguay.: <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/7963>. Recuperado el 11/12/2017.
- Alzate N., Lopez V., Marin H., Murillo.,. (2009). Evaluación de la actividad fúngica de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cascara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbagua- ciencias químicas., pp 59-71. Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares. Universidad de Antioquia.
- Andrade J. (2010). Espectrometría de Masas. Obtenido de Universidad de Uruguay:
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf. Recuperado el 24/11/2016
- Anfoterós. (2009). Solventes Industriales. Obtenido de Blog creado por los alumnos de la Universidad Nacional de Ingeniería, con el fin de brindar información acerca de los solventes industriales:
<http://grupopetroquimica.blogspot.com/http://grupopetroquimica.blogspot.com/>. Recuperado el 05/01/2017
- Áricarpa D. (2012). Proyecto de Factibilidad para la ampliación de 5 hectareas de cultivo de la parroquia Alaquez - Provincia de Cotopaxi. Obtenido de Universidad Tecnológica Equinoccial. Guía para la protección y nutrición vegetal, (SATA):
<http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/7963>. Recuperado el 11/12/2017.

- Azambuja. (2013). Venta de Aceites esenciales. Dilapiol. Obtenido de Oleos essenciais direto do produtor: <http://www.oleosessenciais.org/dilapiol/>. Recuperado 12/01/2017.
- Barbosa Q., Camara C., Ramos C., Nascimientos D., Lima J., Guimaraes E.,. (2008). Composición química, el ritmo circadiano y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Divaricatum* platos rotos. Obtenido de una nueva fuente de safrol. Revista Dialnet.
- Bermudez R. (2011). Uso del compuesto químico alfa-zingibereno como agente repelente e insecticida en cultivos de tomate. Obtenido de <http://patentados.com/patente/uso-compuesto-quimico-alfa-zingibereno-como-agente/>. Recuperado el 11/12/2017.
- Bressa S. (2001). Purificación Catalítica de 1-buteno: estudio cinético y simulación de un reactor industrial de hidrogenación selectiva. Obtenido de Tesis Doctoral. SEDICI repositorio institucional. Universidad Nacional de la Plata.: <http://163.10.34.134/>.
- Butch N., Teufel J., Zoof J.,. (2016). 3-Hydroxybutanal. National Intitute os Standads and Technology. Material Measurement Laboratory. Obtenido de Ficha Técnica.
- Campodocs. (2012). Piperazina, Origen y denominación, Química, Producción industrial, Como un anti-helmintos, Otros usos, Derivados de la piperazina como medicamentos.
- Cañigueral S., V. R. (2015). Fitoterapia. Obtenido de Fitoterapia. Obtenido de <http://www4.ujaen.es/~jggascon/Temario/Fitoterapia1.pdf>.
- Carda M., Ventura E., Diaz S.,. (2011). Aminas Química Orgánica.
- Cardenas C. (2014). Repositorio ESPE. Obtenido de Repositorio ESPE: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/9218/3/Las%20Plantas%20Alelopaticas.pdf>
- Castillo E. (2014). Estudio preclinico de la Guaviduca (*Piper carpunya*) de propiedades y efecto antiulceroso en ratas wistar. Obtenido de Estudio preclinico de la Guaviduca (*Piper carpunya*) de propiedades y efecto antiulceroso en ratas wistar:

<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1332/7/CD00244-TEISIS.pdf>

- Celis A., Mendoza C., Pachon M., Cardona J., Delgado W., Cuca L., (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Revista Científica Scielo Agronomía Colombiana* 26(1), pp. 97-106.
- Cerpa M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid. Valladolid. pp. 257.
- Cerutti M., Neumayer F., (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario, Argentina. *Revista Redalyc*, pp. 149-145.
- Colomer J., Avila A., Diaz D., Castro G., Montalban I., Pozo J., Muñoz M., Sala P., Espinar S., Miron F., Escalon P., Mora R., (2014). Propiedades y Usos del Cadaleno. Obtenido de HSN blog nutrición, salud y deporte: <http://www.hsnstore.com/blog/>
- Córdova M., Chávez E., Leal R., (2015). Potencial Alelopático de extractos foliares de *Astragalus mollissimus* Torr., sobre la germinación in vitro de semillas de maleza. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5), pp. 1093-1103.
- Cruz P. (2009). Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla, matico y marco para neo-fármaco, Riobamba, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Agronómicas.
- Díaz N. (2012). Obtención y evaluación in vitro de la eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y Crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) como fungicidas naturales para el control de *Botrytis cinerea*, Phra. Obtenido de Escuela Politécnica del Ejército.
- Esquivel A., Vargas P., (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos poli funcionales. *Tecnología en Marcha. Revista Dialnet*, Vol. 20-4.

- Estrada S. (2010). Determinacion de la actividad antibacteriana In Vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgares*). Obtenido de Determinacion de la actividad antibacteriana In Vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgares*): <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>
- Fernandez G. (2012). Generalidades Limoneno. Quimica Organica. Obtenido de www.quimciaorganica.com
- Ferraz A., Balbino J., Zini C.,Ribeiro V., Bordignon S., Poser G.,. (2012). Actividad acaricida y la composcion quimica del aceite esencial a partir de tres *Piper* especies.
- Flores E. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana. Santa Cruz de la Sierra. Universidad de la Laguna. pp. 367.
- Gallego L. (2011). Unidad de Espectrometría de masas. Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación. Personal espectrometría de masas.
- Garcia A., Leyva M., Martinez J., Stashenko E.,. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum Kunth* (Piperacea) difundida en la costa colombiana. Scientia et Technica año XIII N° 33.
- Gónzales A. (2004). Obtención de aceites escenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Universidad Nacional de Colombia. .
- Gutiérrez Y., Miranda M., Bello A., Verona S., Montes de oca R.,. (2011). Caracterización química por cromatografía de gases/espectrometría de masas de dos extractos. Obtenido de *Phyllanthus orbicularis* HBK. vol.45 no.3. Cuba-Ciudad de la Habana.
- Hidalgo M. (2011). EUCALIPTOL. Obtenido de Año internacional de la química. IES "Zurbarán", 2º Bachto: http://cerezo.pntic.mec.es/~jgarc247/2_bachto/anho_internacional_quimica/03eucaliptol.htm

- Iglesias A. (2012). Contaminación odorífera estrategias de análisis de olores. *Revista Vida científica No 5. Colaboradores en Química. Facultad de Ciencias.*
- Information, N. C. (2008). PubChem Compound Database. Obtenido de CID=7354: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7354>. Recuperado 22/01/2017
- Izquierdo P., Allara M., Garcia A., Torres G., Rojas E., Piñero M.,. (2006). Aminas biogenas y bacterias de salchichón tipo milano. Efecto del tiempo de almacenamiento. *Revista Científica Scielo No 2. V16 . Maracaibo.*
- Jaramillo B., Duarte E., Pino N.,. (2015). Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Choco, Colombia. *Revista Toxicol (2015), pp 32:112-116.*
- Jarrin P. (2006). Introducción a la espectrometría de masas y sus aplicaciones en análisis ambiental. Obtenido de Espectros de masas. Laboratorio Virtual:
http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema7.pdf
- Krinski D., Foerster L.,. (2016). Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Scielo vol.40 no.6 Lavras. Universidad e do Estado de Mato Grosso/UNEMAT-Universida de Federal do Paraná/UFPR.*
- Lázaro F., René J., Rubén S.,. (2005). Método Simple y Rápido para la Determinación de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC). Laboratorio LADECOR (UNLP). Obtenido de Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. República Argentina.
- Lenma A. (2008). TERPINOL. Obtenido de Blog personal:
<http://terpinolterpineol.blogspot.com/>
- Marcano D., Vargas N., Pire A.,. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium*

- rolfsii y Thielaviopsis basicola. Universidad Central de Venezuela. Obtenido de Facultad de Agronomía. Revista Scielo Facultad de Agronomía v.22 n.4 Caracas.
- Marrero D., Rodriguez A., Gonzales V., Adames Y., Murillo R.,. (2012). La introducción de canela en esquemas de diversificación productiva. México.
- Moreno A., Flores J., Cuéltar M., Fernandez M., Hernández N., Guzmán P.,. (2010). La introducción de canela en esquemas de diversificación productiva. México.
- Noriega P., Mosquera T., Abad J., Cabezas D., Piedra S., Coronle I., Maldonado M., Bardiserotto., Vertuani S., Manfredini S. (2016). Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper pubinervulum* c. dc piperaceae. Revista de Ciencias de la Vida LA GRANJA 24 (2). Universidad Politécnica Salesiana, pp. 111-123.
- Nuño A. (2009). Toxinas vegetales con acción sobre el sistema nervioso. Aminas biógenas. Toxinas vegetales con acción antinutriente. Departamento de Farmacología y Terapéutica. Universidad Autónoma de Madrid. Diplomatura de Nutrición Humana y Dietética.
- Olivero J., Guette J., Stashenko E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. Redalyc- Sistema de información científica. Red de revistas científicas de América Latina, El Caribe España y Portugal. 8(5), pp. 419-427.
- Ordaz G., Armas H., Yañez D., Moreno S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. Scielo-Revista Biológica Tropical. Vol 59. Nº 9.
- Orozco M. S. (2014). Infusion, coccion y maceracion. Obtenido de Vivero Chimal: <http://www.viverochimalxochipan.com.mx/files/Infusion.pdf>

- Ostlund R., Racette S., y Stenson W. (2003). Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ». pp 1385-1589. Vol. 77, n.º 6.
- Parra J. (2011). Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de *Piper cf. cumanense* kunth (Piperaceae). Universidad Nacional de Colombia.
- Peluso F., Vives L., Varni G., Cazenave G., Gonzales J., Usunoff E. (2006). Evaluación preventiva espacial de riesgo sanitario por la instalación de un cementerio parque. Revista internacional de Cinca y Tecnología de la información Geográfica. nº6, pp. 1-14.
- Peredo H., Palou E., López A. (2009). Aceites esenciales: metodos de extracción. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla San Andres -México.
- Pérez E. (2012). Plaguicidas Botánicos. Obtenido de Una alternativa a tener en cuenta: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209125190002.pdf>.
- Proecuador. (2013). Análisis sectorial de las flores en Ecuador. Obtenido de <http://www.proecuador.gob.ec/pubs/analisis-sector-flores-2013>
- Quezada J. (2012). Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partirde *Piper carpunya* (Ruiz y Pav). Obtenido de Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de *Piper carpunya* (Ruiz y Pav): http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4261/1/JIMMY_RI.PDF
- Quilez, A. Berenquer, B. Gilardoni, G. Souccar, C. Mendonga, S. Oliveira, L. Calero, M. Vidari, G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. ELSERVIER-Journal of Ethnopharmacology, pp. 583-589.
- Ramos A. (2010). Introduccion Alcanfor. IQB-Diccionario Ilustrado de terminos medicos. Obtenido de Consejo Editorial y Entidades Colaboradores: <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha114.htm>
- RENAJABO. (2008). Red Nacional de Jardines Botánicos. Obtenido de <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBusca=r=1165&method=displayAAT>

- Renjifo L., Gaviria D. (2014). Análisis genotípico de los polimorfismos c677t y a1298c en el gen de la metilen tetrahidrofolato reductasa y el polimorfismo a66g en el gen de metionina sintasa reductasa en síndrome de down. Revista Scielo vol.25 no.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Riofrío J. (2012). Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de *Piper carpunya*. Universidad Católica de Loja.
- Rivera D. (2008). Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género piper y evaluación de la actividad citotóxica. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rodríguez A., Morales D., Ramírez M. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. Revista Científica Redalyc. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.
- Rodríguez O., Soto S., Velázquez R., Rodríguez G. (2011). Desarrollo y validación de un método analítico para la detección y cuantificación de plaguicidas organoclorados en grasa de ganado porcino con un sistema GC/PTV/EI/MS2. Revista científica Scielo. 42 (2). México.
- Rojas L. (2015). Caracterización química cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas medicinales. Secretaria Nacional de Educación Superior (Prometeo).
- Rueda X., MOgollon O. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Revista Redalyc-Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.
- Russo S. (2013). Toxicidad, efecto antialimentario y repelente de metabolitos secundarios de *Eucalyptus globulus* (Labill) (Myrtaceae) sobre coleópteros de importancia agrícola. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

- Saeidnia S., Manayi A., Gohari A., Abdollahi. (2014). Historia de Beta-Sisterol- Revisión. Centro de Investigación de Plantas Medicinales, Facultad de Farmaceutica, Universidad Tecnológica de Teherán. Revista Europea de Medicina de Plantas. ISSN: 2231-0894. Vol.: 4.
- Sánchez, Y. Correa, T. Abreu, Y. Pino, O. (2012). Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Y sus componentes sobre Xanthomas albilineans (ASHBY) DAWSON. Scielo-Revista protección vegetal. Vol.27 N° 1, pp. 34-39.
- Trabadela, C. Sánchez, S. Miño, P. Berenguer, B. Quilez, R. (2009). Gastroprotective Effects of Piper carpunya Against Diclofenac-Induced Gastric Lesions in Rats. Pharmaceutical Biology, pp. 829-837.
- UNAM. (2015). Oxido Beta- Carofileno. Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad de Informática del Instituto de Química. Derechos reservados.
- Yong A. (2004). Botanica- Piper carpunya. Cultivos Tropicales 25(2), pp. 53-67.
- Zambon S., Chamorro E. Caususcelli S. (2015). Estudio de la Pureza Óptica de Citronelal presente en los Aceites Esenciales obtenidos de Citronela y de Eucalipto Citriodora. Revista Scielo Vol. 26(4), pp. 29-36.