



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: MARÍA FERNANDA HURTADO VICENTE**

**TEMA: CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE DOS  
EXTRACTOS ALELOPÁTICOS OBTENIDOS DE *Cinnamon  
canella* Y *Piper angustifolium*, MEDIANTE CROMATOGRFÍA  
Y/O ESPECTROFOTOMETRÍA**

**DIRECTOR: Dr. CÁRDENAS, CARLOS MSc.**

**CODIRECTOR: Quim. GÍA, JAIME MSc.**

**SANGOLQUÍ, MARZO 2015**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo titulado “Caracterización fitoquímica de dos extractos alelopáticos obtenidos de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, mediante cromatografía y/o espectrofotometría”; fue realizado en su totalidad por la Srta. MARÍA FERNANDA HURTADO VICENTE como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, marzo de 2015



---

Dr. Carlos Cárdenas Tello  
DIRECTOR



---

Quim. Jaime Gía MSc.  
CODIRECTOR

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**


Yo, María Fernanda Hurtado Vicente

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Caracterización fitoquímica de dos extractos alelopáticos obtenidos de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, mediante cromatografía y/o espectrofotometría”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas al pie de página correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente el trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, marzo de 2015



---

María Fernanda Hurtado Vicente

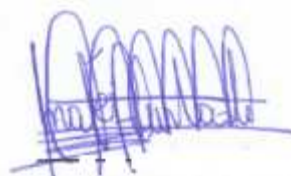
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORIZACIÓN**

Yo, María Fernanda Hurtado Vicente

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas, la publicación en la biblioteca virtual de la institución del proyecto de tesis “Caracterización fitoquímica de dos extractos alelopáticos obtenidos de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, mediante cromatografía y/o espectrofotometría”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, marzo de 2015



---

María Fernanda Hurtado Vicente

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor, esfuerzo y dedicación, para mi pequeño hijo DIDIER.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a DIOS por brindarme salud y vida a lo largo de éste arduo trabajo, a mi compañero de vida David que supo apoyarme en los momentos más difíciles, a mis padres José y Nancy que a pesar de sus diferencias han sabido inculcarme los mejores valores y guiarme por el camino del bien, a mis hermanos Pablo y Diego siempre muy solidarios y comprometidos con la familia, a Grace la hermana que siempre quise tener.

Muchas gracias Doc. Carlitos por todo el apoyo y comprensión brindada, ha sido mi guía durante estos últimos meses, al Ing. Henry Quevedo técnico de la Shimadzu que sin interés alguno me dio una mano con la finalización de mi tesis. A todo el personal de la carrera de Ciencias Agropecuarias IASA I, gracias infinitas por el buen trato y amabilidad prestada hacia mi persona.

Es triste dejar las aulas, los compañeros de clases, despedirme de mi segundo hogar, pero se vienen cosas mejores y será un hasta pronto, quizá mañana compartamos el privilegio de ser colegas.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN .....</b>	<b>II</b>
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....</b>	<b>III</b>
<b>AUTORIZACIÓN.....</b>	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESÚMEN.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER.....	2
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1. <i>Objetivo general del proyecto</i> .....	4
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	4
1.4 MARCO REFERENCIAL .....	5
1.4.1. <i>Alelopatía</i> .....	5
1.4.2. <i>Características generales de Cinnamon canella (canela)</i> .....	5
1.4.3. <i>Características generales de Piper angustifolium (pinku)</i> .....	7
1.4.4. <i>Fase de extracción</i> .....	9
1.4.5. <i>Tamizaje fitoquímico</i> .....	14
1.4.6. <i>Cromatografía</i> .....	24
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
2.1. PARTICIPANTES .....	31
2.2. PERIODO DE TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN .....	31
2.3. DISEÑO .....	31
2.3.1. <i>Fase de extracción</i> .....	31
2.3.2. <i>Cromatografía de gases</i> .....	32
2.3.3. <i>Variables de respuesta</i> .....	32
2.4. PROCEDIMIENTO.....	34
2.4.1. <i>Fase de Recolección</i> .....	34

2.4.2. Fase de Extracción.....	35
2.4.3. Tamizaje fitoquímico.....	38
2.4.4. Cromatografía de gases CG.....	47
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
3.1. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TAMIZAJE FITOQUÍMICO .....	48
3.1.1. Tamizaje fitoquímico del extracto de canela en hex.....	48
3.1.2. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en MeOH.....	49
3.1.3. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en EtOH.....	50
3.1.4. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en H <sub>2</sub> O.....	51
3.1.5. Tamizaje fitoquímico hidrodestilado de canela.....	52
3.1.6. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en hex.....	53
3.1.7. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en MeOH.....	54
3.1.8. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en EtOH.....	55
3.1.9. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en H <sub>2</sub> O.....	56
3.1.10. Tamizaje fitoquímico en el hidrodestilado de pinku .....	57
3.2. RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>C. CANELLA</i> .....	57
3.3. RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>P. ANGUSTIFOLIUM</i> .....	58
3.4. CROMATOGRFÍA DE GASES CG.....	61
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>63</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>67</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>78</b>



## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas cualitativas realizadas en plantas del género <i>Piper</i> . <i>P. doell smithii</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. diandrum</i> , respectivamente.....	17
Cuadro 2. Estimación visual y organoléptica del hidrodestilado de canela.....	37
Cuadro 3. Estimación visual y organoléptica del hidrodestilado de pinku.....	37
Cuadro 4. Diluciones preparadas para cada uno de los extractos de canela y pinku, previos al tamizaje fitoquímico.....	38
Cuadro 5. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto canela en hex.....	48
Cuadro 6. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en MeOH.....	49
Cuadro 7. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en EtOH.....	50
Cuadro 8. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en H <sub>2</sub> O.....	51
Cuadro 9. Resultados del tamizaje fitoquímico del hidrodestilado de canela.....	52
Cuadro 10. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en hex.....	53
Cuadro 11. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en MeOH.....	54
Cuadro 12. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en EtOH.....	55
Cuadro 13. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en H <sub>2</sub> O.....	56
Cuadro 14. Resultados del tamizaje fitoquímico del hidrodestilado de pinku.....	57

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del alcaloide – cafeína.....	18
Figura 2. Estructura de un tanino.....	19
Figura 3. Estructura de un fenol.....	20
Figura 4. Estructura de una saponina.....	21
Figura 5. Estructura de una cumarina.....	22
Figura 6. Estructura de una quinona u orto benzoquinona.....	24
Figura 7. Método de inyección de la muestra en la cámara de vaporización.....	26
Figura 8. Esquema general de un cromatógrafo de gases.....	29
Figura 9. Esquema del procedimiento para el registro de metabolitos secundarios en los macerados de <i>C. Canella</i> y <i>P. angustifolium</i> .....	45
Figura 10. Esquema del procedimiento para el registro de metabolitos secundarios en los hidrodestilados de <i>C. Canella</i> y <i>P. angustifolium</i> .....	46
Figura 11. G. de homogeneidad de la escala de registro estable observada vs. Esperada .....	60
Figura 12. Dendograma correspondiente a la cantidad de metabolitos secundarios obtenidos según el método de extracción .....	61
Figura 13. Cromatograma de hidrodestilado de la corteza de <i>Cinnamon canella</i> .....	62
Figura 14. Cromatograma de hidrodestilado de la corteza de <i>P. angustifolium</i> .....	62

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. <i>Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases para el análisis del aceite esencial de las hojas de canela</i> .....	29
Tabla 2. <i>Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases para el análisis del aceite esencial de tres especies de piperáceas</i> .....	30
Tabla 3. <i>Tratamientos con las diferentes combinaciones implementadas para la fase de extracción</i> .....	33
Tabla 4. <i>Diluciones preparadas para cada uno de los extractos de canela y pinku, previos al tamizaje fitoquímico</i> .....	38
Tabla 5. <i>Método de extracción, desviación estándar y medianas correspondientes al análisis de metabolitos secundarios en extractos de canela y pinku</i> .....	59

## LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1: Fase de extracción por arrastre de vapor aplicado a muestras de corteza de <i>C. canella</i> y de hojas de <i>P. angustifolium</i> .....	73
ANEXO 2: Fase de extracción por maceración en solventes orgánicos aplicado a muestras de corteza de <i>P. angustifolium</i> .....	75
ANEXO 3: Fase de extracción por maceración en solventes orgánicos aplicado a muestras de cortzas de <i>C. canella</i> .....	76
ANEXO 4: Fase de tamizaje fitoquímico.....	77
ANEXO 5: Fase de cromatografía de gases CG.....	78
ANEXO 6: Funcionamiento del Cromatógrafo de Gases SHIMADZU CG-2014.....	79
ANEXO 7: Funcionamiento del software GC solutions.....	80
ANEXO 8: Resultados cromatográficos de <i>C. canella</i> .....	81
ANEXO 9: Resultados cromatográficos de <i>P. angustifolium</i> .....	82

**ABREVIATURAS**

Canela	<i>Cinnamon canella</i>
Pinku	<i>Piper angustifolium</i>
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada grado 2
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
Hex	Hexano
CG	Cromatografía de gases

## RESÚMEN

Los extractos botánicos provenientes de plantas consideradas alelopáticas, constituyen una fuente natural no tóxica para el organismo humano, animal, y del medio ambiente. La planta de canela o *Cinnamom canella*, perteneciente a la familia de las *Lauráceas*, posee un olor característico, debido al aceite esencial aromático que constituye del 0,5 al 2,5% de su composición; siendo el componente mayoritario el aldehído cinámico, el eugenol y el alcohol cinámico. De la corteza del tallo se han preparado diferentes extractos (acuosos, aceite esencial), aislando metabolitos secundarios como taninos (Pahlow, 1981). Por otro lado, la planta de pinku o *Piper angustifolium* (Kohler), perteneciente a la familia de las *Piperáceas*, se le aduce propiedades antisépticas, antifúngicas, estimulantes, relajantes para combatir la ansiedad (Flores, 2006). Su eficiencia puede variar según la especie de piperaceae y aunque no se conoce con exactitud la biotoxicidad de esta planta, la etnomedicina considera como una planta medicinal que no produce efectos secundarios cuando se usa en la dosis adecuada. Los componentes activos de las piperáceas lo constituyen cumarinas, flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, saponinas y fenoles (Cruz, 2009). La caracterización fitoquímica complementaria de las muestras de canela y pinku se basa en la aplicación de la técnica de cromatografía de gases CG, un método físico de separación en la cual los componentes a separar se distribuyen entre una fase estacionaria (columna capilar) y otra fase móvil (gas helio), que mediante un rango de temperaturas controlado permite la volatilización de los compuestos inmersos en las muestras, detectando los metabolitos secundarios mayoritarios.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **CANELA**
- **PINKU**
- **TANINOS**
- **ALCALOIDES**
- **CROMATOGRAFIA DE GASES**

## ABSTRACT

The botanical extracts from plants considered allelopathic, constitute a natural source non-toxic to the human body, animal, and the environment. The plant of cinnamon or Cinnamon canella, belonging to the family of the Lauraceae, has a characteristic smell, due to the aromatic essential oil that is from 0.5 to 2.5 % of its composition; still the majority component the cinamico aldehyde, eugenol and alcohol cinamico. From the bark of the stem have been prepared different extracts (aqueous, essential oil), isolating secondary metabolites, such as tannins (Pahlow, 1981). On the other hand, the plant of pinku or Piper angustifolium (Kohler), belonging to the family of the Piperaceas, adduces his antiseptic, antifungoid, stimulant, relaxing properties to fight the anxiety (Flores, 2006). Its efficiency can change according to the species of piperaceae and although the biotoxicity of this plant is not known by accuracy, the etnomedicina thinks like a medicinal plant that it does not produce side effects when it is used in the suitable dose. The active components of the piperaceas constitute it cumarinas, flavonoides, alkaloids, steroids, triterpenos, saponinas and phenols (Cruz, 2009). The phytochemical characterization of complementary samples of cinnamon and pinku is based on the application of the gas chromatography technique GC, a physical method of separation in which the components are distributed to separate between a stationary phase (capillary column) and other mobile phase (helium gas), which has a controlled temperature range allows the volatilization of the compounds involved in the samples, detecting the secondary metabolites majority.

### KEY WORDS:

- CINNAMON
- PINKU
- TANNINS
- ALKALOIDS
- GAS CHROMATOGRAPHY

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Formulación del problema

En la actualidad el uso de productos naturales tiene un amplio campo de aplicación, los de mayor impacto constituyen los relacionados con el cuidado del medio ambiente, constituyéndose una fuente importante para el reemplazo de productos químicos aplicados por los agricultores. Por esta razón crece la necesidad de crear alternativas biológicas que representan opciones más viables de producción para el sector agrícola.

Los productos naturales, provienen en su gran mayoría de plantas denominadas alelopáticas, convirtiéndose en un “fenómeno diagnóstico” para la búsqueda de moléculas con actividades biológicas importantes. Así, la alelopatía es usada como una herramienta para identificar especies de plantas que puedan presentar efectos fitotóxicos (Oliveros, 2008).

Las plantas, en conjunto, producen más de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. Semejante diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano, o la predación de insectos y animales (Dixon, 2001). Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas (Jacobson, 1989). Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ottaway, 2001).

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas. (Matthews, 1993; Enriz, 2000; Calderón, 2001; Gonzalez-Coloma; 2002). La



selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales debe ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción.

La obtención de metabolitos secundarios de las diferentes especies vegetales se basa en la aplicación de técnicas y métodos químicos, ya sea utilizando solventes orgánicos o agua generadora de vapor saturado que al entrar en contacto íntimo con la muestra, separa los diferentes compuestos inmersos en las muestras botánicas.

En el presente ensayo se analizará la canela y pinku como posibles potenciales alelopáticos y mediante su caracterización fitoquímica se identificará el compuesto activo mayoritario y que pudiera estar ejerciendo algún tipo de actividad inhibitoria.

## **1.2 Justificación del problema a resolver**

Los extractos botánicos provenientes de plantas consideradas alelopáticas, constituyen una fuente natural no tóxica para el organismo humano, animal, y del medio ambiente. La mayoría de ellos han sido utilizados como alternativa al uso de agroquímicos en varios cultivos, como por ejemplo hortalizas, frutales y flores de verano. Razón por la cual se plantea la presente alternativa agroecológica para minimizar y manejar amigablemente el control fitosanitario.

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los vegetales han tenido un rol muy marcado en el incremento de la producción agrícola. Sin embargo el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias, no sólo ha causado enfermedades (Waterhouse, Carman, & Gridley, 1996) y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, sino también ha afectado al medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua.

Las plantas, en conjunto, producen más de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente, no-esenciales para el proceso metabólico básico de la

planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. Semejante diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano, o la predación de insectos y animales (Dixon, 2001). Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas (Jacobson, 1989). Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ottaway, 2001).

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas. (Matthews, 1993; Enriz, 2000; Calderón, 2001; Gonzalez-Coloma; 2002). La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales debe ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción.

Los hidrodestilados *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium* son productos botánicos, que por la acción antifúngica mostrada en otros estudios, serán utilizados con el propósito de ser aplicados como alternativa natural para minimizar el uso de agroquímicos, y reducir significativamente la proliferación de patógenos fúngicos tales como *Fusarium* sp. y *Capnodium* sp., que ocasionan daños fisiológicos en el aspecto foliar y floral en el cultivo de Ginger y Heliconia, razón por la cual la comercialización local disminuye notablemente, causando pérdidas económicas a los pequeños floricultores de la Parroquia “La Independencia”.

Las caracterizaciones fitoquímicas de cada uno de los extractos alelopáticos necesitarán de fundamentos científicos que los respalden y la utilización de las diferentes técnicas cromatográficas y espectrofotométricas ayudarán a su identificación.

Sin embargo, los agricultores, al ser los principales consumidores de éste tipo de productos naturales, no tendrán accesibilidad a este tipo de

metodología por lo que la investigación también va dirigida a la determinación de pruebas rápidas de tamizaje fitoquímico. Es decir, que simplemente con la adición de algunas gotas de reactivos específicos, se revelará la presencia de componentes en los extractos como: alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, cumarinas, flavonoides o quinonas. Estableciendo métodos aplicativos que se encuentren a alcance de todos, que sean cómodos y económicos al momento de ser utilizados.

El Ecuador al estar constituido por varios grupos étnicos y comunidades indígenas, el uso de los extractos naturales por parte de estas agrupaciones, tienen un sinnúmero de aplicaciones. Entre las principales se encuentran las propiedades medicinales, anti inflamatorias, de relajación para la canela y energizante, cicatrizante para el pinku.

Incluso el pinku, es una planta propia de la región de Santo Domingo de los Tsáchilas y la comunidad étnica propia de esa región, está trabajando en la comercialización del té de pinku. Actualmente la preparación de dicha infusión se la está realizando en los laboratorios de bioquímica de la carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I), a cargo del Dr. Carlos Cárdenas. Es así, que la cuantificación de los componentes fitoquímicos a realizarse en mi proyecto de tesis, servirá de aporte científico a la iniciativa de la comunidad e incluso la venta del producto tendrá un respaldo y por ende la acogida del consumidor.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general del proyecto**

- Determinar los componentes fitoquímicos mayoritarios, de los extractos de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, mediante tamizaje, cromatografía y/o espectrofotometría.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Analizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, mediante tamizaje fitoquímico.

- Definir la presencia de determinados metabolitos secundarios en los extractos de *C. canella* y *P. angustifolium*, mediante análisis cromatográfico.
- Escribir un artículo científico, a ser presentado en un congreso de ciencias o sumitado en una revista indexada local o internacional.

## **1.4 Marco referencial**

### **1.4.1. Alelopatía**

El uso de plaguicidas botánicos tuvo su auge en EE.UU. en 1966, y desde entonces ha declinado de manera continua. Ahora el piretro es el único producto botánico clásico que tiene un uso significativo. Algunos insecticidas más nuevos derivados de las plantas que han entrado en uso son denominados como florales o productos químicos con aroma de plantas e incluyen limoneno, cine aldehído, y eugenol. Además, está la 5-azadiractina (metabolito secundario) presente en las semillas del árbol de neem (*Azadirachta indica*), la cual es usada bajo invernaderos a campo abierto y en diversidad de plantas (Aguirre, 2009).

Debido al mejoramiento de las técnicas de aislamiento y caracterización de ingredientes activos, sumado al diseño novedoso de cultivos y bioensayo, la investigación es dirigida a la determinación de la naturaleza estructural de los productos naturales que son responsables de los efectos fitotóxicos observados, dándole un resurgimiento a la alelopatía y convirtiéndola en un “fenómeno diagnóstico” para la búsqueda de moléculas con actividades biológicas importantes. Así, la alelopatía es usada como una herramienta para identificar especies de plantas que puedan presentar efectos fitotóxicos (Oliveros, 2008).

### **1.4.2. Características generales de *Cinnamon canella* (canela)**

*Cinamon canella J.* es originaria de Ceilán (Sri Lanka) y medra en la India, Japón, Guayana, Brasil, e islas de Borbón y Mauricio. Conocida desde hace varios siglos con el nombre de *kinnamon*, antiguamente se la utilizaba

con fines terapéuticos y como especia. Perteneciente a la familia de las *Lauráceas*, es conocida con varios nombres vulgares o comunes: canyella (catalán); cannelle, cannella, cannelle odorante (francés); Cinnamom (inglés); Zimmet, Kaneel, (alemán); caneleiro (portugués); cannella (italiano); gui-zhi (chino); kurundu (cingalés). Morfológicamente *la canela* es un árbol de hasta 7 m de altura, tronco liso cubierto por una corteza grisácea por fuera y rojiza por dentro. Las hojas son ovaladas, persistentes, coriáceas, y recorridas longitudinalmente por cinco nervios; son de color verde brillante, el haz, y glaucas y reticuladas en el envés. Las flores son pequeñas, de colores blanco amarillento y dispuestos en racimos laxos y sedosos. El fruto es una baya oval de color violeta rodeada en su base por el cáliz; su pulpa es verdosa. Todas sus partes poseen el característico olor a canela (Ceron, 2006).

#### **1.4.2.1. Taxonomía**

Según (Ceron, 2006) la clasificación taxonómica de canela es:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Laurales

**Familia:** Lauraceae

**Género:** *Cinnamom*

**Especie:** *Cinnamon canella*

#### **1.4.2.2. Actividad biológica de *C. canella* (canela)**

El olor característico de la canela se debe al aceite esencial aromático que constituye del 0,5 al 2,5% de su composición. El componente mayoritario es el aldehído cinámico, también el eugenol y el alcohol cinámico. Con menos proporción encontramos el ácido trans-cinámico, el aldehído hidroxicinámico, el aldehído o-metoxicinámico, acetato cinámico, terpenos (linalol, diterpeno), taninos, mucílago, proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, glúcidos y trazas de cumarina (Izco, 2005).

Los fitofluidos obtenidos de la canela registran principios activos de efectos biológicos, que pueden ser usados para prevenir el deterioro de comida por acción microbiana (Juglal, 2002).

Sus beneficios medicinales se basan en los principios relajantes. Incluso es utilizada para sedar o cicatrizar heridas a nivel de mucosas, como lo hacen en las papilas gustativas. Su ingesta ayuda a aliviar molestias estomacales, reduce los niveles de azúcar en sangre y tan solo una media cucharadita disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre. La canela es muy utilizada para el tratamiento de resfriados, gripes y bronquitis, por su alto poder calorífico. Una forma de incorporar esta especia podría ser añadiéndola en alimentos tales como el café, té, zumos, cereales o tostadas y chocolate con y sin leche (Pamplona, 1995).

#### **1.4.2.3. Composición química**

De la corteza del tallo se han preparado diferentes extractos (acuosos, tintura y aceite esencial), y se han evaluado para conocer su acción antibiótica frente a varias especies (Pahlow, 1981). La canela contiene taninos que explican su acción astringente y antidiarreica ya que precipitan las proteínas superficiales de las células, disminuyendo su permeabilidad, y originando una capa proteica insoluble sobre la mucosa inflamada, que protege de las sustancias irritantes e impide las exudaciones y secreción mucosa, así como la absorción de toxinas bacterianas dando como resultado una acción antidiarreica.

#### **1.4.3. Características generales de *Piper angustifolium* (pinku)**

Según (Cruz, 2009) *Piper angustifolium* (Kohler), es una planta medicinal que se la encuentra entre los 1500 a 3000 msnm, de ahí que es considerada como una planta propia de la serranía templada. Morfológicamente es una planta arbustiva de hasta 2 m de alto, presenta un tallo leñoso y prismático de color café oscuro; hojas glabras, rugosas, con gran cantidad de resina. Los tallos y las hojas generan una resina algo pegajosa al tacto, considerada

como una planta cicatrizante en la serranía ecuatoriana, el alto andino peruano, Bolivia, y parte de Colombia.

#### **1.4.3.1. Taxonomía**

Según (Cruz, 2009) la clasificación taxonómica para matico es la siguiente:

**Reino:** Plantae

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Piperales

**Familia:** Piperaceae

**Género:** Piper

**Especie:** *Piper angustifolium*

#### **1.4.3.2. Actividad biológica de fitofluidos registrados en**

##### ***Piperáceas***

Los taninos tienen acción cicatrizante, anti-inflamatoria, antiséptica, antibacteriana, y antifúngica. Sin embargo, su eficiencia puede variar según la especie de piperaceae. Aunque no se conoce con exactitud la biotoxicidad de esta planta, la etnomedicina considera como una planta medicinal que no produce efectos secundarios cuando se usa en la dosis adecuada. En otra de las variedades conocidas como *Piper elongatum* los compuestos principales son la Canfora (22.7%), el Canfene (21.2%), Isoborneol (11.5%). También presenta alfa pineno, mirceno, limoneno, borneol y terpinol acetato. El aceite esencial contiene 5-metoxi-6 (2'-propen) - benzodioxole, dillapiol, etoxidillapiol, mirisicina y piperitona (Cruz, 2009).

Económicamente, las especies de la familia Piperaceae son importantes en el mercado mundial por la producción de pimienta. El fruto maduro de *Piper nigrum* es la fuente de pimienta blanca, mientras que el fruto inmaduro de la misma especie es la fuente de la pimienta negra (Flores, 2006).

Numerosas especies del género *Piper* tienen una gran popularidad en los sistemas de la medicina tradicional Ayurvedica de la India. En las islas del Pacífico a partir de las raíces de *P. methysticum*, arbusto conocido como

kava, se prepara una bebida refrescante, que es consumida habitualmente como tranquilizante para combatir la ansiedad. Las raíces y frutos de *P. chaba* poseen numerosas aplicaciones en medicina y en particular son útiles para tratar el asma, la bronquitis, el dolor de abdomen, como estimulante y para curar afecciones hemorroidales; *P. brachystachyum* presenta propiedades insecticidas y los tallos de *P. futukadsura*, planta medicinal China, es ampliamente usado para el tratamiento del asma y la artritis (Flores, 2006).

#### **1.4.3.3. Composición química**

Los componentes activos más importante del pinku desde el punto de vista cuantitativo lo constituyen los taninos, a los cuales se les atribuye propiedades cicatrizantes. Estas sustancias se encuentran en una concentración de 5 - 7%. También contiene cumarinas, flavonoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, saponinas y fenoles (Cruz, 2009).

#### **1.4.4. Fase de extracción**

##### **1.4.4.1. Extracción por destilación con arrastre de vapor (Hidrodestilación)**

Cuando la destilación separa los componentes dando lugar a dos fases no miscibles se denomina "hidrodestilación" (Bruneton, 2001), en donde la materia prima está en contacto íntimo con el agua generadora de vapor saturado (Gunter, 1948).

Según (Bruneton, 2001), la muestra vegetal a ser extraída, será previamente preparada para que los aceites abandonen las glándulas en los que están contenidos, para lo cual se lleva a cabo la molienda, que dependerá del tipo de muestra (hojas, flores, y partes no fibrosas o frutos y semillas). (Guerra & Panduro, 2012), indican que los aceites esenciales son productos obtenidos a partir de la muestra vegetal y están formados por varias sustancias orgánicas volátiles y extraíbles mediante destilación por



arrastré de vapor. Según la volatilidad de los compuestos que se pueden extraer, se encuentran respectivamente: los alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, y fenoles; que se producen y se almacenan en los canales secretores de las plantas. Incluso, afirman que todos estos componentes fitoquímicos contienen propiedades curativas, como por ejemplo: las propiedades espasmolíticas, sedantes y antifúngicas de los ésteres.

En el proceso convencional el vapor extrae el aceite esencial del material vegetal acompañado de "agua floral", ésta agua contiene una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido. Si un hervidor es usado para suministrar el vapor saturado, el agua floral puede ser reciclada continuamente, por lo que es almacenada como un sub-producto y va ser utilizado en el presente ensayo como los extractos naturales (Cerpa, 2007).

El generador de vapor no forma parte del recipiente donde se almacena la materia prima, es externo y suministra un flujo constante de vapor. Su presión es superior a la atmosférica, pero el vapor efluente, que extrae al aceite esencial está a la presión atmosférica. La materia prima forma un lecho compacto y un reflujó interno de agua debido a la condensación del vapor circundante (Burillo, 2003).

Para describir el proceso de hidroddestilación se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones: la materia prima vegetal es cargada en un destilador, de manera que forme un lecho fijo compactado. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación del vapor puede ser local (hervidor), remota (caldera) o interna (base del recipiente) (Burillo, 2003).

Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del hidrodestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, la cual, es separada en un decantador dinámico o florentino (Burillo, 2003).

Este equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando, debido a su casi inmiscibilidad (baja capacidad para disolverse) en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación del aceite. El vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en el florentino, es llamado “agua floral” (Alcaraz & Real, 2012).

#### **1.4.4.2. Extracción por maceración hidroetanólica e hidrometanólica**

La “extracción por maceración”, es el proceso en que la materia prima está en contacto íntimo con algún tipo de solvente (Domínguez, 1990). Es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en solventes no miscibles, con distinto grado de solubilidad, que están en contacto a través de una interfase. En la extracción con solventes se distribuye un soluto entre dos fases líquidas inmiscibles. Esta técnica es muy útil para efectuar separaciones muy rápidas y limpias, de sustancias orgánicas como inorgánicas.

La extracción puede clasificarse dependiendo del estado físico de los materiales: sólido-líquido o líquido-líquido. Por sus características, la

extracción puede ser continua o discontinua. En la extracción líquido- líquido, el compuesto se encuentra disuelto en un disolvente A y para extraerlo se usa un disolvente B, inmiscible en el primero. Cuando se usa un embudo de separación, las dos fases A y B se agitan entre sí, con lo que el compuesto se distribuye entre las dos fases de acuerdo con sus solubilidades en cada uno de los dos líquidos (Domínguez, 1990).

La extracción sólido-líquido, se emplea cuando la sustancia que se desea extraer está contenida en un material sólido, junto con otros componentes, los cuales deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado. Es muy usada para aislar sustancias naturales de origen vegetal, o bien, de mezclas resinosas obtenidas por síntesis. Para esto, se suele emplear un aparato Soxhlet, que es un aparato de extracción continua (Ávila, 2001). También puede emplearse un método directo, calentando el sólido junto con el disolvente en un matraz y colocando un refrigerante en posición vertical para que se condense el disolvente que está hirviendo y no se pierda. A esta operación se le llama calentamiento a reflujo, y se lo hace hasta que el producto deseado se encuentre disuelto en dicho disolvente (Fessenden, 1993).

Por lo general la extracción por maceración se realiza a una temperatura ambiente de entre 15° C y 20° C. El líquido para la solución puede ser agua, etanol, metanol, entre otros. En la presente investigación se experimentará con etanol (macerado hidroetanólico), con metanol (macerado metanólico), y con hexano (macerado hexánico).

Las dosis a macerar, siempre en términos generales, será a razón de una parte de planta por veinte de líquido. La maceración es útil cuando los principios son fácilmente solubles en frío y cuando la acción de la temperatura los altera. La maceración de plantas aromáticas como la de *C. canela*, se debe realizar con etanol o metanol al 80 % entre las dos y doce horas (Della, Batro, & Estévez, 2009).

Las muestras vegetales se ponen en contacto con el solvente en un recipiente de cierre perfecto a temperatura ambiente. Se deben realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar el gradiente de concentración. Al principio de la extracción este gradiente está en su punto máximo, con el correr de los días a pesar de la agitación, va disminuyendo. Como norma se macera la muestra vegetal por 7 días con agitación frecuente y protegido de la luz solar. Si el solvente es agua, no sobrepasar las 48 horas para evitar fermentación y formación de mohos. Se separa el extracto del residuo por medio de un colado o prensado, se lava el residuo con el líquido de extracción (Della, Batro, & Estévez, 2009).

→ Variantes

- La maceración puede ser SIMPLE o fraccionada. Para el primero de los casos se utiliza una sola alícuota del solvente y una vez cumplido el lapso indicado se procede a exprimir el residuo, lavado del mismo y filtrado de la solución extractiva obtenida a fin de clarificarla.
- En la maceración FRACCIONADA, el volumen total del solvente a utilizar es fraccionado en alícuotas, y se procede como en la maceración simple pero con lapsos de tiempos menores para cada uno de los pasos. Esta variante permite una mejor extracción de los principios solubles dado que se establecen mayor cantidad de equilibrios. Una vez realizadas todas las extracciones, se juntan las alícuotas de solución extractiva obtenidas y se filtran con el fin de clarificarlas.
- También puede realizarse una maceración COMPUESTA: poniendo en contacto el material en forma sucesiva con distintos solventes.

#### **1.4.4.3. Extracción por maceración hexánica**

El hexano es un disolvente orgánico no polar y es utilizado en métodos de extracción por tener baja solubilidad en agua, alta capacidad de solvatación hacia la sustancia que se va a extraer y bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación posterior (Fessenden, 1993).

Una característica muy importante de los disolventes es la polaridad, debido a que determina la solubilidad y el orden de elución de los compuestos en técnicas de separación como la cromatografía (Jaramillo, 2001). La polaridad y, consecuentemente, la solubilidad de los compuestos orgánicos en disolventes polares, aumenta con la disminución de la longitud de la cadena hidrocarbonada, la presencia de grupos funcionales polares y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno con el disolvente (Cienytech, 2014).

Por lo general los solventes orgánicos más utilizados son el éter de petróleo, hexano, tolueno, benceno, acetona. Los compuestos a extraerse con mayor facilidad son los alcanos, nitros, alquinos, alquenos, éteres, alcoholes.

El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos. En la etapa de recuperación de los solventes (atmosférica o al vacío), después de los condensadores ha de disponerse de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente. El material residual en la marmita de destilación, contiene concentrados las materias odoríficas y se le conoce como “concentrado” (Sánchez, 2006).

#### **1.4.5. Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico, es la etapa inicial de la investigación para determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, y a partir de allí realizar la extracción para el aislamiento de los grupos de mayor interés, utilizando los

solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración (Swain, 2003).

La planta es un sistema compuesto de diferentes rutas biosintéticas, cuya principal fuente de activación es la fotosíntesis que origina en las hojas los metabolitos primarios, y por procesos bioquímicos, con la ayuda de algunas enzimas, se obtienen unidades azucaradas (Morales, 1997).

A través de las rutas de obtención de los metabolitos primarios, y por procesos bioquímicos ayudados por enzimas, se generan metabolitos secundarios que son los componentes finales del metabolismo de las plantas. Estos metabolitos secundarios deben ser extraídos de la forma en que se presenten tratando de no alterar sus propiedades biológicas (Sanabria, 1983).

Los principales metabolitos a obtenerse de la extracción de las muestras de *Cinnamon canella* son: alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, cumarinas, flavonoides y quinonas. Los que se obtendrían de las muestras de *Piper angustifolium* o los más comunes del género *Piper* son: alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas (Flores, 2006).

(Lock, 1988), comenta que si el extracto crudo posee el efecto deseado, podría parecer contradictorio el tener que aislar el principio activo que contiene dicha planta. La concentración del principio activo de las plantas es pequeño (generalmente 0.1 – 2.0 % en la planta, en otros casos menos que 0.01 %).

(Zuñiga, 2011), comenta que la identificación de alcaloides en la corteza de canela se caracteriza mediante los reactivos de Mayer's, Dragendorff y Wagner. Los taninos y fenoles se identifican con el ensayo del cloruro férrico. Mediante la prueba de la espuma se caracteriza saponinas. Con el ensayo de Shinoda se identifican flavonoides y con el ensayo de Börntrager

se identifican quinonas. La caracterización de estructuras de secuencias C6-C3-C6 del grupo de flavonoides se determina mediante el ensayo de antocianinas.

Según (Rivera, 2008), las pruebas para determinar alcaloides en muestras vegetales del género *Piper* se basan en los reactivos de Dragendorff, Mayer's y Wagner. Taninos y fenoles son identificados con el ensayo del cloruro férrico. Con la prueba de la espuma se caracterizan a las saponinas y con el ensayo de hidróxido de potasio al 10% se determinan cumarinas. Para la caracterización de flavonoides y estructuras de secuencias C6-C3-C6 se emplea el ensayo de Shinoda y antocianinas, respectivamente. El ensayo de Börntrager identifica quinonas.

(Rivera, 2008), indica que las pruebas cualitativas (precipitación, coloración, test de espuma, otros) realizadas en las muestras del género *Piper* evidenciaron la presencia de ciertos metabolitos. En el cuadro 1 se muestran las pruebas cualitativas y sus resultados.

Cuadro 1.

**Pruebas cualitativas realizadas en plantas del género Piper. *P. doell smithii*, *P. peltatum* y *P. diandrum*, respectivamente.**

<b>Especie / Pruebas</b>	<b><i>P. donnell smithii</i></b>	<b><i>P. peltatum</i></b>	<b><i>P. diandrum</i></b>
<b>Alcaloides</b>	No hay presencia de precipitado, sin embargo hay cambio de color con los tres reactivos utilizados (+)	No hay presencia de precipitado, sin embargo hay cambio de color con los tres reactivos utilizados (+)	Solamente presentó cambio de color con el reactivo Dragendorff y Wagner (+)
<b>Saponinas</b>	Presentó 0.7cm de espuma (+)	Presentó 1.5cm de espuma (+)	Presentó 0.6cm de espuma (+)
<b>Taninos</b>	No se presentó ninguna reacción (-)		
<b>Flavonoides y Antocianinas</b>	Los 5 tubos examinados algunos presentaron una coloración amarilla palida con sospecha de isoflavonas, otros no presentaron coloración por lo que se sospecha la presencia de isoflavononas, chalconas y auronas		
<b>Antraquinonas</b>	No se presentó ninguna reacción (-)		
<b>Cumarinas</b>	Las tres plantas reaccionaron con el hidróxido de potasio dando una coloración verde (+)		

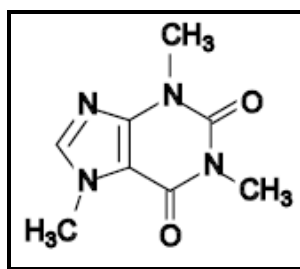
Fuente: (Rivera, 2008)

#### **1.4.5.1. Características de los Alcaloides**

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas, conociéndose actualmente alrededor de 5500. Han sido aislados de semillas, raíces, cortezas y hojas, pudiendo encontrarse al estado libre, como glicósidos o formando sales con ácidos orgánicos. Presentan notables propiedades fisiológicas y toxicológicas, que se ejercen fundamentalmente sobre el sistema nervioso central, con predominio en alguno de sus niveles. Manifiestan significativamente actividad farmacológica (Lock, 1988).



En el término alcaloide se incluyen aquellas sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, como se indica en la figura 1. La presencia de oxígeno en la estructura determina que la sustancia sea un sólido blanco, de sabor amargo y cristizable. La ausencia de oxígeno en la estructura del alcaloide hace que éste sea aceitoso, volátil u odorante (Lock, 1988).



**Figura 1. Estructura del alcaloide – cafeína**  
Fuente: (Lock, 1988)

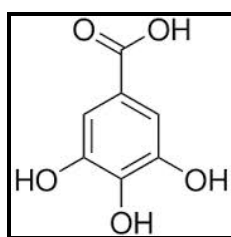
La mayoría de los alcaloides son insolubles o muy poco solubles en agua, pero se disuelven bien en alcohol, éter, cloroformo u otros solventes orgánicos. Se combinan con ácidos para dar sales, comportándose entonces como bases. Las sales son bastante solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos. En la diferencia de solubilidades de la base alcaloidea y de sus sales en agua y en solventes orgánicos se basa el método general de extracción. Todos los alcaloides son activos a la luz polarizada. Presentan una fluorescencia característica bajo la luz UV o IR, dando lugar a espectros característicos (UNODC, 2012).

Para la investigación de tóxicos alcaloideos en materiales biológicos se requiere de extracción desde una determinada muestra, una posterior purificación y la aplicación de metodologías de identificación. Dentro de estas últimas se consideran reacciones generales para alcaloides, reacciones de caracterización de alcaloides y técnicas de identificación y cuantificación mediante CG y HPLC (UNODC, 2012).

Si la muestra constituye un material sólido se procederá con el método de extracción continua. En caso de ser una muestra líquida se tiene el método clásico de extracción en ampolla.

#### 1.4.5.2. **Características de los Taninos**

Los taninos son compuestos polifenólicos no nitrogenados, como se indica en la figura 2.



**Figura 2. Estructura de un tanino**  
Fuente: (Lock, 1988)

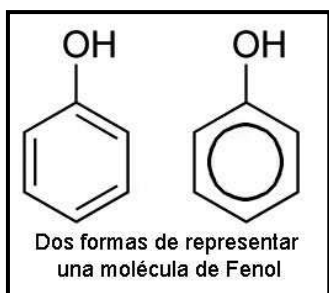
Los taninos son muy astringentes y de gusto amargo que producen las plantas. Tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Los taninos se utilizan en el curtido de pieles. Tiene varias propiedades medicinales, como las de cicatrizante de heridas y constricción de los vasos sanguíneos, lo cual disminuiría el riesgo de enfermedades cardíacas. Se extraen de las plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, que luego se decanta y se deja evaporar a baja temperatura hasta obtener el producto final (Lock, 1988).

La fórmula  $C_{14}H_{14}O_{11}$ , es considerada la fórmula del tanino común. Los taninos se clasifican de acuerdo a su vía de biosíntesis y a sus propiedades químicas, y se dividen en hidrolizables y condensados. Los taninos condensados, son polímeros de un flavonoide llamado antocianina. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples. Son más pequeños

que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad (Taiz, Lincoln, & Zeiger, 2006).

#### 1.4.5.3. **Características de los Fenoles**

Los fenoles también llamados ácido carbólico, ácido fénico, ácido fenílico, hidróxido fenílico, hidroxibenceno u oxibenceno. Su estructura se ha utilizado para diseñar derivados con mayor actividad antibacteriana y menor toxicidad, sustituyendo hidrógenos del anillo bencénico por radicales alquílicos o halógenos. Son compuestos hidroxilados en que el grupo funcional va unido a un carbono que forma parte de un anillo aromático (Carey, 2000). El representante más típico es el fenol ordinario o ácido fénico, derivado del benceno, como se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Estructura de un fenol**  
Fuente: (Carey, 2000)

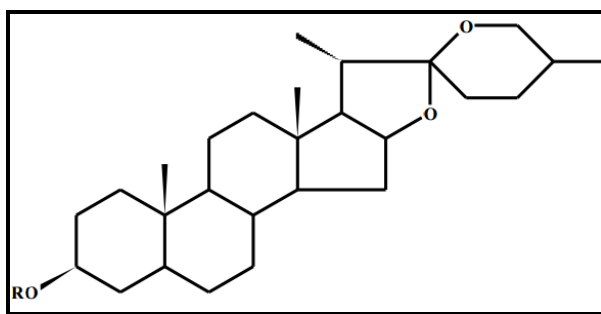
Los compuestos fenólicos, presentan una amplia ubicuidad en la naturaleza. Son responsables del buen funcionamiento de las plantas y, en su relación con el hombre, son utilizados para tratar desordenes cardiovasculares y prevenir algunos cánceres. Poseen una estructura química adecuada para ejercer actividad antioxidante, la cual está íntimamente relacionada con tales propiedades. Para su extracción se utilizan solventes polares cuyo extracto posteriormente se concentra (Solomons, 1971).

El fenol es soluble en agua (1 gramo se solubiliza en 15 mL de agua) y deliquescente (absorbe la humedad del aire y se disuelve). El fenol licuado es miscible en alcohol, éter y glicerol. El fenol cristal es muy soluble en

alcohol, diclorometano, cloroformo, éter, glicerol y aceites esenciales; un gramo de fenol cristal es soluble en 70 mL de parafina líquida (Wade, 2002).

#### 1.4.5.4. **Características de las Saponinas**

Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espirostanos como se muestra en la figura 4. Tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas (Martínez, 2001).



**Figura 4. Estructura de una saponina**  
Fuente: (Martínez, 2001)

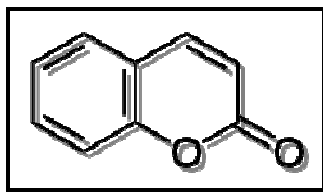
Tiene propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea (Taiz, Lincoln, & Zeiger, 2006).

Las saponinas esteroides por su carácter glicosídico, son insolubles en solventes apolares. Para obtenerlas de las plantas o animales, el material seco y molido se desengrasa previamente con un solvente apolar (generalmente éter de petróleo o n-hexano).

#### **1.4.5.5. Características de las Cumarinas**

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidas en las plantas, pudiendo encontrarse en todas las partes de la planta, desde la raíz a flores y frutos, presentándose a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos. Tienen un amplio rango de actividad biológica como la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, actividad antibiótica y estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina (Lock, 1988).

Todas la cumarinas se caracterizan por el sistema venzo - pirona, como se muestra en la figura 5. Su carácter lactónico hace que sea solubilizada por soluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo en la solución. El hecho que aproximadamente el 95 % de las cumarinas poseen sustituyente oxígeno en el C-7 hace que se considere a la 7-hidrocumarina o umbeliferona como el compuesto padre, mejor que la cumarina (Lock, 1988).



**Figura 5. Estructura de una cumarina**  
Fuente: (Lock, 1988)

Las cumarinas están biogénicamente relacionadas a los fenilpropanoides como flavonoides y ligninas, así como a las sustancias derivadas del acetato, como esteroides y terpenoides, ya que su biosíntesis transcurre por ambas vías: vía del shikimato y la vía del policetido del acetato.

#### **1.4.5.6. Características de los Flavonoides**

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más comunes, ampliamente distribuidos y característicos de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos, más que ningún otro, contribuyen al color de las

flores y frutos en la naturaleza. Los flavonoles (del latín flavus: amarillo) dan color amarillo o naranja, mientras las antocianinas proporcionan el color rojo, azul o violeta, es decir todos los colores del arco iris salvo el verde. Este tipo de heterociclos con oxígeno, que son los flavonoides, está restringido a las plantas superiores y los helechos (Flores, 2006).

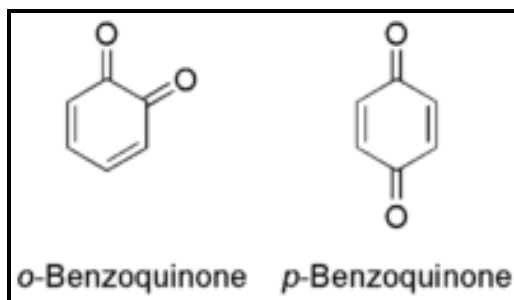
Biológicamente, los flavonoides desempeñan un papel importante en la polinización y alimentación de los insectos en las plantas; algunos tienen un sabor amargo que repele a ciertas orugas e impide que se coman las hojas de las especies que los contienen. Por otra parte, el hombre consume cantidades considerables de flavonoides en la dieta vegetal, lo cual se considera beneficioso para la salud humana, dada sus propiedades antioxidantes, protegiendo contra enfermedades vasculares y algunos tipos de cáncer (Flores, 2006).

Sin embargo, en los últimos años los flavonoides han despertado el interés de los farmacólogos debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, así podemos citar su acción antialérgica, anti-inflamatoria, antiviral, antimicrobiana, antiparasitaria, antioxidante, antimutagénica, anticancerígena y como modulador de la actividad enzimática (Flores, 2006).

Según (Flores, 2006), tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*, se ha aislado doce flavonoides. Los flavonoides aislados se agruparon en función del grado de oxidación del anillo C de benzo- $\gamma$ -pirona.

#### **1.4.5.7. Características de las Quinonas y compuestos relacionados**

Una quinona u orto benzoquinona, es uno de los dos isómeros de la ciclohexanodiona o bien un derivado de los mismos. Su fórmula química es  $C_6H_4O_2$ , y se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Estructura de una quinona u orto benzoquinona**  
 Fuente: (Lock, 1988)

Las quinonas están ampliamente presentes en el mundo natural. Son constituyentes comunes de moléculas biológicamente relevantes (por ejemplo, la vitamina K1, que es la filoquinona) (Martínez, 2012). Otros sirven como aceptor de electrones en cadenas de transporte de electrones como las de los fotosistemas I y II de la fotosíntesis y la respiración aeróbica. Un ejemplo natural de quinonas como agentes oxidantes es el spray de los escarabajos bombarderos. La hidroquinona se hace reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir una ráfaga ardiente de vapor, un fuerte elemento disuasorio en el mundo animal. Las quinonas pueden reducirse parcialmente a quinoles. Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico (Lock, 1988).

#### **1.4.6. Cromatografía**

La cromatografía permite separar los componentes de una sustancia. La separación se consigue a través de diversas técnicas. Por ejemplo, se pueden separar moléculas en función de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, sus constantes de ionización, o bien en función de la disposición de sus enlaces que determina su estructura isómera o su quiralidad (Rubinson & Rubinson, 2001).

#### **1.4.6.1. Cromatografía de gases (CG)**

Según (Alvarado, 2007), la cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. El gas portador debe ser un gas inerte para prevenir su reacción con el analítico o la columna. Por lo general se emplean gases como He, Ar, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, o CO<sub>2</sub>, y la elección del gas depende del tipo de detector empleado. El almacenaje del gas puede ser en tanques a presión o empleando un generador, especialmente en el caso del nitrógeno (N<sub>2</sub>) y del hidrogeno (H<sub>2</sub>).

El gas portador cumple dos propósitos:

- Transportar los componentes de la muestra.
- Crear una matriz adecuada para el detector.

Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestras como con la fase estacionaria).
- Fácilmente disponible y puro.
- Adecuado al detector a utilizar.

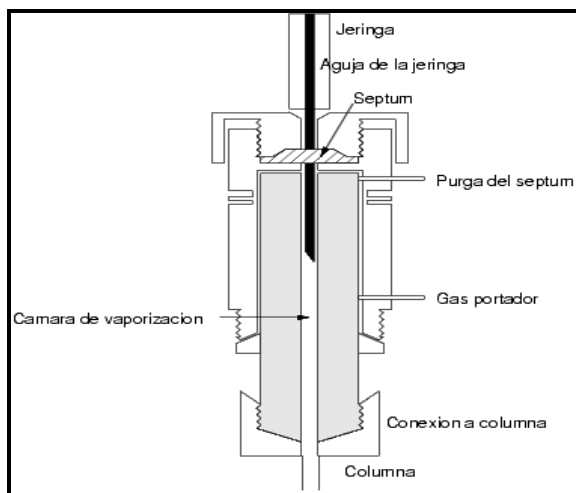
A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, pues su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los vectores del proceso de separación: la adsorción y la absorción. La adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial. Esta retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, de la temperatura, de la naturaleza y estado de subdivisión del adsorbente, y de la concentración. La absorción es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la



tendencia que tiene ésta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma (SHIMADZU, 2015).

La inyección de la muestra debe ser una cantidad adecuada, y debe introducirse rápidamente para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) como se indica en la figura 7, para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona septa o septum. También existe en el mercado los auto-inyectores, que son equipos que toman la cantidad adecuada de muestra automáticamente y la inyectan en la cámara de vaporización directamente (SHIMADZU, 2015).



**Figura 7. Método de inyección de la muestra en la cámara de vaporización**  
**Fuente: (Entrenamiento SHIMADZU)**

En CG, figura 8, se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes en la actualidad (2005) debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 60 m, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la

necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con longitudes de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno (SHIMADZU, 2015).

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición del analito o analitos, como también la máxima temperatura de funcionamiento de la columna (fase estacionaria), y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elución va a oscilar entre 2 y 30-40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar bien o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución ya que aunque a mayor temperatura la elución es más rápida, se corre el riesgo de descomponer el analito (SHIMADZU, 2015).

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. El **detector de ionización de llama** (FID), es el más usado y versátil. Básicamente es un quemador de hidrógeno/aire, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura. La mayoría de compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas pirolizan y se producen iones y electrones, que son conductores eléctricos (SHIMADZU, 2015).

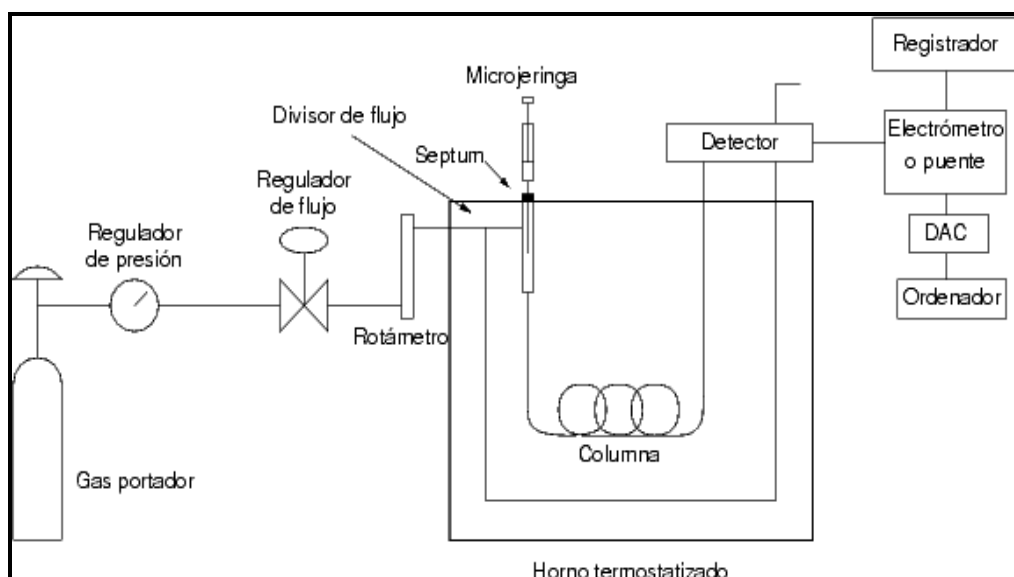
El montaje de una técnica analítica de CG es netamente empírica, el perfil de los analitos que se quiera determinar, la elección de la fase móvil, los tiempos de retención (elución) estarán dados exclusivamente por las condiciones particulares de la columna (fase estacionaria) frente al equipo.

Las rampas de temperatura a seleccionar bien pueden isotérmicas o escalonadas.

La elección del gas dependerá del tipo de detector, la elección de la columna (fase estacionaria) dependerá de la polaridad de los compuestos a separar, el detector dependerá del tipo de compuestos a detectar.

La estabilización de la línea base de la fase móvil en la fase estacionaria a través del tiempo es fundamental para establecer un método. Una línea de base (solvente) poco estable o irregular que cambia de intensidad frente al detector a medida que eluye debe ser afinada y estabilizada antes de introducir los analitos. El conocimiento de los parámetros, del rango de temperatura del horno, la adecuada elección de la columna y su fase estacionaria (tipo, largo y diámetro), la elección adecuada del tipo de detector, las temperaturas del detector e inyector, los volúmenes de analito, deberán ser establecidas de modo tal que se obtenga la mayor eficacia en separar los analitos, y con la mejor resolución posible. La pureza de la muestra dependerá de la preparación previa de la misma (SHIMADZU, 2015).

La CG es una metodología altamente efectiva y su performance permite una amplia gama de posibilidades para la química analítica en compuestos orgánicos. La sensibilidad de la técnica CG puede incluso detectar microgramos del analito si está bien montada. La cuantificación se basa en cálculos del área bajo la curva que es proporcional a la concentración del analito. Comúnmente se usa en *estándar interno* de trabajo.



**Figura 8. Esquema general de un cromatógrafo de gases**  
Fuente: (Entrenamiento SHIMADZU)

(Noriega & Samaniego, 2014), proponen que las condiciones para el análisis cromatográfico del aceite esencial extraído de las hojas de canela son: temperatura del inyector: 250 °C, columna capilar Factor four VF-5 ms (30 m x 0,25 mm), gas transportador: helio 1 mL/min, Split: 200 y condiciones de la columna tabla 1.

**Tabla 1**

**Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases para el análisis del aceite esencial de las hojas de canela.**

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Permanencia (min)	Total (min)
50	0	2	2
100	20	0	4,5
220	5	1,5	30

Fuente: (Noriega, 2014)

En dicho análisis, se detectaron 62 componentes de los cuales 30 fueron identificados. En base a los tiempos de retención obtenidos de cada uno de los compuestos, se obtuvo un tiempo de 12,059 min para el cinemaldehído;

14,564 min para el ácido cinámico; y 8,274 min para el hidroxicinemaldehido; compuestos mayoritarios del aceite esencial de la canela.

Rivera (2008), indica las condiciones cromatográficas con las que se trabajó en tres especies distintas de piperáceas: temperatura del inyector: 250 °C, temperatura del detector: 280 °C, columna capilar HP5 (30 m x 0,5  $\mu$ m) con las siguientes condiciones tabla 2.

**Tabla 2**

**Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases para el análisis del aceite esencial de tres especies de piperáceas.**

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Permanencia (min)	Total (min)
50	0	3	3
250	20	1	14

Fuente: (Rivera, 2008)

Se detectó espatulenol en *P. donnell smithii*, 1S,CIS-Calameneno en *P. peltatum* y  $\beta$ -elemeno en *P. diandrum*;  $\alpha$  -  $\beta$  pinenos se detectaron en dos de las tres especies de piperáceas, con un tiempo de retención de 9,71 min.

## **CAPÍTULO 2**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1. Participantes**

El presente proyecto fue financiado por fondos del laboratorio de química y bioquímica de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I) del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas - E.S.P.E, ubicados en la Hacienda “El Prado” – Sector San Fernando – Sangolquí. Así como, presupuesto correspondiente al programa de ayudas económicas para desarrollo de trabajo de titulación otorgado por el SENESCYT.

Las muestras de cortezas de canela fueron adquiridas en los mercados locales de la provincia de Pichincha, y las muestras de hojas de pinku fueron recolectadas en el sector de Chiguilpe, provincia de los Tsáchilas – Ecuador.

#### **2.2. Periodo de tiempo de la investigación**

La investigación tuvo una duración de alrededor de 10 meses.

#### **2.3. Diseño**

##### **2.3.1. Fase de extracción**

El tipo de diseño experimental empleado para el estudio de los componentes fitoquímicos mayoritarios de los macerados e hidrodestilados de canela y pinku, es un Diseño Completo al Azar (DCA), con dos factores (muestras vegetales) y 5 niveles (métodos de extracción).

Se utilizó este análisis estadístico debido a que su finalidad es comparar dos o más tratamientos y probar la hipótesis de igualdad de los tratamientos con respecto a la media de la correspondiente variable de respuesta. Solo utiliza dos fuentes de tratamiento: tratamientos y error aleatorio, por su

nombre *completamente al azar* en el cual las corridas experimentales se realizan en orden aleatorio, de manera que los posibles efectos ambientales y temporales se vayan repartiendo equitativamente entre los tratamiento (Gutiérrez & Vara, 2008).

Se trabajó con un total de 10 tratamientos, 30 unidades experimentales y 270 observaciones.

Se utilizaron 2 muestras vegetales (canela y pinku) y 5 métodos de extracción diferentes: macerado con hexano, macerado con metanol, macerado con etanol, macerado con agua e hidrodestilado.

En la tabla 3 se pueden observar los tratamientos con las diferentes combinaciones.

### **2.3.2. Cromatografía de gases**

Se realizó un análisis cualitativo al identificar los componentes de los hidrodestilados de cortezas de canela y hojas de pinku por medio de un cromatógrafo de gases, estas sustancias fueron extraídas utilizando el destilador por arrastre de vapor.

### **2.3.3. Variables de respuesta**

**Viabilidad:** observación de presencia o ausencia de metabolitos de interés.

Tabla 3

*Tratamientos con las diferentes combinaciones implementadas para la fase de extracción*

Canela	<b>Hidrodestilado</b>	<b>A1B1a</b>
		A1B1b
		A1B1c
	Macerado con agua	A2B1a
		A2B2b
		A2B2c
	Macerado con etanol	A3B1a
		A3B1b
		A3B1c
	Macerado con metanol	A4B1a
		A4B1b
		A4B1c
	Macerado con hexano	A5B1a
		A5B1b
		A5B1c
Pinku	Hidrodestilado	A1B2a
		A1B2b
		A1B2c
	Macerado con agua	A2B2a
		A2B2b
		A2B2c
	Macerado con etanol	A3B2a
		A3B2b
		A3B2c
	Macerado con metanol	A4B2a
		A4B2b
		A4B2c
	Macerado con hexano	A5B2a
		A5B2b
		A5B2c



## **2.4. Procedimiento**

### **2.4.1. Fase de Recolección**

#### **2.4.1.1. Recolección de la materia prima *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium***

Las cortezas de *Cinnamon canella* (canela) fueron adquiridas en los mercados locales, por su facilidad de acopio, en tanto que las hojas de pinku o matico tropical fueron colectadas en los senderos aledaños al río Baba, territorio Tsáchila con la colaboración de Agustín y Luis Calazacón nativos colorados propios de la comunidad quienes prestaron su contingente en la recolección de las muestras.

Las hojas de Pinku o matico tropical, fueron colectadas en el sector de Chiguilpe, Provincia de los Tsáchilas, a 140 km de Quito. El matico tropical es una planta considerada medicinal para los pobladores de la comunidad étnica de los Tsachilas y para ellos tiene varios usos etnobiológicos. Conocido como “pinku” en *idioma safiqui*, es una especie de muy poca distribución en Ecuador, son árboles delgados que suelen llegar hasta los 6 metros de altura (Calazacón, com. pers.).

La materia prima (hojas de pinku y cortezas de canela) fueron transportadas en gavetas plásticas hasta los laboratorios de Bioquímica y Toxicología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. , Sangolquí - Ecuador. Tanto la corteza de canela, así como las hojas del pinku, fueron colocadas en fundas de papel empaque perforadas, con dimensiones de 40 cm de ancho por 80 cm de largo, con 2 kg de capacidad. En el laboratorio, las hojas de pinku y las cortezas de canela fueron sometidas a un proceso de limpieza con el propósito de que se elimine o retire residuos de tierra, polvo, materiales extraños e impurezas que afecten la calidad de la muestra.

### **a) Tamaño de la muestra**

Antes del procesamiento de los extractos, las muestras colectadas fueron pesadas y seleccionadas. Se colectaron alrededor de 4 kg de cortezas de *Cinnamon canella* y hojas de *Piper angustifolium*, respectivamente, estas muestras fueron sometidas a una selección, limpieza y depuración, con el propósito optimizar el proceso. De la canela se seleccionaron las cortezas de un color más homogéneo, no tan leñosas, ni gruesas y con menor cantidad de residuos adheridos que pudieren perturbar la extracción. Del pinku o matico se seleccionaron las hojas casi de un mismo estado fenológico, de un color verde homogéneo, eliminando las hojas viejas, sin presencia de machas, tierra, polvo, ni artrópodos que modifiquen los ensayos, a las mismas se las sometió a un lavado suave con agua corriente y agua destilada, luego se dejó escurrir al ambiente.

### **b) Secado o deshidratación de la muestra**

Posteriormente a esta depuración, solamente a las hojas de *P. angustifolium*, se procedió a deshidratarlas en una estufa a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta que las mismas muestren un estado crocante y se haya eliminado la mayor cantidad de agua. Las cortezas de *C. canella* no requirieron de este procedimiento, por la propia naturaleza de su tejido. Secas y deshidratadas las muestras de hojas de pinku y cortezas de canela, se inició el proceso de molienda para la extracción por maceración y sin moler para la extracción mediante hidrodestilación.

## **2.4.2. Fase de Extracción**

### **2.4.2.1. Obtención de los macerados de canela y pinku**

En el presente proceso se empleó cuatro tipos de solventes orgánicos químicamente puros: Hexano (hex), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ). Luego de pulverizada las muestras de las hojas de pinku y cortezas de canela, se pesó 10 g y se depositó en un frasco de color ámbar para evitar la incidencia de la luz, con capacidad para 300 mL, enseguida de ello se añadió 120 mL del solvente orgánico. Éste método se realizó por

cada solvente en diferentes frascos. Posteriormente cada uno de los frascos fueron sometidos a agitación orbital durante 1 h a 180 rpm, terminado este paso, los frascos fueron guardados durante 8 días en refrigeración a 4 °C en la parte baja del refrigerador.

Para el caso de la maceración con agua destilada, esta fue hervida con antelación y añadida al frasco con los 10 gramos de la muestra, luego depositada en el refrigerador para su maceración durante 8 días al igual que las demás muestras.

#### **2.4.2.2. Obtención de los hidrodestilados de canela y pinku**

Para éste proceso se armó el aparato de destilación por arrastre de vapor, utilizando un tanque de 12 L de capacidad, al cual se le añadieron 2000 mL de agua corriente, se montó el equipo, se ajustaron los acoples, se insertó la rejilla, se añadió los 100 g de la muestra de canela troceada y se ajustaron las tapas herméticas y demás ensambles dirigidos al refrigerante vertical, enseguida de ello se procedió a encender la fuente de calor y se inició el proceso.

El agua al hervir se evapora y éste vapor atraviesa la rejilla donde se encuentra la muestra de canela depositada, se inspeccionó el agua fría del refrigerante y al cabo de 30 min se registraron las primeras gotas del hidrodestilado, el vapor emitido permite arrastrar los metabolitos secundarios contenidos en los 100 g de canela, éste vapor arrastrado se condensa por enfriamiento en el refrigerante, llevando consigo el hidrodestilado que es depositado en un Erlenmeyer. El proceso duró cerca de 55 min y el rendimiento obtenido aproximadamente fue de 250 mL de hidrodestilado. Durante el tiempo transcurrido el hidrodestilado mostró las características descritas en el cuadro 2, éste fue trasvasado a una botella color ámbar y se lo almacenó a 4 °C en la parte baja del refrigerador, hasta sus posteriores pruebas de tamizaje fitoquímico preliminares.

Cuadro 2

*Estimación visual y organoléptica del hidrodestilado de canela*

Hidrodestilado	Tiempo transcurrido	Color	Olor	Sabor
<b>Canela</b>	30 min	Líquido blanco lechoso +++	Aromático Penetrante +++	Dulce mordiscante picante +++
<b>Canela</b>	55 min	Líquido blanco opalino ++	Aromático ligeramente penetrante ++	Dulce Mordiscante ++

Para la destilación de pinku, se realizó el mismo proceso detallado en la extracción de canela, con las mismas condiciones, es decir armado previamente el equipo de destilación, de igual manera se pesó 100 g de las hojas previamente secas y troceadas de pinku, se añadieron al tanque de destilación y se sometió a la fuente de calor, pasado 30 min, el agua hervida genera su vapor que atraviesa las muestras de las hojas y se condensa en el refrigerante vertical. Se recogió 250 mL del hidrodestilado en un Erlenmeyer al cabo de aproximadamente 60 min. Durante el tiempo transcurrido el hidrodestilado mostró las características descritas en el cuadro 3, éste fue trasvasado a una botella color ámbar y se lo almacenó a 4 °C en la parte baja del refrigerador, hasta sus posteriores pruebas de tamizaje fitoquímico preliminares.

Cuadro 3

*Estimación visual y organoléptica del hidrodestilado de pinku*

Hidrodestilado	Tiempo transcurrido	Color	Olor	Sabor
<b>Pinku</b>	30 min	Líquido verde claro	Penetrante adormecedor +++	Suigéneris a condimento +++
<b>Pinku</b>	60 min	Líquido límpido	Penetrante ligeramente adormecedor ++	A condimento +

### 2.4.3. Tamizaje fitoquímico

#### 2.4.3.1. *Preparación de las muestras para el tamizaje fitoquímico*

##### *a). Para las muestras maceradas de canela y pinku*

Al ejecutarse el tamizaje fitoquímico de los extractos de canela y pinku, se inició con las muestras inmersas en hexano, ya que el mismo, no requiere de mayor tiempo de maceración, luego se procedió al análisis de las muestras maceradas tanto en MeOH como en EtOH y posteriormente aquellas efectuadas en agua.

A las muestras vegetales maceradas de canela y pinku se las filtró por 2 capas de algodón a presión reducida y por papel filtro #45. Se recuperó 100 ml de cada extracto y se los rota evaporó en baño maría a una temperatura entre 40 °C a 45 °C y a una rotación de 45 ppm, recuperando el solvente orgánico y obteniendo la tintura de los extractos madre; terminado el proceso, estos estuvieron listos para las respectivas diluciones y su tamizaje fitoquímico.

A continuación se detallan las diluciones realizadas para cada uno de los extractos tanto de canela como de pinku, en sus cuatro solventes orgánicos tabla 4.

**Tabla 4**

***Diluciones preparadas para cada uno de los extractos de canela y pinku, previos al tamizaje fitoquímico.***

Extracto	Dilución
<b>Canela en hexano</b>	-
<b>Canela en metanol</b>	1:10
<b>Canela en etanol</b>	1:10
<b>Pinku en hexano</b>	1:100
<b>Pinku en metanol</b>	1:100
<b>Pinku en etanol</b>	1:10
<b>Pinku en agua</b>	1:10

**b). Para las muestras hidrodestiladas de canela y pinku**

Las muestras hidrodestiladas de canela y pinku no requirieron filtraciones ni rota evaporación, ya que la naturaleza de los extractos es transparente y permitió realizar los análisis de manera límpida.

**c). Reporte de resultados del tamizaje fitoquímico preliminar**

Para reportar los resultados de las pruebas del tamizaje fitoquímico, se consideró las especificaciones registradas en el cuadro 4.

**Cuadro 4**

**Significación considerada para reportar los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico.**

Significación	Especificación	Comentario
( - )	No registrado	No hay cambio de coloración de la alícuota
( +/- )	Escasa presencia	Escaso cambio de coloración de la alícuota
( + )	Ligera presencia	Ligero cambio de coloración de la alícuota
( ++ )	Presencia moderada	Notable cambio de coloración de la alícuota
( +++ )	Presencia estable	Prolongado cambio de coloración de la alícuota
( ++++ )	Presencia abundante	Pronunciado y eminente cambio de coloración de la alícuota

**2.4.3.2. Análisis fitoquímico**

**a). Protocolo para reconocimiento de alcaloides**

De las muestras maceradas e hidrodestiladas de canela y pinku, se tomó 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 de canela y pinku 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 de canela y pinku 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 de canela y pinku se adicionó 3 gotas del reactivo. Éste formó un precipitado de color que va del amarillo al anaranjado, lo cual indicó una prueba positiva.

#### ***b). Protocolo para reconocimiento de taninos y fenoles***

##### ***Ensayo del cloruro férrico***

Mediante éste procedimiento se permitió reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en las muestras maceradas e hidrodestiladas de canela y pinku, 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 canela, los cuales desarrollaron una coloración azul intensa, indicando la presencia de taninos del tipo pirogalotánicos. El mismo ensayo efectuado en alícuotas de pinku, macerado como hidrodestilado, dio negativo, no registrándose reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

#### ***c). Protocolo para reconocimiento de saponinas***

##### ***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 de canela y pinku, 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.

#### ***d). Protocolo para reconocimiento de cumarinas***

De las muestras maceradas e hidrodestiladas de canela y pinku, 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 de canela y pinku, al acidularlos con el HCl 1N. El ensayo dio negativo al no registrarse la reacción colorimétrica esperada para este tipo de compuestos activos.

#### ***e). Protocolo para reconocimiento de flavonoides***

##### ***Ensayo de shinoda***

De las muestras maceradas e hidrodestiladas de canela y pinku, 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 estabilice 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 coloreo 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.

#### ***f). Ensayo de antocianinas***

Éste protocolo permitió conocer antocianinas generales en los extractos vegetales macerados e hidrodestilados de canela y pinku, 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.

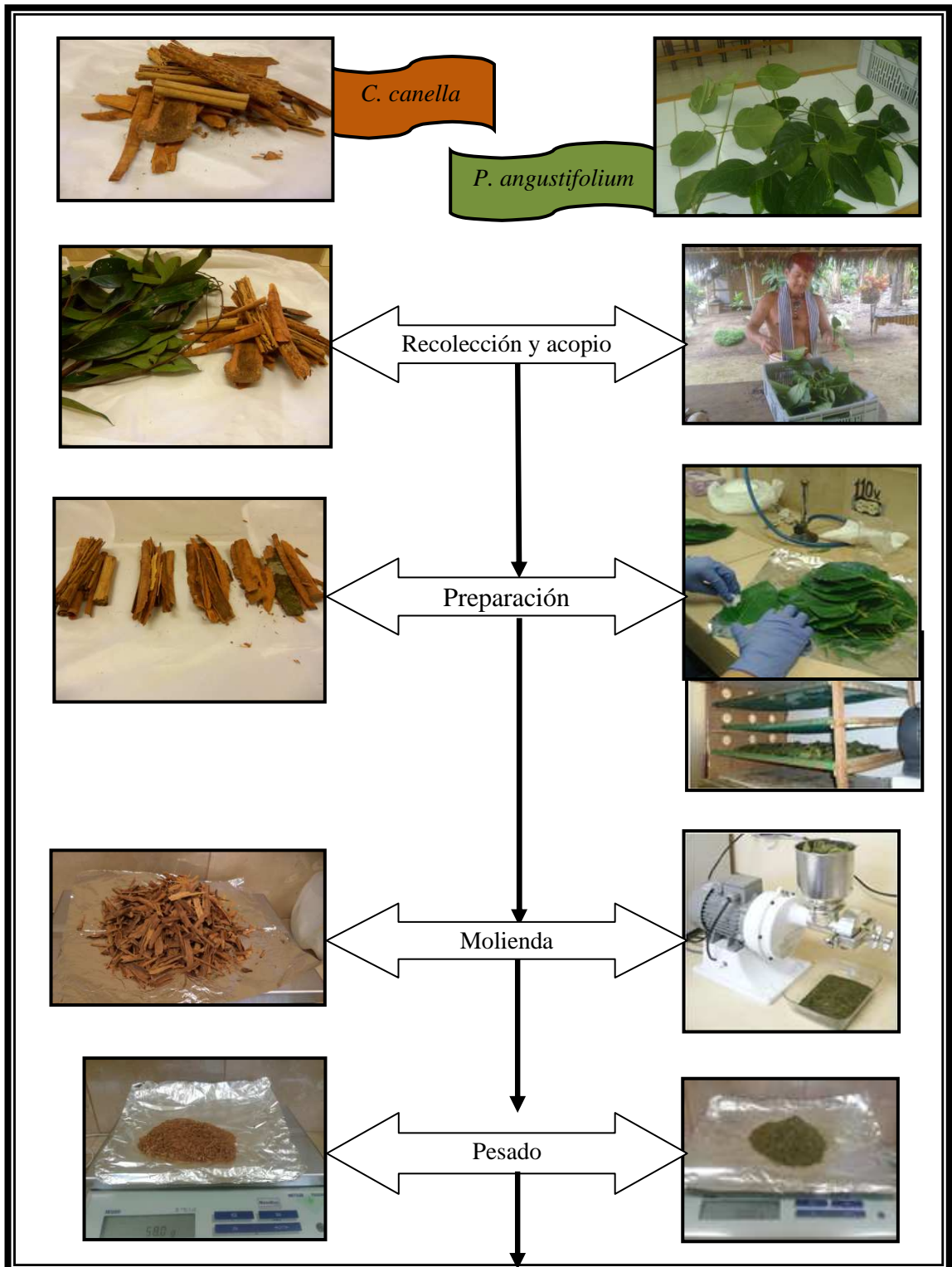
#### ***g). Protocolo para reconocimiento de quinonas***

##### ***Ensayo de börntrager***

De las muestras maceradas en Hxn, MtOH y EtOH de canela y pinku, 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 redisolvió 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 en agua y para los hidrodestilados de canela y pinku, 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.



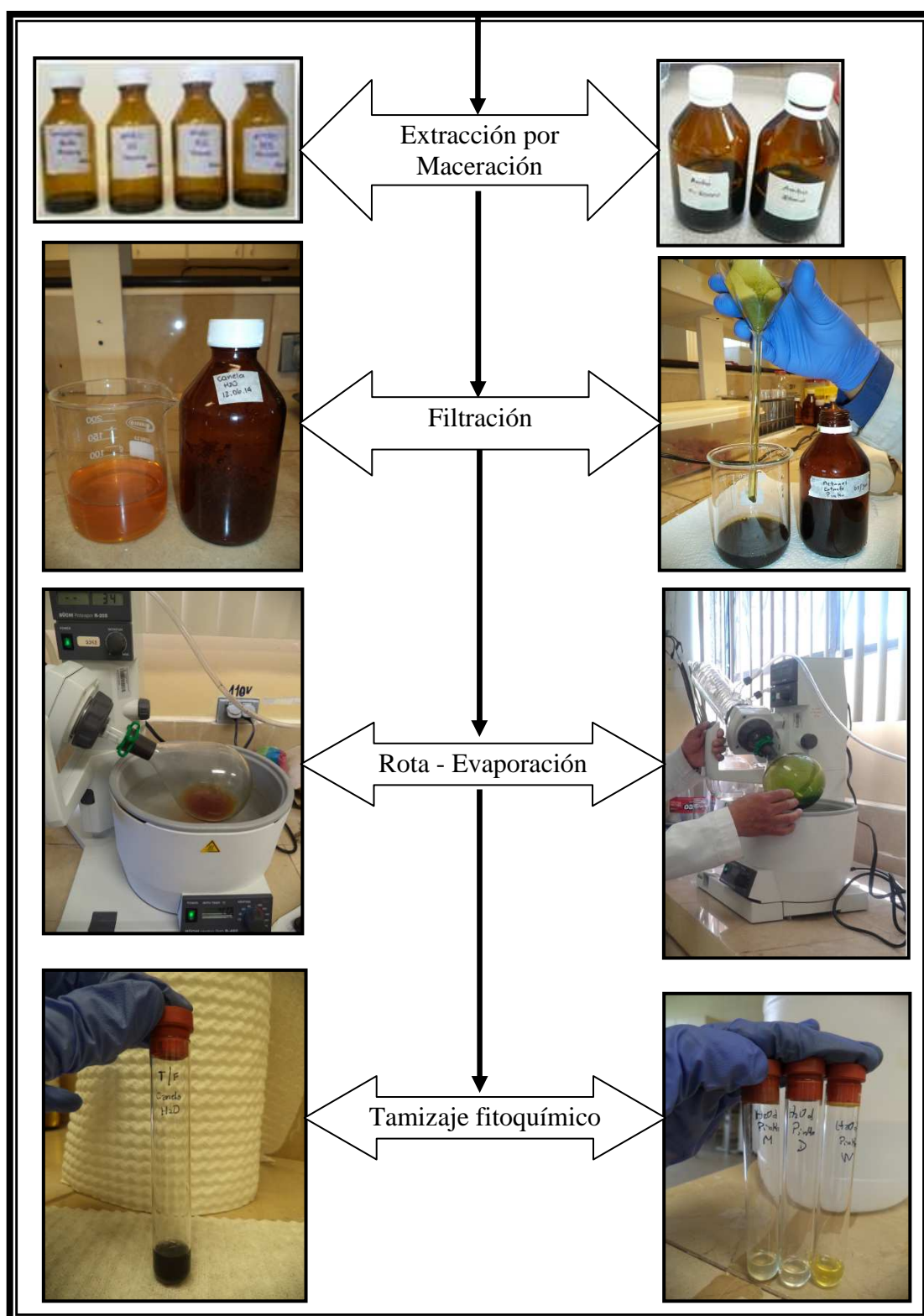


Figura 9. Esquema del procedimiento para el registro de metabolitos secundarios en los macerados de *C. canella* y *P. angustifolium*.

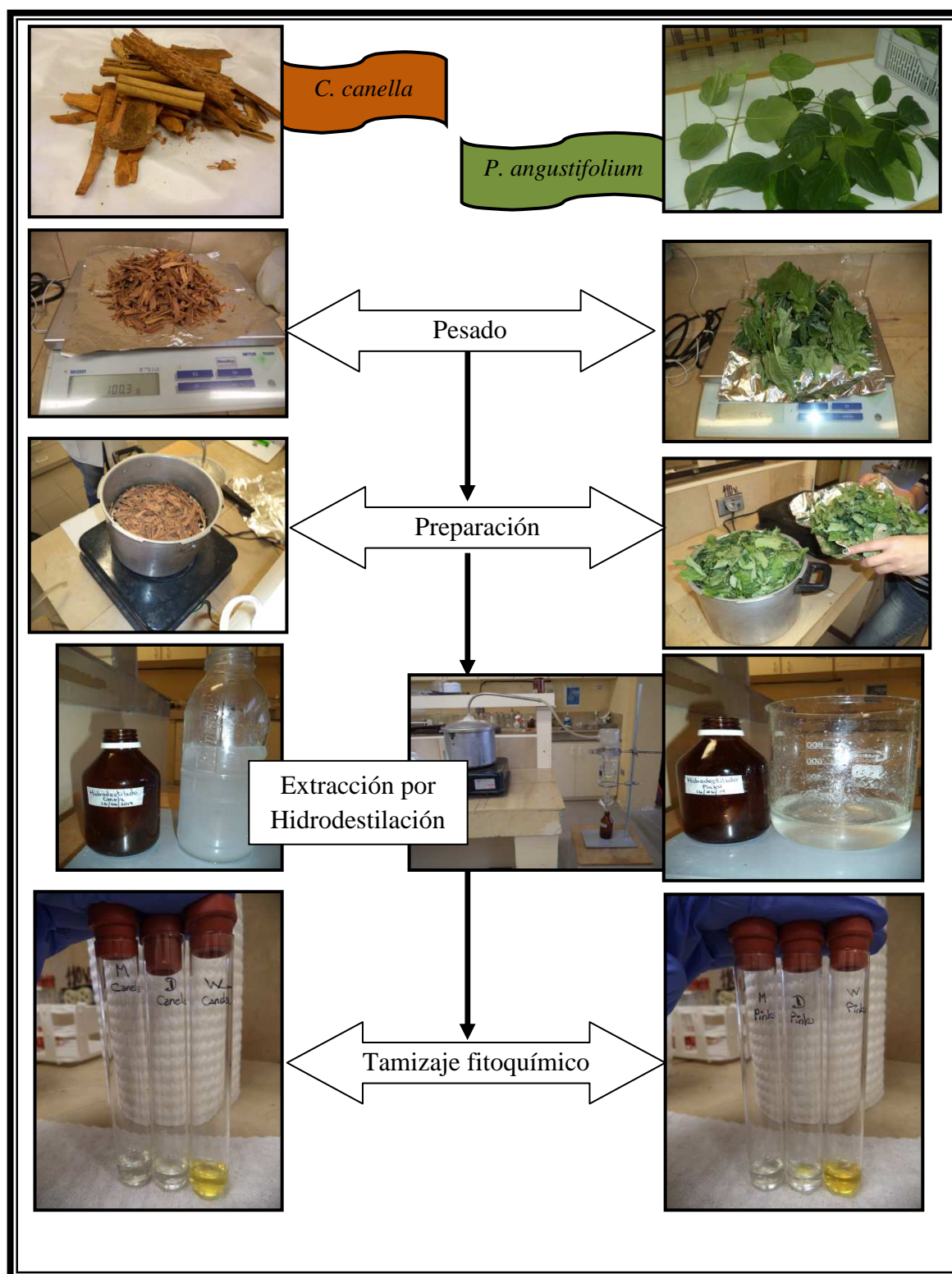


Figura 10. Esquema del procedimiento para el registro de metabolitos secundarios en los hidrodestilados de *C. canella* y *P. angustifolium*.

#### **2.4.4. Cromatografía de gases CG**

Los análisis cromatográficos complementarios se realizaron en muestras hidrodestiladas de las cortezas de canela y de las hojas de pinku, de las cuales se tomó alícuotas de 2  $\mu\text{L}$ , que se inyectaron en un equipo de cromatografía a través de su autoinyector (Shimadzu) AOC-20i a un cromatógrafo de gases (Shimadzu, GC-2014) con detector de ionización de flama (FID). El CG está provisto de una columna capilar SH RXI-5MS de 15 m de largo y 0,25 mm de espesor, cuyo gas portador fue el helio y el flujo de 85,6 mL min<sup>-1</sup>. La rampa calibrada para la separación de los compuestos del hidrodestilado de canela fue:

- La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C.
- La temperatura del detector fue de 330 °C.

Para el caso del pinku, la rampa de temperatura utilizada para la separación fue la siguiente:

- La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C.
- La temperatura del detector fue de 280 °C.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1. Identificación mediante tamizaje fitoquímico

##### 3.1.1. Tamizaje fitoquímico del extracto de canela en hex

El cuadro 5 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de canela utilizando como solvente hex. Con el reactivo de *Wagner* se evidenció alcaloides, mediante la prueba de espuma se evidenció escasa presencia de saponinas, también se registró una presencia estable de cumarinas, al igual que en el reconocimiento de flavonoides y antocianinas fue positivo, abundante para flavonoides y estable para antocianinas.

Cuadro 5

*Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en hex.*

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Amarillo	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Anaranjado	(-) = 0	No registrado.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Anaranjado verdoso	(++) = 3	Presencia moderada.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<b>Cumarinas</b>	Verde pálido	(++) = 3	Presencia moderada.
<b>Flavonoides</b>	Amarillo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Antocianinas</b>	Marrón	(++) = 3	Presencia moderada.
<b>Quinonas</b>	Blanquecino	(-) = 0	No registrado.

### 3.1.2. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en MeOH

El cuadro 6 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de canela utilizando como solvente MeOH. Las pruebas de *Mayer*, *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, mediante la prueba del cloruro férrico se registró taninos del tipo pirogalotánicos, mientras que la prueba de espuma evidenció leve presencia de saponinas, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas indicando una presencia abundante, también se registró quinonas.

**Cuadro 6**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en MeOH.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Crema	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<i>Dragendorff</i>	Crema	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Azul intenso	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(+)= 2	Ligera presencia.
<b>Cumarinas</b>	Amarillo pálido	(-)= 0	No registrado.
<b>Flavonoides</b>	Rojo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Antocianinas</b>	Rojo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Quinonas</b>	Rosado	(++++)= 5	Presencia abundante.



### 3.1.3. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en EtOH

El cuadro 7 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de canela utilizando como solvente EtOH. Las pruebas de *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, mediante la prueba del cloruro férrico se registró taninos del tipo pirogalotánicos, mientras que la prueba de la espuma evidenció una presencia abundante de saponinas, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas indicando una presencia abundante, también se registró quinonas.

**Cuadro 7**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en EtOH.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Anaranjado	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Azul intenso	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Cumarinas</b>	Amarillo pálido	(-) = 0	No registrado.
<b>Flavonoides</b>	Amarillo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Antocianinas</b>	Rojo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Quinonas</b>	Rosado	(++++)= 5	Presencia abundante.

### 3.1.4. Tamizaje fitoquímico extracto de canela en H<sub>2</sub>O

El cuadro 8 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de canela utilizando como solvente H<sub>2</sub>O. Las pruebas de *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, la prueba del cloruro férrico registró taninos del tipo pirogalotánicos, mientras que la presencia de cumarinas fue estable, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas, indicando una presencia abundante, también se registró quinonas.

**Cuadro 8**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de canela en H<sub>2</sub>O.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Anaranjado	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Azul intenso	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b>Cumarinas</b>	Anaranjado	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Flavonoides</b>	Amarillo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Antocianinas</b>	Rojo	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Quinonas</b>	Rosado	(+++)= 4	Presencia estable.

### 3.1.5. Tamizaje fitoquímico hidrodestilado de canela

El cuadro 9 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el hidrodestilado de canela. La prueba de *Wagner* evidenció la presencia de alcaloides.

**Cuadro 9**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del hidrodestilado de canela.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>			
<b>Saponinas</b>	Anaranjado	(-) = 0	No registrado.
<b>Cumarinas</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b>Flavonoides</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b>Antocianinas</b>	-	-	No se realizó la prueba, debido a que no se registró flavonoides.
<b>Quinonas</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.

### 3.1.6. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en hex

El cuadro 10 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de pinku utilizando como solvente hex. Las pruebas de *Mayer*, *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, también se registró una leve presencia de cumarinas, el *ensayo de Börntrager* indicó escasa presencia de quinonas.

**Cuadro 10**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en hex.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Dragendorff</i>	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Amarillo	(-)= 0	No registrado.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(-)= 0	No registrado.
<b>Cumarinas</b>	Amarillo	(+)= 2	Ligera presencia.
<b>Flavonoides</b>	Verde	(-)= 0	No registrado.
<b>Antocianinas</b>	-	-	No se realizó la prueba, debido a que no se registró flavonoides.
<b>Quinonas</b>	Carmelita	(+/-)= 1	Escasa presencia.

### 3.1.7. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en MeOH

El cuadro 11 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de pinku utilizando como solvente MeOH. Las pruebas de *Mayer*, *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, la prueba de la espuma indicó la presencia estable de saponinas, también se registró una leve presencia de cumarinas, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas indicando una presencia escasa, al igual que el *ensayo de Börntrager* en el reconocimiento de quinonas.

**Cuadro 11**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en MeOH.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Dragendorff</i>	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Anaranjado amarillento	(-)= 0	No registrado.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(++)= 3	Presencia moderada.
<b>Cumarinas</b>	Amarillo	(+)= 2	Ligera presencia.
<b>Flavonoides</b>	Verde amarillento	(+/-)= 1	Escasa presencia.
<b>Antocianinas</b>	Verde amarillento	(+/-)= 1	Escasa presencia.
<b>Quinonas</b>	Carmelita	(+/-)= 1	Escasa presencia.

### 3.1.8. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en EtOH

El cuadro 12 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de pinku utilizando como solvente EtOH. Las pruebas de *Dragendorff* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, la prueba de la espuma indicó la presencia escasa de saponinas, también se registró una presencia estable de cumarinas, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas, moderada para flavonoides y escasa para antocianinas.

**Cuadro 12**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en EtOH.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>			
	Anaranjado amarillento	(-) = 0	No registrado.
<b>Saponinas</b>			
	Incoloro	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<b>Cumarinas</b>			
	Crema	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Flavonoides</b>			
	Amarillo pálido	(++) = 3	Presencia moderada.
<b>Antocianinas</b>			
	Amarillo pálido	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<b>Quinonas</b>			
	Verde	(-) = 0	No registrado.

### 3.1.9. Tamizaje fitoquímico extracto de pinku en H<sub>2</sub>O

El cuadro 13 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el extracto de pinku utilizando como solvente H<sub>2</sub>O. Las pruebas de *Mayer* y *Wagner* evidenciaron la presencia de alcaloides, la prueba de la espuma indicó ligera presencia de saponinas, también se registró una presencia abundante de cumarinas, las pruebas para reconocimiento de flavonoides y antocianinas fueron positivas, moderada para flavonoides y escasa para antocianinas.

**Cuadro 13**

**Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de pinku en MeOH.**

<b>Prueba</b>	<b>Color</b>	<b>Presencia</b>	<b>Característica de la prueba</b>
<b>Alcaloides</b>			
<b><i>Mayer</i></b>	Crema	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<b><i>Dragendorff</i></b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b><i>Wagner</i></b>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>	Amarillo verdoso	(-) = 0	No registrado.
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(+) = 2	Ligera presencia.
<b>Cumarinas</b>	Anaranjado	(++++)= 5	Presencia abundante.
<b>Flavonoides</b>	Amarillo pálido	(++) = 3	Presencia moderada.
<b>Antocianinas</b>	Amarillo pálido	(+/-) = 1	Escasa presencia.
<b>Quinonas</b>	Blanquecino	(-) = 0	No registrado.

### 3.1.10. Tamizaje fitoquímico en el hidrodestilado de pinku

El cuadro 14 muestra la apreciación cualitativa de los metabolitos en el hidrodestilado de pinku. La prueba de *Wagner* evidenció la presencia de alcaloides, mientras que la prueba de la espuma indicó ligera presencia de saponinas.

**Cuadro 14**

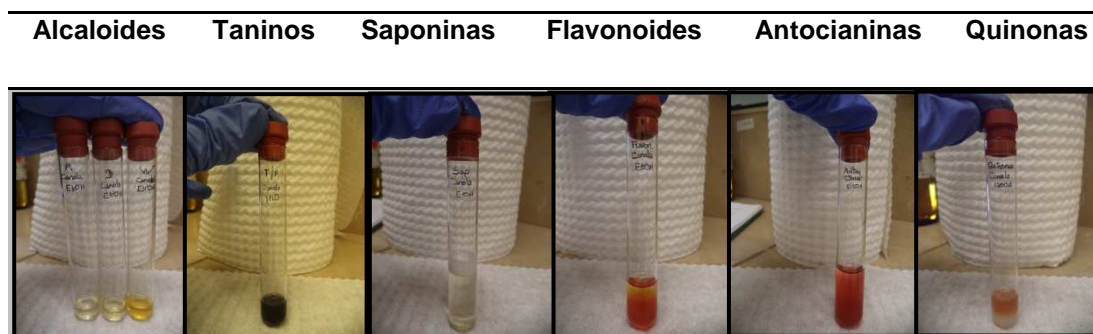
**Resultados del tamizaje fitoquímico del hidrodestilado de pinku.**

Prueba	Color	Presencia	Característica de la prueba
<b>Alcaloides</b>			
<i>Mayer</i>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<i>Dragendorff</i>	Incoloro	(+++)= 4	Presencia estable.
<i>Wagner</i>	Anaranjado amarillento	(+++)= 4	Presencia estable.
<b>Taninos y fenoles</b>			
<b>Saponinas</b>	Incoloro	(+) = 2	Ligera presencia.
<b>Cumarinas</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b>Flavonoides</b>	Incoloro	(-) = 0	No registrado.
<b>Antocianinas</b>	-	-	No se realizó la prueba, debido a que no se registró flavonoides.
<b>Quinonas</b>	Blanquecino	(-) = 0	No registrado.

### 3.2. Resultados de identificación de metabolitos secundarios en *C. canella*

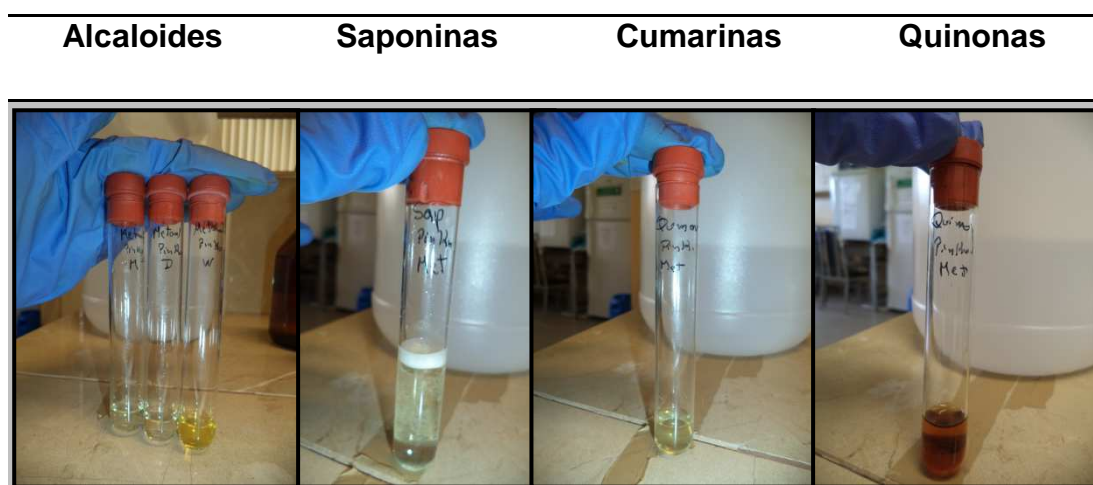
Se registraron mayor cantidad de metabolitos secundarios en el extracto de *C. Canella* macerado en EtOH, y se muestran a continuación:





### 3.3. Resultados de identificación de metabolitos secundarios en *P. angustifolium*

Se registraron mayor cantidad de metabolitos secundarios en el extracto de *P. Angustifolium* macerado en MeOH, y se muestran a continuación:



Los metabolitos secundarios identificados en las muestras de canela y pinku, registrados en las tabla 5, que refleja el tamizaje fitoquímico efectuado. Estos datos no cumplieron con el supuesto de normalidad, por lo tanto; se realizó la prueba de Kruskal-Wallis como alternativa no paramétrica del método ANOVA, ésta se aplicó a la presencia o ausencia de metabolitos secundarios mayoritarios evaluados cualitativamente.

Tabla 5

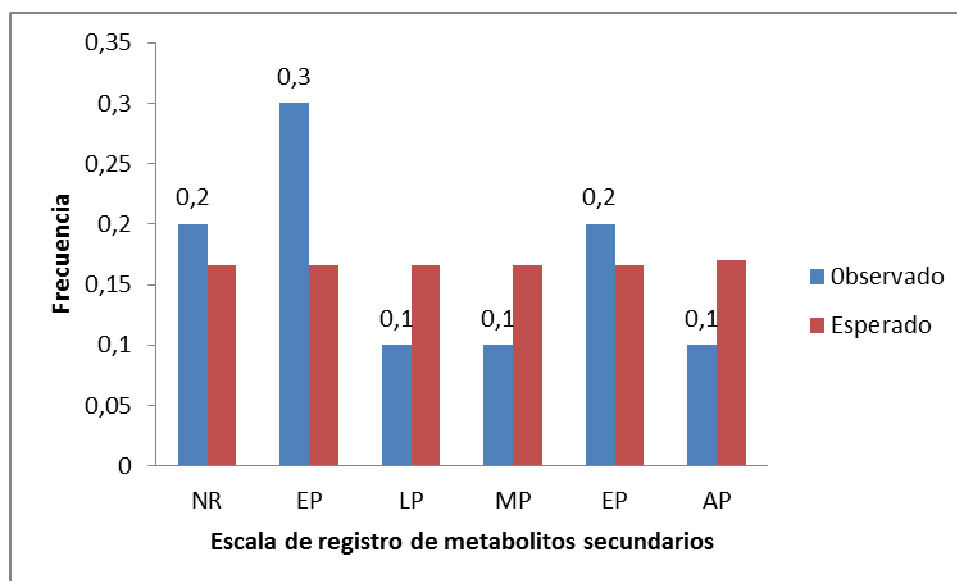
***Método de extracción, desviación estándar y medianas correspondientes al análisis de metabolitos secundarios en extractos de canela y pinku.***

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	D.E.	Medianas
c-EtOH	2.12	5.00
c-H <sub>2</sub> O	2.01	4.00
c-hidrodestilado	1.33	0.00
c-hex	1.90	3.00
c-MeOH	2.24	4.00
p-EtOH	1.83	1.00
p-H <sub>2</sub> O	1.86	1.00
p-hidrodestilado	1.76	0.00
p-hex	1.87	1.00
p-MtOH	1.56	2.00

Los metabolitos secundarios tienen una presencia diferentemente significativa, según el método de extracción; por lo que se registra medias y medianas diferentemente significativas ( $H= 20,39$ ;  $p= 0,009$ ).

El extracto de canela macerado en EtOH presentó abundantes metabolitos secundarios (Mediana = 5.00), seguido del extracto de canela macerado en H<sub>2</sub>O y del extracto de canela macerado en MeOH con una presencia moderada de metabolitos secundarios (Medianas = 4.00). Por otro lado no se registró metabolitos secundarios en el hidrodestilado de canela y en el hidrodestilado de pinku (Medianas = 0.00), así como también hubo una escasa presencia de metabolitos en el extracto de pinku macerado en EtOH, en el extracto de pinku macerado en H<sub>2</sub>O y en el extracto de pinku macerado en hex (Medianas = 1.00).

Los diferentes métodos de extracción utilizados para el tamizaje fitoquímico presentaron una distribución observada similar a la distribución esperada de la escala de registro utilizada en el presente estudio, ( $G_{\text{homogeneidad}}= 5,62$ ;  $p= 0,35$ ); figura 11.



**Figura 11. G. de homogeneidad de la escala de registro estable observada vs. Esperada.**

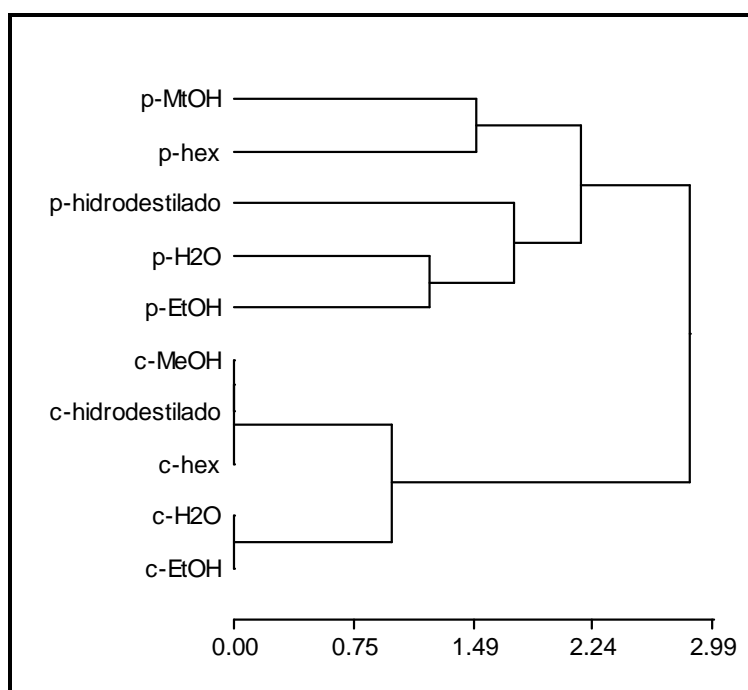
La figura 12 muestra un dendograma correspondiente a la cantidad de metabolitos secundarios similares obtenidos por cada método de extracción, en donde se registra dos grupos heterogéneos: macerados e hidrodestilado de pinku y macerados e hidrodestilado de canela, basándose en una distancia de similitud euclidiana. Así queda reflejada la formación de los conglomerados y las distancias entre ellos.

La observación más distante al resto de los métodos de extracción de metabolitos secundarios es el hidrodestilado de pinku, ya que es la última (mayor distancia) en incorporarse al cluster final. Por el contrario, la observación más cercana entre sí es el grupo del macerado de canela en hex – macerado de canela en H<sub>2</sub>O – macerado de canela en EtOH, que forman el primer grupo (distancia igual a cero).

El dendograma también nos indica la composición de cada cluster en cada paso, si se quisiera hacer una división en seis conglomerados se comprobaría que las observaciones de macerado de pinku en MeOH, macerado de pinku en hex, hidrodestilado de pinku, macerado de pinku en

H<sub>2</sub>O, macerado de pinku en EtOH, quedarían aisladas formando cada una de ellas un cluster de tamaño 1 y el resto de observaciones formarían otro grupo.

También se registró una relación cofenética de 0.81, lo que indica que la ejecución del tamizaje fitoquímico en los extractos e hidrodestilados de *C. canella* y *Piper angustifolium*, fue realizado correctamente y se obtuvo resultados positivos y fehacientes.



**Figura 12. Dendrograma correspondiente a la cantidad de metabolitos secundarios obtenidos según el método de extracción.**

### 3.4. Cromatografía de gases CG

En el análisis cromatográfico complementario realizado en el hidrodestilado de la corteza de canela, se identificó un pico alto, que de acuerdo a tiempos de retención establecidos correspondería a aldehído cinámico, el cual se registró en un tiempo de alrededor de 8,335 minutos y un área bajo la curva de 732509. El cromatograma del aldehído cinámico se muestra en la figura 13.

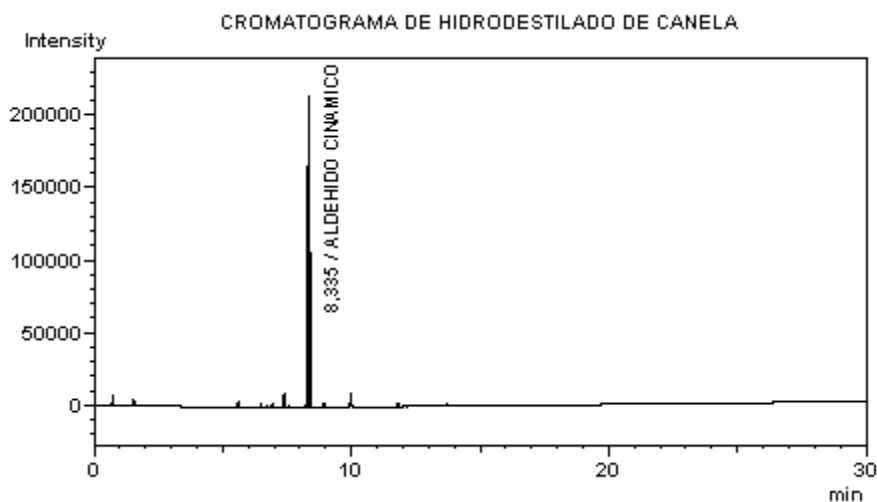


Figura 13. Cromatograma de hidrodestilado de la corteza de *Cinnamomum canella*.

En el análisis efectuado al hidrodestilado de las hojas de pinku, se registró principalmente picos que corresponden a  $\alpha$ - $\beta$  pinenos con un tiempo de retención estimado de 7,660 minutos y un área bajo la curva de 603337. El cromatograma del  $\alpha$ - $\beta$  pinenos se muestra en la figura 14.

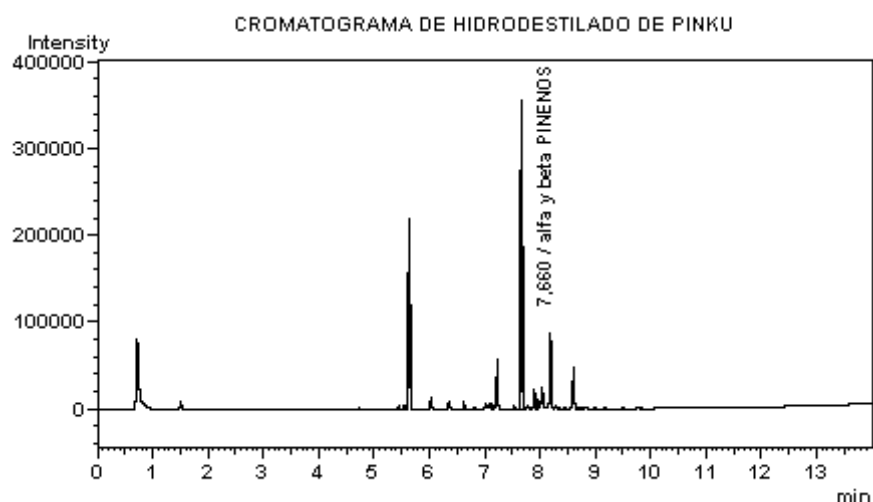


Figura 14. Cromatograma de hidrodestilado de hojas de *Piper angustifolium*.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

De acuerdo a Ávila (2001), el aislamiento de sustancias naturales de origen vegetal o de mezclas resinosas obtenidas por síntesis, emplea un método de extracción continua sólido-líquido, en donde se obtiene una muestra vegetal junto con otros componentes, los cuales deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado. En la presente investigación se aplicó dicho método, macerando muestras vegetales de canela y pinku en solventes: hex, MeOH, EtOH y H<sub>2</sub>O; a 8 °C por 7 días; lo cual se ratifica con los protocolos enunciados por Della, *et al*, (2009), quien sugiere agitación frecuente, filtración específica y protección a la luz, lo cual mejorará el registro de obtención de los metabolitos secundarios. Según Fessenden (1993), enuncia que la extracción con el hexano es ideal por su baja solubilidad, alta capacidad de solvatación y bajo punto de ebullición en referencia al solvente, lo que se corrobora en el presente estudio, en donde los extractos de canela o pinku tratados con hexano, mejoraron notablemente la obtención previo a un tamizaje fitoquímico.

En lo referente al hidrodestilado, Bruneton (2001), indica que una muestra vegetal a ser extraída, debe estar en contacto íntimo con el agua generadora de vapor saturado, lo cual tiende a volatilizar en conjunto con los aceites que suelen encontrarse en las cavidades lisígenas y esquizógenas de las semillas, hojas, flores, frutos y partes no fibrosas. La hidrodestilación efectuada en la canela y pinku, en donde, las cortezas de canela previamente trozadas fueron sometidas al vapor del tanque de destilación, arrastró una esencia característica con propiedades diversas (ver Cuadro 2); de similar manera ocurrió con las hojas de pinku (ver Cuadro 3), cuyo protocolo coincide con los expuesto por Guerra & Panduro (2013), que indican que los aceites esenciales están formados por varias sustancias orgánicas volátiles y extraíbles mediante destilación por arrastre de vapor.

Según Guerra & Panduro (2013), la volatilidad de los compuestos que se pueden extraer, se encuentran respectivamente: los alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, y fenoles; que se producen y almacenan en los canales lisígenos y esquizogénicos secretores de las plantas; dichos compuestos denominados metabolitos secundarios se pueden revelar mediante tamizaje fitoquímico. Swain (2003), indica que el tamizaje fitoquímico es la etapa inicial de investigación para determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, utilizando solventes apropiados y reacciones de coloración. A lo que la presente investigación se acopla, utilizando distintas pruebas de identificación para determinar alcaloides, taninos, fenoles y otros constituyentes químicos.

Flores (2006), identifica a varios metabolitos principales de la canela tales como: aldehídos cinámicos, alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, cumarinas, flavonoides, entre otros; lo que se confirma con el tamizaje fitoquímico realizado en la presente investigación en donde el macerado de canela en EtOH, registró mayor porcentaje de metabolitos secundarios, en lo referente a presencia de alcaloides, fenoles y otros. De similar manera Alonso en el 2004, obtiene taninos de carácter astringente, que actúan precipitando proteínas superficiales en células, lo que impide proliferación de toxinas fúngicas, de igual manera los metabolitos secundarios consignados en éste documento, obtenidos de los macerados e hidrodestilados de canela fueron probados en vitro y en campo frente a fungopatógenos frecuentes en flores tropicales limitando su proliferación.

En estudios desarrollados por Cruz (2009), se reportan varios componentes fitoquímicos en el género *Piper*, entre los que se describen: taninos, alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas, fenoles, entre otros. De similar manera algunos de estos compuestos se obtuvieron experimentalmente en la presente investigación, mediante un tamizaje fitoquímico a *P. anfastifolium* macerado en MeOH, cuyos análisis revelaron:

quinonas, alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides y antocianinas siguiendo métodos semejantes.

Según Rivera (2008), las pruebas cualitativas (precipitación, coloración, test de espuma y otros), realizadas en algunas muestras del género *Piper* son las más reveladoras para indicar compuestos fitoquímicos. Los protocolos ejecutados en este experimento, se basaron en una marcha fitoquímica y fueron semejantes en cuanto a cambios de coloración, precipitación y efervescencia en varios ensayos con diferentes reactivos de identificación, lo que corrobora la marcha efectuada a *P. angustifolium* con los solventes empleados.

Según Castaño, (2012). En los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios registrados experimentalmente por CG-EM en los aceites esenciales de canela y clavo se reportaron componentes mayoritarios de eugenol y al cinemaldehído para el aceite esencial de canela, lo que coincide con los estudios realizados en el presente documento, mediante cromatografía de gases, en el cual se registró picos, siendo el más prominente el de cinemaldehído. Ello también concuerda con Noriega & Samaniego (2014), que aducen la detección del cinemaldehído a un tiempo de retención estimado de 8,274 min, parámetro similar al obtenido en los análisis cromatográficos complementarios realizados en el hidrodestilado de las cortezas de la canela.

Por otro lado, los análisis cromatográficos realizados por Rivera (2008), en tres especies de Piperaceas, en las cuales identificó alfa y beta pinenos presentes como metabolitos secundarios, lo que corrobora con la cromatografía efectuada a el hidrodestilado de pinku, en donde se registró picos similares, a los  $\beta$  pinenos, que tiene un tiempo de retención similar al obtenido por Rivera (2008), dentro de un rango tolerable a TR (7,660 y 9,71). Este resultado implica ciertas diferencias en la retención cuando se utilizan columnas capilares de entre 15 a 30 m en espiral.



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- Por medio del tamizaje fitoquímico se logró identificar una abundante presencia de taninos pirogalotánicos, flavonoides, antocianinas, quinonas y saponinas, en el extracto de *Cinnamom canella* macerado en EtOH.
- Por medio del tamizaje fitoquímico realizado en el extracto de *Piper angustifolium* macerado en MeOH; se logró identificar una presencia estable de alcaloides.
- En los hidrodestilados de *C. canella* y *P. angustifolium*, se registró una escasa presencia de metabolitos secundarios; esto se debe a que por hidrodestilación se arrastra la mayoría de compuestos aromáticos integrados por isoprenos y terpenos que constituyen los aceites esenciales.
- Se identificó el pico cromatográfico aldehído cinámico en el hidrodestilado de la corteza de *C. canella*, y  $\alpha$ - $\beta$  pinenos en el hidrodestilado de las hojas de *P. angustifolium*.

## CAPÍTULO 6

### RECOMENDACIONES

- Establecer pruebas de tamizaje fitoquímico que interpreten una mayor diversidad de metabolitos secundarios en *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*.
- Experimentar con diferentes concentraciones de los hidrodestilados de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium*, en donde se pueda registrar una mayor cantidad de metabolitos secundarios.
- Realizar un estudio farmacológico de los metabolitos secundarios obtenidos en este proyecto para proporcionar información con respecto a los usos medicinales que se les puede atribuir.
- Analizar los aceites esenciales de *Cinnamon canella* y *Piper angustifolium* en un cromatógrafo de gases acoplado a masas para identificar la mayor parte de metabolitos secundarios.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, N. (2002). *Fitopatología*. Ciudad de México: Limusa.
- Aguirre, A. (2009). *Producción y eficiencia de un insecticida botánico de semillas de naranja en el parque Metropolitano de Guanguiltagua*. Quito: SEK.
- Alcaraz, L., & Real, M. (2012). *Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. Distrito Federal de México: Biológicas del Noroeste.
- Alvarado, B. (2007). *Cromatografía de gases y sus aplicaciones*. Bogotá: Del Valle.
- Ávila, Z. (2001). *Química orgánica: experimentos con un enfoque ecológico*. Monterrey: Dirección general de publicaciones y fomento editorial.
- Brunet, E. (2013). *Cromatografía en capa fina y en columna*. Ciudad de México: Limusa.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia y Fitoquímica: plantas medicinales*. Zaragoza: Acribia.
- Burillo, J. (2003). *Investigación y experimentación de plantas aromáticas y medicinales en Aragón: cultivo, transformación y analítica*. Zaragoza: Agraria.
- Carey, F. (2000). *Química orgánica*. New York: McGraw-Hill.
- Castaño, J. (2006). *Evaluación in vitro de extractos vegetales de *Mycosphaerella fijiensis**. San José: Morelet.
- Catania, C., & Rodríguez, J. (2004). *Influencia de maceración previa en frío*. Mendoza: Limusa.

- Ceron, C. (2006). *Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos*. Quito: SEK.
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización*. Valladolid: Mc-GrawHill Interamericana.
- Cienytech. (2014). *Miscibilidad entre disolventes: ciencia y tecnología*. Santiago de Chile: Mc-GrawHill Interamericana.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*, 564-582.
- Cruz, P. (2009). *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (Matricaria chamomilla), matico (Aristeguetia glutinosa) y marco (Ambrosia arborescens) para neofármaco*. Riobamba: Cotopaxi.
- Della, A., Batro, A., & Estévez, P. (2009). *Efectos alelopáticos de extractos acuosos de cerraja sobre la germinación y elongación radicular de achicoria y cebolla de verdeo*. Buenos Aires: Ciencias Agrarias.
- Dixon, R. (2001). Metabolitos secundarios y su fenómeno alelopático. *Nature*, 20-25.
- Domínguez, X. (1990). *Química orgánica experimental*. Monterrey: Limusa.
- Fessenden, R. (1993). *Organic laboratory techniques*. Los Angeles: Brooks/Cole.
- Flores, E. (2006). *Metabolitos secundarios activos de especies del género Piper de la flora Boliviana*. La Paz: Laguna.
- Gilbert, & Martin. (2012). *Experimental organic chemistry*. Vancouver: Hancourt.
- Guerra, D., & Panduro, D. (2012). *Aceites esenciales y grasas*. Iquitos: Amazonía Peruana.

- Gunter, E. (1948). *The essential oils: history and origin in plants production analysis*. New York: Krieger Publishing.
- Harbone, J. (2002). *Phytochemistry*. New York: Krieger Publishing.
- Izco, J. (2005). *Botánica*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Jacobson, M. (1989). *Botanical pesticides: past, present and future. En insecticides of plant origin*. Los Angeles: Symposium series.
- Jaramillo, L. (2001). *Química orgánica general*. Cali: Del Valle.
- Juglal, S. (2002). *Spicesoilsforthe control of co-occurringmy cotoxin-producing fungi*. Berlín: FoodProt.
- Kirk, O. (1998). *Enciclopedia de tecnología química*. New York: Pearson Publishing.
- Lock, O. (1988). *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. Lima: Mc-GrawHill Interamericana.
- Martínez, A. (2001). *Saponinas esteroides*. Antioquía: Del Valle.
- Martínez, A. (2012). *Quinonas y compuestos relacionados*. Antioquía: Del Valle.
- Montes, B. (1998). *Control of aspergillus flavusinmaize with plants sentiloils and their components*. Michigan: Pearson Publishing.
- Morales, L. (1997). *Evaluación del potencial insecticida de cinco especies forestales*. Medellín: Del Valle.
- Noriega, P., & Samaniego, M. (2014). *Análisis de la composición química del aceite esencial extraído de las hojas de Ocotea quixos (Ishpink) por cromatografía de gases acoplada a masas*. Quito: La Granja.

- Oliveros, J. (2008). El fenómeno alelopático: el concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Química viva*, 9-34.
- Ottaway, P. (2001). *Phytochemistry*. Toronto: Chem.
- Pahlow, M. (1981). *El gran libro de las plantas medicinales*. Distrito federal de Mexico: Everest Mexicana.
- Pamplona, R. (1995). *Enciclopedia de las plantas medicinales*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Pino, J. (2012). Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 22-24.
- Rivera, D. (2008). *Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género Piper y evaluación de la actividad citotóxica*. San Carlos: Lamusa.
- Rodríguez, J. (1991). *Cromatografía*. Ciudad de México: Limusa.
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis instrumental*. Madrid: Pearson Education.
- Sánchez, F. (2006). *Extracción de aceites esenciales*. Cali: Del Valle.
- Santos, G. (2012). *Essential oils from *Alpinia purpurata**. Nueva León: Reverté.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- SHIMADZU. (2015). *Entrenamiento de cromatografía de gases*. Quito.

- Soliman, K. (2002). Effect of oilextracted form some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Journal Food Chemical Toxicol*, 1669-1675.
- Solomons, T. (1971). *Química orgánica*. Ciudad de México: Limusa.
- Swain, T. (2003). *Chemical plant taxonomy*. New York: Academic Press.
- Taiz, Lincoln, & Zeiger. (2006). *Metabolitos secundarios y defensa de la planta*. Buenos Aires: Sinauer Associates.
- UNODC. (2012). *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados*. San José: Naciones Unidas.
- Wade, L. (2002). *The pesticide book* . Michigan: Prentice-Hall.
- Ware, G. (2004). *The pesticide book*. Ohio: Pearson Publishing.
- Waterhouse, D., Carman, W., & Gridley, G. (1996). *Cancer*. Madrid: MacLean.
- Zuñiga, S. (2011). *Elaboración y ensayo in-vivo de enjuagues bucales a partir de extractos de sábila, perejil, canela, clavo de olor a diferentes concentraciones*. Riobamba: Cotopaxi.