



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

“Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”
Tamizaje fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y actividad biológica de *Mansoa alliacea*

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Suárez Rosales, Karen Stephanie

DIRECTOR: Cartuche Flores Luis Emilio, M.Sc

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION

Magíster.

Luis Emilio Cartuche Flores.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación **“Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible” Tamizaje Fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y actividad biológica de *Mansoa alliacea*** realizado por Suárez Rosales, Karen Stefanie; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2015

f)

DIVULGACION DE RESULTADOS

La presente investigación forma parte de los resultados del proyecto SENESCYT PIC-12- INIAP-002, Convenio 20120315 “Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos Ancestrales para su Conservación y Aprovechamiento Sostenible”. Siendo la directora del proyecto la Ing. Beatriz Brito del Departamento de Nutrición y Calidad. La tesis estuvo a cargo del M.Sc. Luis Emilio Cartuche Flores del Departamento Química Aplicada en la Universidad Técnica Particular de Loja

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo. Suárez Rosales , Karen Stephanie declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible” Tamizaje Fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y actividad biológica de *Mansoa alliacea* de la titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.**

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Suárez Rosales, Karen Stefanie

Cédula 110516007-9

DEDICATORIA

A Dios fuente inagotable de amor, por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría los sueños se hacen realidad.

A mis padres Eduardo y Deysi por su cariño y apoyo incondicional brindada durante toda mi vida, que con su ejemplo de vida me motivo a finalizar este proceso estudiantil.

A mi abuelita Alicia que ha sido como mi segunda mama, por sus sabios consejos y tanto amor brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos Eduardo y Génesis por las palabras de aliento en los momentos difícil, por la compañía brindada y por ser los mejores e incondicionales amigos.

A mis familiares, amigos y personas que se sumaron a mi vida que de una u otra forma han aportado en el transcurso de mi vida estudiantil, con un consejo, palabras de aliento o su compañía ayudaron a forjar mis deseos de superación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, dueño y Señor de toda la creación por darme el don de ser su hija y regalarme bendiciones cada día, le dedico mi trabajo por permitirme llegar a este momento crucial en mi vida.

Este logro educativo se los agradezco infinitamente a mis padres y hermanos, que día a día me apoyaron en mi trayectoria estudiantil, quienes guiaron con paciencia y sabiduría cada uno de mis pasos. A ustedes agradezco infinitos.

Le expreso mi más sincero agradecimiento al M. Sc. Luis Cartuche, director de tesis por su orientación en la realización de este presente trabajo investigativo, impartiendo sus conocimientos, tiempo y brindándome motivación durante esta etapa estudiantil.

Especial agradecimiento al PhD. Vladimir Morocho y PhD. Omar Malagón por sus aportes científicos, consejos, críticas y sugerencias, siendo de vital importancia en el desarrollo de esta investigación.

Por la oportunidad brindada para realizar este trabajo de investigación le agradezco al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), SENESCYT, y la UTPL por el apoyo económico y sostén científico para la realización de esta investigación

A todos mis amigos, familiares y personas que han formado parte de mi vida, les agradezco por brindarme el mejor de sus consejos, en cada uno de los momentos de esta etapa estudiantil, a las personas que físicamente no están conmigo pero su recuerdo ha sido el impulsador para este logro estudiantil.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION	ii
DIVULGACION DE RESULTADOS	iii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
INDICE DE CONTENIDOS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1.Conocimientoancestral	7
1.1.1. Medicina ancestral del Ecuador.....	7
1.1.2. Etnobotánica de la amazonía ecuatoriana.....	8
1.2.FamiliaBignoniaceae.....	8
1.2.1. <i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry.....	8
1.2.2. Descripción botánica.....	9
1.3.Aceitesesenciales.....	12
1.4.Técnicas de separación, identificación y purificación de metabolitos secundarios.....	13
1.4.1. Maceración.....	13
1.4.2. Tamizaje fitoquímico.....	13
1.4.3. Cromatografía en columna.....	14
1.4.4. Cromatografía en capa fina.....	14
1.4.5. Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.....	15
1.4.6. Resonancia magnética nuclear.....	15
1.4.7. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas (CG-EM).....	15
1.5.Técnicas de evaluación antibacterianas y antifúngicas.....	16
1.5.1. Método de dilución.....	16
1.6.Actividad	16
antioxidante	16

1.6.1. Método ABTS.....	17
1.6.2. Método DPPH.....	17
1.7.Fenolestotales.....	17
CAPITULO II.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1.Tamizaje fitoquímico de cuatro especies vegetales.....	19
2.1.1. Extracto Etéreo.....	19
2.1.2. Extracto etanólico.....	20
2.1.3 Extracto Acuoso.....	22
2.2. Esquema general de trabajo con la especie <i>Mansoa alliacea</i>	23
2.2.1. Recolección de la muestra.....	24
2.2.2. Obtención de Extractos.....	24
2.2.3. Desclorofilación de Extractos.....	25
2.2.4. Fraccionamiento en Cromatografía en columna.....	25
2.2.5. Cromatografía en capa fina.....	25
2.2.6. Unión de fracciones.....	25
2.2.7. Caracterización estructural de moléculas mediante Resonancia Magnética Nuclear.....	26
2.2.8. Obtención del aceite esencial por el método de arrastre de vapor.....	26
2.2.9. Determinación de las propiedades físicas del aceite.....	27
2.2.10. Identificación de la composición química del aceite esencial.....	27
2.2.11. Evaluación de la Actividad Antibacteriana.....	29
2.2.12. Actividad Antioxidante.....	29
2.2.15. Evaluación de Fenoles Totales.....	33
CAPÍTULO III.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1 Tamizaje fitoquímico de las cuatro especies vegetales.....	35
3.2 Rendimiento y análisis de los extractos obtenidos de <i>Mansoa alliacea</i>	39
3.3. Fraccionamiento del extracto desclorofilado de hexano (MAKH).....	40
3.4. Fraccionamiento del extracto desclorofilado de AcoEt (MAKA).....	43
3.4.1. Fracción MAK-A-F2B.....	45
3.4.2. Caracterización Espectroscópica.....	46
3.5. Aceite Esencial de <i>Mansoa alliacea</i>	48
3.5.1. Rendimiento.....	48
3.5.2. Determinación de la Humedad.....	48

3.5.3. Propiedades Físicas del Aceite Esencial.....	49
3.5.4. Composición química del aceite esencial.....	50
3.5.5. Separación del compuesto mayoritario del aceite esencial mediante cromatografía en columna.	52
3.6. Actividad Antibacteriana y Antifúngica.....	55
3.7. Actividad antioxidante.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	65
Anexo 2. Calculo para la determinación del Rendimiento.....	66
Anexo 3. Preparación del Revelador Acido Sulfurico 5% y vainillina 1%	67
Anexo 4. Cálculo del Factor de retención (RF)	68
Anexo 5. Determinación de la humedad.....	69
Anexo 6. Determinación del rendimiento del aceite esencial.	70
Anexo 7. Determinación de la Densidad Relativa.	71
Anexo 8. Determinación del Índice de refracción a norma ANFOR NF 75 -112.....	72
Anexo 10. Bibliografía de los índices de Kóvats reportados en la literatura.	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción botánica de <i>Mansoa alliacea</i>	9
Tabla 2. Usos Medicinales de <i>Mansoa alliacea</i>	12
Tabla 3. Parámetros operacionales de la columna capilar utilizada.	28
Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Equisetum arvense</i>	35
Tabla 5. Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Costus spicatus</i>	36
Tabla 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Petiveria alliacea</i>	37
Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Mansoa alliacea</i>	38
Tabla 8. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de las hojas secas de <i>Mansoa alliacea</i>	39
Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico del extracto MAKH	41
Tabla 10. Compuestos identificados de MAKH-A por CG-MS en columna DB5-MS	42
Tabla 11. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción MAKH F2.....	45
Tabla 12. Datos espectrales de protón y carbono de la fracción MAKH-F2B y su comparación con el ácido oleanólico.	47
Tabla 13. Humedad de hojas frescas de <i>Mansoa alliacea</i>	49
Tabla 14. Densidad del aceite esencial de <i>Mansoa alliacea</i>	49
Tabla 15. Índice de refracción	50
Tabla 16. Composición química del aceite esencial de <i>M. alliacea</i>	51
Tabla 17. Fraccionamiento cromatográfico del aceite esencial de <i>M. alliacea</i>	53
Tabla 18. Actividad biológica de los extractos y aceites esencial de <i>Mansoa alliacea</i>	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry.....	9
Figura 2. Esquema de ensayos a partir del extracto etéreo.....	19
Figura 3. Esquema de ensayos a partir del extracto etanólico.	21
Figura 4. Esquema de ensayos a partir del extracto acuoso.	23
Figura 5. Esquema general de la metodología empleada para el análisis fitoquímico y de actividad biológica de la especie <i>Mansoa alliacea</i>	24
Figura 6. Esquema de la metodología empleada para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método ABTS.	31
Figura 7. Esquema de la metodología empleada para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método DPPH.....	32
Figura 8. Metodología para la determinación de Fenoles Totales.	33
Figura 9. Placas de silica gel fase directa de los extractos de <i>Mansoa alliacea</i> . A) F. móvil: Hex-AcOEt 1:1(v/v); B) F. móvil: Hex-AcOEt 4:6 (v/v); C) F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v)....	40
Figura 10. CCF en Hex,-AcOEt 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del extracto MAKH. Se muestran las placas observadas en luz UV 254 nm A) fracciones 1-19. B) fracciones 20-26.	40
Figura 11. Cromatograma fracción MAKA- A en DB5-MS	42
Figura 12. CCF en Hex,-AcOEt 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del extracto MAKA.	43
Figura 13. CCF en Hex,-AcOEt 7:3(v/v), de la corrida cromatográfica MAKA F2. Únicamente se muestran las fracciones 91-119 debido a que en ellas se visualizó la presencia de compuestos.	44
Figura 14. CCF en Hex-AcOEt 7:3(v/v), subfracciones de MAKA F2. Revelada con H ₂ SO ₄ – vainillina.....	44
Figura 15. CCF fase directa en Hex -AcOEt 7:3(v/v) placa observada en placas luz UV 254 nm.	45
Figura 16. Espectro de masas ESI-TOF de la fracción MAKAF2-B.	46
Figura 17. Ácido oleanólico.	48
Figura 18. Cromatograma del aceite esencial de <i>M. alliacea</i> en DB-5MS.	51
Figura 19. CCF MeOH-H ₂ O en 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del aceite esencial. Se muestran las placas observadas en luz UV 254 nm A) fracciones 65-73. B) fracciones 74-79. C) fracciones 80-90.....	52
Figura 20. Análisis de resonancia magnética nuclear de protón de la fracción KS 65-73	53
Figura 21. Cromatograma de Diallil Trisulfide.....	54

RESUMEN

Mansoa alliacea especie de la familia Bignoniaceae conocida como “ajo sachá”, es una planta tropical nativa de la selva amazónica, se lo encuentra en su estado silvestre en los bosques primarios húmedos de Brasil, Ecuador, Perú, y Costa Rica. En el presente estudio fitoquímico se aisló un triterpeno pentacíclico, ácido oleanólico (456,70 g/mol), obtenido a partir del extracto de acetato de etilo. Su caracterización se realizó mediante técnicas de resonancia magnética nuclear y comparación con literatura. De las hojas frescas y mediante destilación por arrastre de vapor se obtuvo el aceite esencial. El análisis de los constituyentes químicos se realizó mediante CG-EM en la columna DB5-MS, donde se identificaron 6 compuestos, los mismos que representan el 97,2%, y son dialil trisulfuro (70,18%), disulfuro, di 2-propenil (13,28%), dialil tetrasulfuro (9,22%), fitol (1,99%), trisulfuro, metil 2-propenil (2,02%), 3-Vinil-1,2-ditiociclohex-5-ene (0,51%). Dialil trisulfuro se aisló mediante cromatografía en fase reversa y se identificó mediante RMN de protón. La actividad antioxidante evaluada mediante los métodos de DPPH y ABTS resultó poco significativa. Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica, mostrándose medianamente activa el extracto etéreo y de acetato de etilo con 500 µg/ml frente a *Enterococcus faecalis*. El compuesto dialil trisulfuro presentó una CMI de 2,5 mg/mL frente a *E. faecalis* y *S. aureus*.

Palabras Claves

Mansoa alliacea, Triterpeno, NMR, CG-EM, ABTS, DPPH. *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Mansoa alliacea belongs to the Bignoniaceae family, also known as “ajo sacha” is a native tropical plant from the Ecuadorian amazon. The plant grows in Brazil, Perú, Ecuador and Costa Rica. The phytochemical study reported the presence of a pentacyclic triterpene named oleanolic acid (456,70 g/mol) which was obtained from the ethyl acetate extract and was identified by NMR analysis and by literature comparison. From fresh leaves, the essential oil was obtained by hidrodestillation. The chemical composition was determined by GC-MS with a DB5MS column. Six constituents were found, representing the 97,2% of the total content of the oil, being these: Diallyl tetrasulfide (9.22%), Phytol (1,99%), trisulfide, methyl 2-propenyl (2,02%), 3-vinyl-1,2-dithiocyclohex-5-ene (0,51%). Diallyl trisulfide was isolated by CC in reversed phase and identified by ¹H-NMR. The antioxidant activity measured by DPPH and ABTS methods resulted less significative. The antibacterial and antifungal activity was evaluated, showing a moderate activity for EtOAc and ether extract against *Enterococcus faecalis* (MIC value of 500 µg/mL). Diallyl trisulfide exhibited a MIC value of 2,5 mg/mL for *E. faecalis* and *S. aureus*.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales se evidencia desde la existencia del ser humano como único y más importante recurso que disponían los primeros pobladores de la Tierra, como alimento y conservación de la salud, siendo con ensayos de acierto-error como adquirieron conocimientos empíricos acerca de las propiedades de cada una de las plantas. Los estudios fitoquímicos se han desarrollado significativamente gracias a los avances en las técnicas de identificación de productos naturales, siendo de gran aporte para la industria farmacéutica y fitoterapéutica. Se debe destacar que el 25 % de los medicamentos de uso comercial son derivados de la flora tropical a partir del conocimiento etnomédico de los pueblos indígenas (Rios, 2007).

Mansoa alliacea, perteneciente a la familia Bignoniaceae conocida como ajo de monte es una planta tropical nativa de la selva amazónica, se lo encuentra en su estado silvestre en bosques húmedos de Brasil, Ecuador, Perú, y Costa Rica. (Pinedo, 1999). Entre los usos etnomédicos atribuidos a esta especie encontramos que mediante decocción de las hojas y administración por vía oral se pueden tratar enfermedades como reumatismo, la artritis, trastornos uterinos, resfriados, neumonía y otras infecciones de las vías respiratorias superiores; algunas tribus indígenas preparan el té de hojas para ayudar a la fertilidad y estados epilépticos (Arévalo, 1994). Sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas se han atribuido a la presencia de estigmasterol, β -sitosterol, daucosterol y fucosterol. Su uso como condimento se atribuye a sus compuestos solubles en agua como los organosulfurados responsable del olor y sabor típico de ajo (Monserrate, 2014).

Dentro del marco de colaboración entre la Universidad Técnica Particular de Loja y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, se planteó el “Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos Ancestrales para su Conservación y Aprovechamiento Sostenible” dentro del cual, el estudio fitoquímico y de actividad biológica de *Mansoa alliacea* formó parte.

Se inició el estudio de cuatro especies *Equisetum arvense*, *Petiveria alliacea*, *Costus spicatus* y *Mansoa alliacea* con el tamizaje fitoquímico preliminar para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en las especies según los procedimientos descritos por Miranda (2002) y Ordoñez (2005).

Se obtuvieron extractos de *Mansoa alliacea* a partir de 500 g de material seco y triturado mediante maceración dinámica y estática con solventes de polaridad creciente en hexano, Acetato de etilo y Metanol. La muestra triturada se mezcló con hexano en proporción 1:10 (planta:disolvente), agitación durante una hora, y 3 horas de maceración estática. El extracto

se separó por filtración y el residuo vegetal seco, se extrajo empleando el mismo procedimiento anterior, pero usando AcOEt y posteriormente MeOH. Cada extracción se realizó por triplicado. Antes del fraccionamiento, todos los extractos se sometieron a un proceso de desclorofilación mediante cromatografía de reparto o extracción líquido-líquido, empleando una mezcla de Hex:(MeOH:H₂O) en proporción 1:1. Se empleó una mezcla de MeOH:H₂O en proporción 9:1. El extracto obtenido se decantó y evaporó a baja temperatura y presión reducida.

Para el fraccionamiento se empleó cromatografía en fase normal en columnas de vidrio, empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol como eluyentes. Se monitoreó el progreso del fraccionamiento mediante cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de silicagel G60 F₂₅₄ (MERCK). Una vez aislados los metabolitos secundarios se procedió a la elucidación química mediante la realización e interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN 400 MHz) de ¹H y ¹³C, combinados con experimentos uni y bidimensionales de RMN, (DEPT, COSY, HMBC, HMQC) (Friebolin, 2004; (McMurry 2012) y GC-EM para la determinación de la naturaleza del compuesto.

Se obtuvo aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor, se midieron parámetros como densidad e índice de refracción y la composición química se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), en un equipo modelo Agilent empleando la columna apolar DB-5MS.

Para evaluar la susceptibilidad bacteriana se utilizaron 7 cepas patógenas, 5 Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC®8427, *Escherichia coli* ATCC®25922 y *Salmonella Tiphymurium* LT2; y 2 Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC®29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC®25923. Para evaluar la susceptibilidad fúngica se utilizaron de dos cepas de dermatofitos: *Trichophyton rubrum* ATCC®28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®28185. La susceptibilidad antimicrobiana se expresó como Concentración mínima inhibitoria y se empleó el método de microdilución en caldo empleando Caldo Mülller Hinton para bacterias y Caldo Sabouraud para Hongos. Se empleó el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones decrecientes de los extractos de prueba y se utilizó una concentración final de 5 x 10⁵ ufc/ml para bacterias de y 5 x 10⁴ esporas/ml para hongos (g, 2006). Como controles positivos se empleó gentamicina, ampicilina e itraconazol.

Se evaluó la actividad antioxidante mediante los ensayos de Fenoles Totales, DPPH y ABTS. Los resultados son expresados como μMol equivalentes de trolox/g de muestra, indican que la muestra analizada tiene una actividad antioxidante equivalente a μMol de trolox. En el caso de los fenoles totales, se utilizó ácido gálico como control positivo y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Conocimiento ancestral

1.1.1. Medicina ancestral del Ecuador.

“La práctica de la Medicina Tradicional se halla difundida en toda Latinoamérica donde se tejen una serie de relaciones socioculturales y económicas las cuales permiten su vigencia. El Ecuador es un país intercultural y pluricultural, de creencias ancestrales que son endosadas de generación en generación por lo que se caracteriza por su manera particular y diferente en el proceso de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades; así como también su amplia gama de plantas medicinales utilizadas para la rehabilitación de los pacientes con respecto a su salud” (Becerra, 2014).

En múltiples ocasiones la medicina tradicional indígena ha representado la única opción de prevención y curación de enfermedades para los habitantes de las comunidades originarias; esto debido principalmente a la exclusión y a la pobreza extrema en la que viven (Araujo-Murakami & Zenteno, 2006).

El concepto de salud indígena acerca de la vida y la muerte es distinto al occidental, siendo considerado el sistema de pensamiento y la preservación de la vida en concreto como una compleja red de interacciones a todo nivel biológico y espiritual con el medio ambiente (Seri, 1992).

Uno de los mayores descubrimientos científicos de la flora ecuatoriana que impactó a la medicina occidental y a Europa, fue el descubrimiento de las propiedades terapéuticas de la *Cinchona* cuyo compuesto quinina descubierto en el siglo XVII sirvió de base para el tratamiento del paludismo. Otra planta de importante beneficio para pacientes con cáncer e inmunodeficientes es la Dulcamara (*Psychotria viridis*, *Kalanchoe pinnata* y/o *Solanum dulcamara*) a partir de la cual se lanzó al mercado el fitofármaco llamado BIRM (Modulador Biológico de la Respuesta Inmune) el cual modifica la conducta biológica del tumor cancerígeno y eleva las defensas del sistema inmunológico (Buitròn, 1999).

El uso tradicional de plantas medicinales cada vez más despierta el interés de la industria farmacéutica, para el descubrimiento de nuevas moléculas con fines terapéuticos. Los estudios han sido de relevancia sobre todo para rescatar y salvar el conocimiento que ha estado por perderse, para el manejo y uso sostenible de plantas medicinales, con tendencia en aumento tanto regional, nacional como global (Araujo-Murakami & Zenteno, 2006). El uso racional y sistematizado de las plantas medicinales debe ser un tema que merece analizarse para evitar daños a los ecosistemas y las especies, garantizando una actividad económica legal.

1.1.2. Etnobotánica de la amazonía ecuatoriana.

La amazonía ecuatoriana es un territorio con gran biodiversidad vegetal dado que existen 8200 especies de plantas vasculares, de las cuales un 15% son endémicas (Ruiz, 2000). Esta rica diversidad se debe a la alta precipitación no estacional, la complejidad de los suelos, y varios ríos que irrigan sus bosques tropicales.

Un gran número de etnias se centra en la amazonia ecuatoriana siendo la más representativa la Kichua del Oriente (Canelos y Quijos), lugar donde se ha llevado a efecto numerosos estudios etnobotánicos; de acuerdo a Cerón (1993), la amazonia cuenta con un número importante de especies medicinales, sin restar importancia a las especies madereras y alimenticias existentes en la zona geográfica.

1.2. Familia Bignoniaceae.

La Familia Bignoniaceae se caracteriza por sus especies principalmente madereras así como también ornamentales posee más de 100 géneros y unas 800 especies, de distribución tropical y subtropical (Rzedowski 1993) Los compuestos característicos de la familia de las Bignoniaceae son iridoides glicosilados, ciclopropanatos, feniletanoides (Martin et al. 2007).

Se puede mencionar que las especies del género *Mansoa* son muy aromáticas con el característico olor a ajo, debido a metabolitos secundario tales como alildisulfóxido, aliina, alicina o sulfuro de dialilo entre los más significativos; las especies más representativas son *M. standleyi*; *M. hymenae*; *M. difficilis*; *M. hirsut*; *M. lanceolat*; *M. alliacea* (Zoghbi et al. 1984) y (López 2010). El intenso olor que emana la planta le sirve como mecanismo de protección contra depredadores de tal manera que es un excelente repelente desde el punto de vista de su ecología adaptativa.

1.2.1. *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry.

Mansoa alliacea es una planta tropical nativa de la selva amazónica, se lo encuentra en su estado silvestre en los bosques primarios húmedos de Brasil, Ecuador, Perú, y Costa Rica. Es un arbusto trepador de 2 a 3 metros de altura aproximadamente, hojas perennes entre 5 a 27cm de largo y 2 a 18 cm de ancho, su ápice es agudo y su base en forma de cuña, generalmente son de color verde brillante, tiene pseudoestípulas aplanadas cónicas y muy pequeñas. Las inflorescencias son axilares y en racimos, presenta corola tubular de 6 a 9 cm por lo general de forma acampanada de color blanco a violeta, su cáliz es cupular de 5cm x 6mm. Por sus características botánicas, se la puede considerar como una planta ornamental además de curativa (Vega, 2001).



Figura 1. *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry
Fuente: Vega, 2001

1.2.2. Descripción botánica.

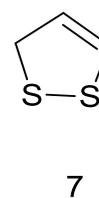
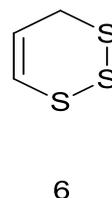
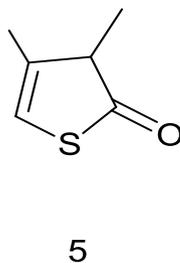
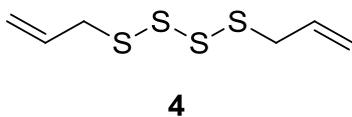
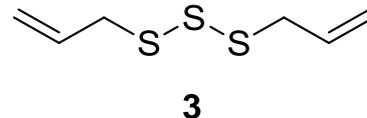
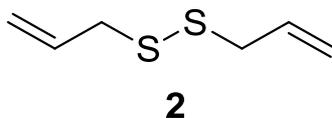
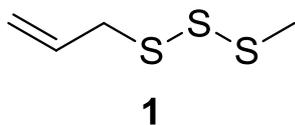
Tabla 1. Descripción botánica de *Mansoa alliacea*

Descripción Botánica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Bignoniaceae
Genero	Mansoa
Especie	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam) H.A Gentry
Nombres Comunes	Ajo de monte, sachá ajo, bejuco de ajo.
Sinónimos	Adenocalymma alliaceum (Lam.) Miers Pachyptera alliacea (Lam.) A.H., Gentry Pseudocalymma alliaceum (Lam.) Sandwith (María G. et al 2007).

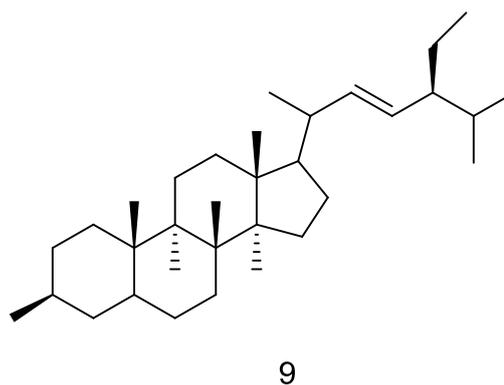
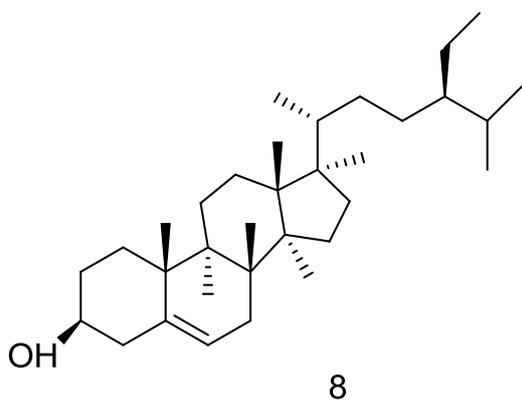
Fuente: Vega 2011

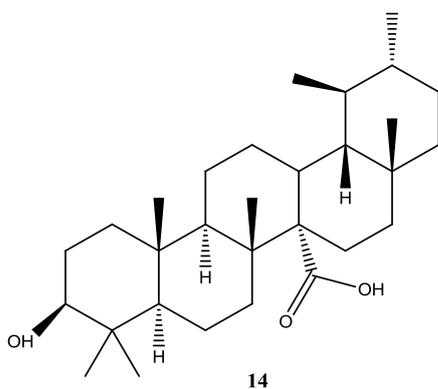
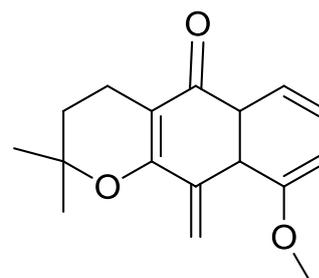
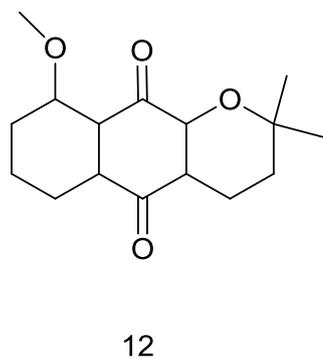
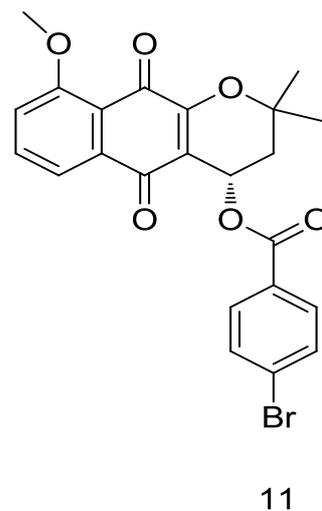
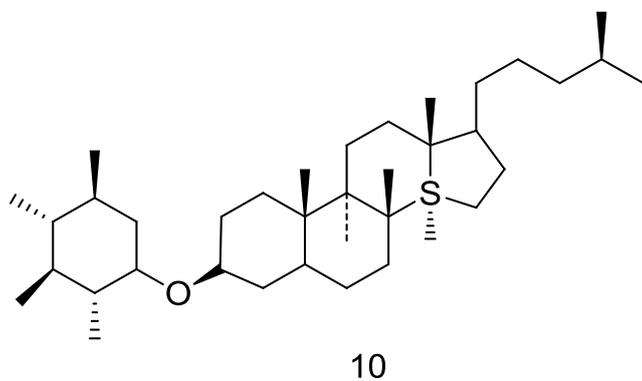
1.2.3. Composición química.

Estudios sobre el aceite esencial de *Mansoa alliacea* realizados en Perú, Brasil y la India, reportan un importante contenido de compuestos organosulfurados responsables del olor característico de la planta, entre los más importantes: alil trisulfuro (1), dialil disulfuro (2), dialil tetrasulfuro (3), dialil trisulfuro (4) 3,4-dimetil-2,3-dihidrothiophen-2-one (5), 3-vinyl-1,2-dithi-4-ene (6), dithiacyclopentene (7) con variantes mínimas de concentración. (Oliveira, 2013; Rao et al., 1978).



Se reporta además compuestos no volátiles de extractos orgánicos a partir de las hojas y flores, encontrándose β -sitosterol (**8**), estigmasterol (**9**), duacosterol (**10**) vitaminas C y D, y minerales como selenio y cromo (López y Pérez 2010) y algunas naftoquinonas representativas como 4-p-Bromobenzoyloxy-9-methoxy- α -lapachone (**10**) y 4-hydroxy-9-methoxy- α lapachone, (**11**) 9-methoxy- α -lapachone (**12**) 3 β -hydroxyurs-18-en-27-oic acid, (**13**) (Itokawa et al., 1992).





1.2.4. Propiedades farmacológicas.

El aprovechamiento etnomedicinal de *Mansoa alliacea* en las culturas amazónicas es ampliamente conocido. Se utilizan sus hojas en infusión para el tratamiento de malaria, resfriados, tos, neumonía, náuseas y, como analgésico y antipirético (Silva et al 1977; Berg

1993; Pérez, 2002). La maceración alcohólica de sus hojas se usa en forma de cataplasmas como un excelente antirreumático y antiartrítico. El tallo en tratamiento alcohólico es un excelente coadyuvante para el tratamiento de la epilepsia (Revilla, 2001). Muchas parteras recomiendan la maceración acuosa del tallo como bebida en el último mes de embarazo de la madre para un alumbramiento sin complicaciones (DeFilipps et al, 2007).

Cada recalcar que por su olor característico, no solo tiene uso medicinal sino también culinario, pues la cultura Kickua lo emplean como un excelente condimento alternativo de *Allivium sativum* (ajo de bulbo)(López y Pérez, 2010). En la tabla 2 se resumen los usos medicinales de la planta a lo largo de la Cordillera de los Andes.

Tabla 2. Usos Medicinales de *Mansoa alliacea*

País	Uso Medicinal
Venezuela	Emético
Brasil	Analgésico, tos, fiebre, dolores musculares, antirreumático y antiartrítico
Colombia	Enfermedades de las vías respiratorias superiores
Guyana	Fatiga, calambres, dolores musculares, malestar en general, resfriados, reumatismo
Perú	Antiinflamatorio, antipirético, antiartrítico, depurativo, purgante, problemas respiratorios, epilepsia, fertilidad, trastornos uterinos, problemas dermatológicos, repelente de insectos
Surinam	Dolores reumáticos, trastornos uterinos, antipirético, malestar en general

Fuente: Revilla 2011

1.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos del metabolismo secundario vegetal de las plantas aromáticas, son sustancias naturales y volátiles que se caracteriza por su fuerte olor. Desde el punto de vista fisiológico, actúan como reguladores del potencial hídrico evitando la deshidratación explicándose la variación durante un ciclo fenológico (Pala P. et al., 2001)

Los aceites esenciales se conforman por una mezcla compleja de al menos 20 a 60 compuestos, en los que se destacan los alcoholes, esteroides, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos e hidrocarburos. Pero los principales son los compuestos aromáticos, compuestos alifáticos y los compuestos por terpenos fundamentalmente mono y sesquiterpenos, siendo característica principal su bajo peso molecular. Los compuestos aromáticos presentan gran estabilidad, característica dada por la estructura resonante asignada al benceno. Existen

anillos aromáticos que contienen un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, como derivados de glucosinolatos o derivados de los isotiocionatos (Bruneton, 2001).

Con el descubrimiento de la destilación se hizo posible separar los compuestos de interés o sus mezclas, dando lugar al nacimiento de los aceites esenciales como producto comercial. No obstante el metabolismo secundario de la planta, provoca constantes modificaciones fisicoquímicas, o por condiciones del medio ambiente e interferencias de luz, calor, presencia de enzimas, modificando las propiedades de sus componentes (Cerutti, 2004).

Debido a sus propiedades son utilizados en la perfumería, industria cosmética, farmacológica, alimenticia, empleada como preservantes, y presenta utilidad en terapéutica antimicrobiana, analgésica, sedante, antiinflamatoria, espasmódica y anestésica (Fandohan, 2004).

1.4. Técnicas de separación, identificación y purificación de metabolitos secundarios.

1.4.1. Maceración.

Es un proceso de extracción sólido-líquido de los principios activos de una planta, dando como resultado un equilibrio de concentración entre el material vegetal y el disolvente, por lo general la proporción más utilizada es 1/20 material vegetal-líquido, pudiendo interferir aspectos secundarios como su naturaleza, tamaño de la partícula, su contenido de humedad y características del disolvente como la selectividad. (Sharapin, 2000).

La maceración estática se le denomina así porque el proceso consiste en dejar en contacto el material vegetal con el disolvente, varios días en reposo. Permitiendo que la difusión del disolvente penetre en el material vegetal gracias a la permeabilidad de las membranas celulares, para optimizar el proceso se somete la maceración estática a movimientos constante, llamándose así maceración dinámica (Sharapin, 2000).

1.4.2. Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico es el estudio preliminar, con ensayos sencillos y rápidos que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en el material vegetal, y como guía para el posterior fraccionamiento de extractos de interés.

Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen

únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Bruneton, 2001).

1.4.3.Cromatografía en columna.

La cromatografía es un método esencialmente físico de separación de compuestos, los cuales se van a dividir en dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. La muestra se desplaza con la fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, generalmente gel de sílice y que se fija a una columna de vidrio o a una superficie sólida (Willard et al., 1991).

Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se moverán con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. La eficacia de una columna para separar solutos depende del número de platos teóricos, a mayor número de platos teóricos, mejor es la separación. La velocidad de la fase móvil tiene incidencia con el avance del soluto, su dispersión y por lo tanto su eficacia (Rocha, 2000).

1.4.4.Cromatografía en capa fina.

Es un método rápido y eficiente de identificación de metabolitos secundarios presentes en una muestra compleja. Se basa en el principio de reparto de dos sustancias en donde la fase estacionaria es un sólido adsorbente que por lo general es sílice gel y la fase móvil debe ser inerte con la estacionaria, y las moléculas en la muestra fluyen por capilaridad.

La relación de las distancias recorridas por el compuesto y el disolvente desde el origen del cromatograma se lo denomina factor de retención (**R_f** por sus siglas en inglés); esta movilidad relativa supone un valor constante para cada compuesto. Se calcula el valor R_F con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

1.4.5. Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.

Es una técnica usada para separar sustancias orgánicas presentes en plantas aromáticas cuyas moléculas son volátiles, presión de vapor baja y punto de ebullición alto. La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador (Bandoni, 2000).

1.4.6. Resonancia magnética nuclear.

Es una herramienta analítica que explota las propiedades magnéticas de ciertos núcleos, el núcleo de un protón inmerso en un campo magnético, puede ocupar dos niveles asociados al spin nuclear, por lo tanto cuando incide un haz de radiación electromagnética (rem) de la frecuencia adecuada sobre un núcleo de ^1H que este ocupando el nivel inferior, se pasa al nivel superior.

Los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos, hidrógeno y carbono, se pueden observar fácilmente con cantidades no muy grandes de muestra. Puesto que en cada caso se pueden sacar conclusiones sobre el entorno próximo e incluso lejano a cada átomo, se puede llegar a deducir la estructura de dichos compuestos. Además de los átomos de H y C, se pueden observar otros átomos, siempre que haya una abundancia suficiente de un isotopo magnéticamente activo (Elguero et al., 2011).

1.4.7. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas (CG-EM).

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos, brindando información acerca de la composición atómica molecular de materiales inorgánicos y orgánicos.

La cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas (CG-EM) es una técnica combinada ampliamente usada para análisis cualitativos y cuantitativos de mezclas con alto grado de efectividad que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Permite separar e identificar compuestos volátiles, y no muy volátiles como son medicamentos, pesticidas, contaminantes orgánicos ambientales, entre otros (Lopez & Perez 2010).

1.5. Técnicas de evaluación antibacterianas y antifúngicas.

En las últimas cuatro décadas se han realizado innumerables estudios de sustancias provenientes de plantas, con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra microorganismos patógenos y de esta manera disponer de nuevos agentes antimicrobianos, con menores efectos tóxicos y efectos secundarios indeseables. Las técnicas *in vitro* son las más empleadas dada la sencillez y la reproducibilidad de las mismas permitiendo medir la susceptibilidad de los microorganismos frente a sustancias con posible potencial antimicrobiano (Russo, T., 1988).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica son variados y la calidad de los resultados son influenciados por los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Se clasifican en cuatro grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución, bioautografía y análisis conductimétrico, éste último detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Sawai J., et al 2002).

1.5.1. Método de dilución.

El método de dilución en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas para una microdilución que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal en estudio. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Andrews J., 2001).

El método de microdilución en caldo es una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras, su ventaja frente a otros métodos es su alta sensibilidad para cantidades pequeñas, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Wilkinson J., 2007).

1.6. Actividad antioxidante

Los antioxidantes naturales presentes en las plantas han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo está implicado en un gran número de afecciones de la salud y desordenes sistémicos como fallo cardíaco, daños cerebrales, inflamaciones, cataratas, etc. Un agente antioxidante actúa como supresor de radicales libres, inhibiendo la peroxidación de cualquier proceso mediado por estos radicales (Youngson, 2003).

La actividad antioxidante de una mezcla depende del tipo, posición y número de hidroxilos en la molécula; concentración de compuestos fenólicos, y de la presencia de metales de transición, además del microambiente en que se encuentra el compuesto (Kuskoski et al. 2004).

1.6.1. Método ABTS.

Actualmente el método ha sido ampliamente usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS llamado así por el reactivo 2,2-azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, soluble en agua y químicamente estable. Este ensayo se basa en la activación de metmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el radical catiónico, cuando hayan o no antioxidantes (Re et al. 1999).

1.6.2. Método DPPH.

Es un método rápido y sencillo se basa en la medición de eliminación de radicales libres de los compuestos antioxidantes con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En este método el reactivo es de color púrpura. (Castañeda et al. 2008; Lim et al. 2007; Sanchez et al. 1998) El radical DPPH absorbe a 517 nm y la actividad antioxidante puede ser determinada monitoreando el descenso en su absorbancia, mientras más antioxidante sea la muestra, menor será su valor (Antolovich et al. 2002). Los resultados obtenidos pueden ser expresados en equivalentes Trolox/mg extracto (Trolox: análogo hidrosoluble de la vitamina E), a partir de la realización previa de una curva de calibración del control (McClain et al., 1995).

1.7. Fenoles totales

Los compuestos fenólicos derivados de la vía del shikimato y la del acetato constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios con actividad antioxidante importante. El método espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. El análisis espectrofotométrico es complementario al cromatográfico permite conocer la cantidad de fenoles de forma general. Ha sido utilizado como método para la evaluación de fenoles totales en productos naturales (Prior et al. 2005; Swain & Hillis 1959).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tamizaje fitoquímico de cuatro especies vegetales

Se realizó el tamizaje fitoquímico de las especies *Equisetum arvense*, *Costus spicatus*, *Petiveria alliacea* y *Mansoa alliacea* a partir de los extractos etéreo, etanólico y acuoso realizando su análisis tal como lo describe Miranda (2002) y Ordoñez (2005). Las marcas de identificación de un resultado positivo o negativo para cada ensayo, son descritos en el anexo 1.

2.1.1. Extracto Etéreo.

Con 50g de planta seca y triturada se colocó a maceración dinámica, durante 4 horas. La relación planta disolvente es 1:10. El extracto líquido se filtró a vacío para su utilización en el tamizaje fitoquímico. El residuo sólido se secó a temperatura ambiente durante 5 horas, el mismo que se utilizó para las siguientes extracciones. En la figura 2 se visualizan los ensayos a realizar a partir del extracto etéreo

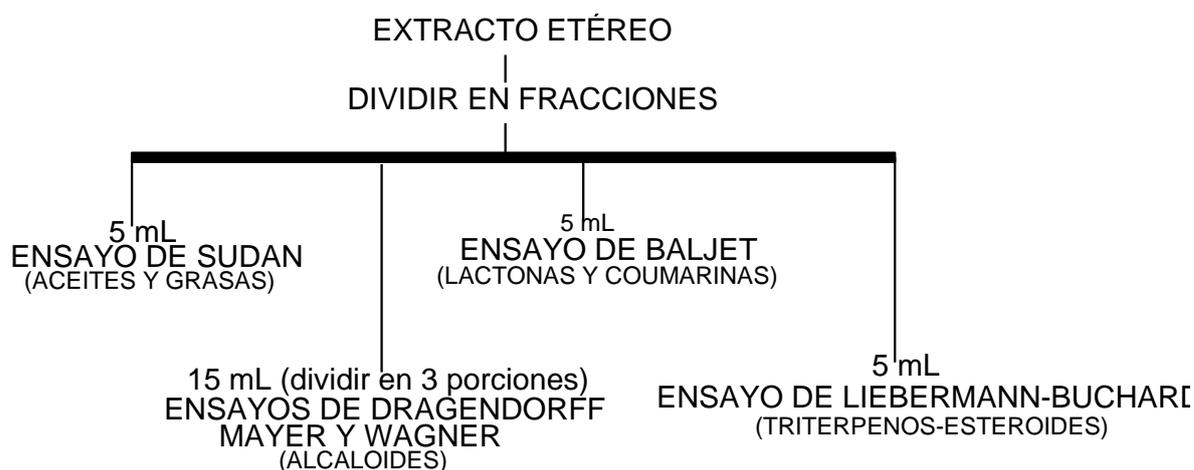


Figura 2. Esquema de ensayos a partir del extracto etéreo.
Fuente: Miranda (2002)

2.1.1.1 Ensayo de Dragendorff.

El presente ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto y se evaporó a baño de agua, el residuo se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en agua, calentamos suavemente y se procedió a enfriar. Con la solución ácida se realizó el ensayo añadiendo tres gotas del reactivo de Dragendorff.

2.1.1.2. Ensayo de Mayer.

Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida como se describe para el ensayo de Dragendorff. Se adicionó una pizca de cloruro de sodio en polvo, con agitación vigorosa y finalmente filtración. Se agregó 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.

2.1.1.3 Ensayo de Wagner.

Se procedió de la misma manera igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 3 gotas del reactivo de Wagner.

2.1.1.4 Ensayo de sudan:

Permite reconocer la presencia de grasas y aceites. Se añadió en un tubo de ensayo 5 ml del extracto, se le colocó 1 ml de la solución diluida en agua del colorante Sudan III. Se calentó en baño de agua hasta la evaporación del disolvente.

2.1.1.5 Ensayo de Baljet.

Permite reconocer en un extracto la presencia de cumarinas. Colocamos en un tubo de ensayo 5 ml del extracto, se dejó evaporar el disolvente en baño de agua y redisolvió en 1 ml de alcohol. En estas condiciones se adicionó 1 ml del reactivo.

2.1.1.6 Ensayo de Liebermann-Bbuchari.

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Para ello el extracto se evaporó en baño maría, y el residuo se redisolvió en 1 ml de cloroformo. Se adicionó 1 ml de anhídrido acético y se mezcló hasta su disolución. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

2.1.2. Extracto etanólico.

El residuo vegetal seco proveniente de la maceración inicial con éter de petróleo se sometió a maceración dinámica en etanol durante 4 horas. La metodología de extracción de metabolitos se describe en el apartado 2.1.1. En la gráfica 3 se detallan las reacciones a partir del extracto alcohólico.

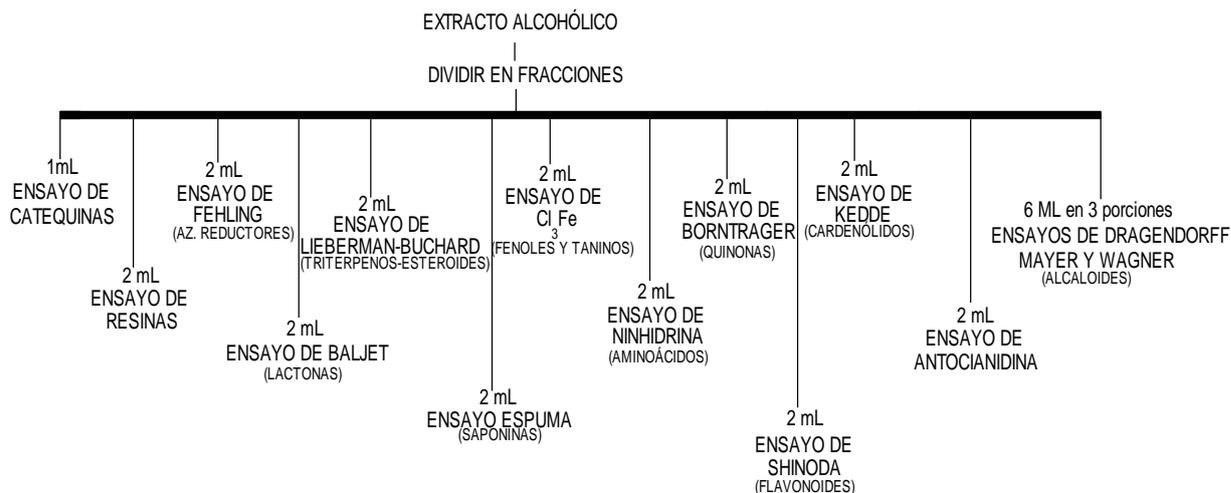


Figura 3. Esquema de ensayos a partir del extracto etanólico.
Fuente: Miranda (2002).

2.1.2.1 Ensayo de catequinas.

Con la ayuda de un capilar se tomó de la solución alcohólica obtenida una gota y aplicamos la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplicar la solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV 365nm, indica un ensayo positivo.

2.1.2.2 Ensayo de resinas.

Para detectar este tipo de compuestos, se adicionó a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

2.1.2.3 Ensayo de Fehling.

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello colocamos 2 ml en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo se redisolvió en 2 ml de agua. Se adicionó 2 ml del reactivo y se calentó en baño de agua durante 10 minutos.

2.1.2.4 Ensayo de espuma.

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. Colocamos 2 ml en un tubo de ensayo y diluimos con 10 ml de agua destilada, se agitó la mezcla vigorosamente durante 10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos.

2.1.2.5 Ensayo de cloruro férrico.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. En un tubo de ensayo se colocó 2 ml de extracto alcohólico y 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina.

2.1.2.6 Ensayo de ninhidrina.

Permite reconocer la presencia de aminas en general. Se tomó 2 ml del extracto y se mezcló con 2 ml de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calentó 10 minutos en baño de agua.

2.1.2.7 Ensayo de Shinoda.

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Colocamos 2 ml del extracto en un tubo de ensayo, y se diluyó con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de 5 minutos, se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que su separación.

2.1.2.8 Ensayo de antocianidinas.

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de flavonoides. Se calientan 2 ml de extracto etanólico por 10 minutos con 1 ml de HCl concentrado. Se dejó enfriar y se adicionaron 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Se agitó y se dejó separar las dos fases.

2.1.2.9 Ensayo de Kedde.

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Se colocó 2 ml del extracto en un tubo de ensayo, se mezcla con 1 ml del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es cuando aparece una coloración violácea, persistente durante 1 y 2 horas.

Los ensayos de Identificación de alcaloides, ensayo de Baljet y Ensayo de Liebermann-Burchard fueron realizados de acuerdo a la metodología antes descrita para el tamizaje del extracto etéreo.

2.1.3 Extracto Acuoso.

El residuo vegetal seco es puesto a maceración dinámica durante 4 horas con la metodología descrita en el apartado 2.1.1. El tamizaje se lo realiza mediante los ensayos descritos en la figura 4.

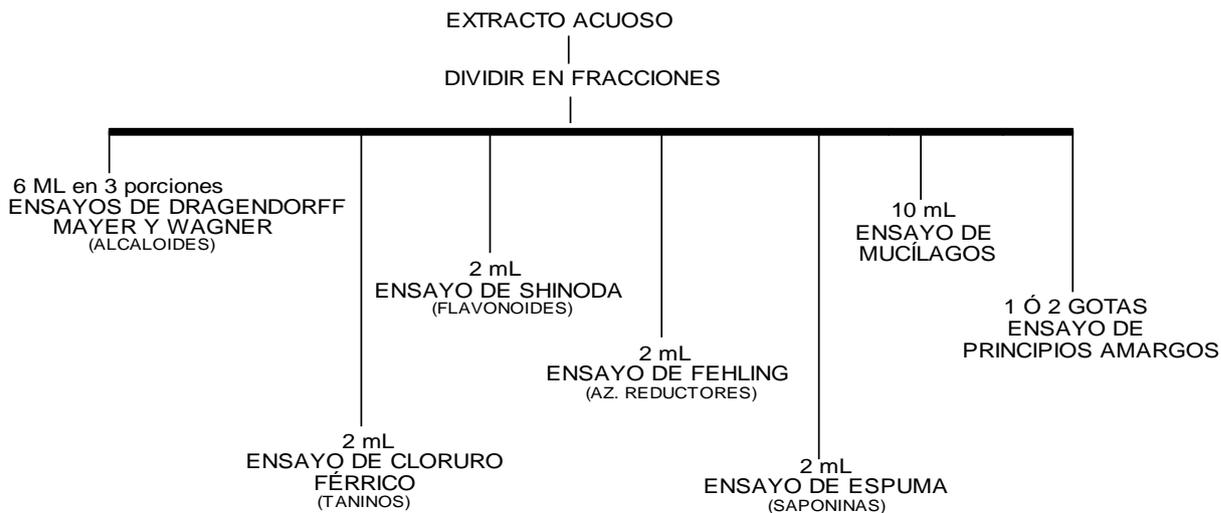


Figura 4. Esquema de ensayos a partir del extracto acuoso.
Fuente: Miranda (2002)

2.1.3.1 Ensayo de mucilagos.

Permite reconocer la presencia de estructuras tipo polisacáridos, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello, colocamos 10 ml del extracto en un tubo de ensayo y se dejó enfriar a 5°C.

2.1.3.2 Ensayo de Principios amargos y astringentes.

El ensayo se realizó saboreando 1 gota del extracto, reconociendo el sabor bien diferenciados al paladar de cada uno de estos principios.

Los ensayos de identificación de alcaloides, el ensayo de Fehling, ensayo de cloruro férrico, ensayo de espuma, ensayo de shinoda fueron realizados de acuerdo a la metodología antes descrita en el tamizaje de los extractos etéreo y etanólico.

2.2. Esquema general de trabajo con la especie *Mansoa alliacea*

En la figura 5 se describen todos los procedimientos empleados para el análisis fitoquímico y de actividad biológica de *Mansoa alliacea*. Se resumen los ensayos realizados tanto para los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol, como para la fracción volátil obtenida mediante hidrodestilación.

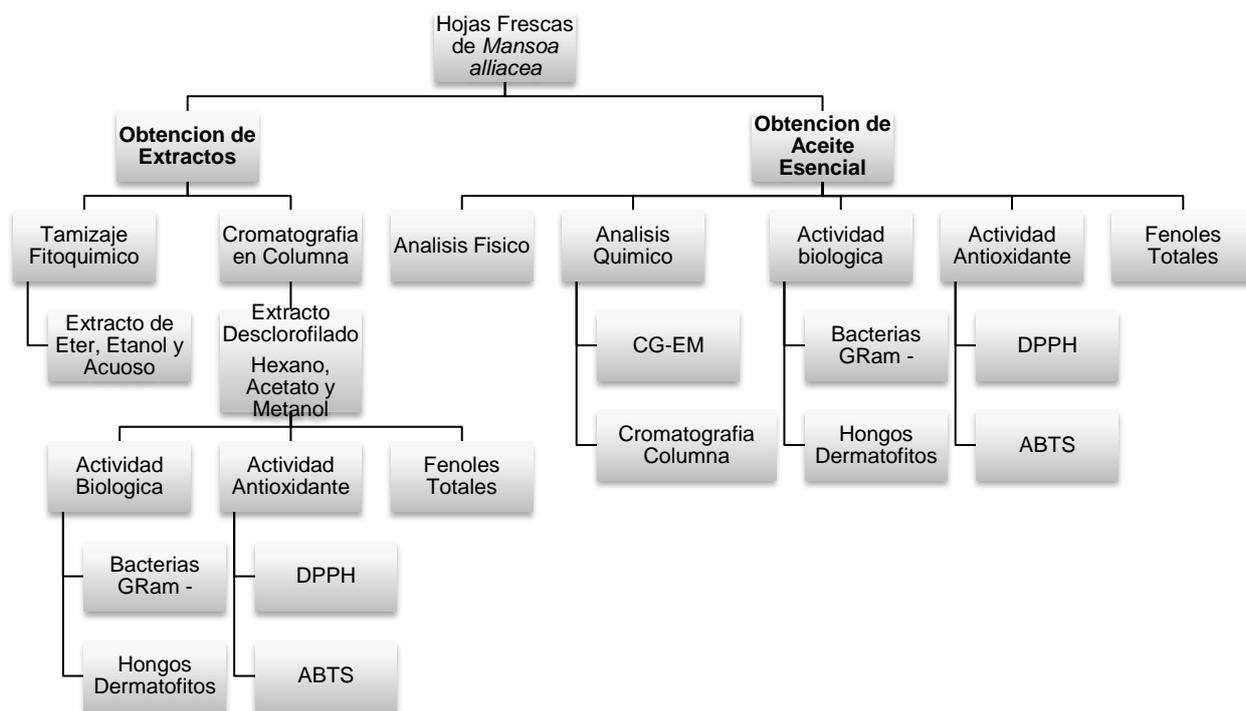


Figura 5. Esquema general de la metodología empleada para el análisis fitoquímico y de actividad biológica de la especie *Mansoa alliacea*

2.2.1. Recolección de la muestra.

La recolección de la muestra de la especie *Mansoa alliacea* (Lam.) A. H Gentry con voucher ECU20261 fue realizada en la Provincia de Napo, Cantón Arosemana Tola en la Parroquia Arosemana Tola en la localidad Santa Mónica, del propietario Sr Pedro Andy, con coordenadas geográficas 01.05.48,1S; 77.48.43,9 W, a una altitud de 474 m s.n.m. La clasificación taxonómica y morfológica de la especie se realizó en el Herbario Nacional de la Universidad Central del Ecuador.

Las hojas secas y trituradas llegaron al Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja en el mes de octubre del 2013.

2.2.2. Obtención de Extractos.

Las hojas secas y trituradas fueron sometidas a maceración dinámica con disolventes de polaridad creciente hexano, acetato de etilo y metanol durante cuatro horas, por triplicado y consecutivamente. Se utilizaron 500 g del material guardando una relación planta-disolvente de 1:10. Los extractos fueron obtenidos por filtración al vacío y concentrados a presión reducida y 30 °C, en rotaevaporador. Los extractos obtenidos fueron etiquetados de la

siguiente manera: extracto de Hexano (MAKH); extracto de AcOEt (MAKA); extracto de MeOH (MAKM), y finalmente se almacenaron a -10°C .

Se registraron los datos del peso para el cálculo del rendimiento total con respecto a la planta cuyo formula se detalla en el anexo 2.

2.2.3. Desclorofilación de Extractos.

Los extractos de Hex, AcOEt fueron sometidos a un proceso de desclorofilación, mediante cromatografía de reparto o extracción líquido-líquido, empleando una mezcla equivalente de Hex:(MeOH:H₂O). La mezcla de MeOH:H₂O fue en proporción 9:1. La porción libre de clorofilas se encuentra en la parte más polar. El extracto obtenido se decantó y evaporó a baja temperatura y presión reducida.

2.2.4. Fraccionamiento en Cromatografía en columna.

Para el fraccionamiento se empleó cromatografía en fase normal en columnas de vidrio, empleando gel de sílice como fase estacionaria en proporciones específicas con relación a la cantidad de muestra y como fase móvil un sistema de elución con disolventes de polaridad creciente (Hex, AcOEt y MeOH) para definir la mezcla de disolvente se analizaron las placas TLC de los extractos, observando el comportamiento de elución y polaridad de los compuestos. Se utilizó una bomba de presión media para un rápido y eficaz fraccionamiento en tiempos relativamente cortos. La evaporación de las fracciones se llevó a cabo utilizando un rotoevaporador a temperatura de 30°C y presión reducida.

2.2.5. Cromatografía en capa fina.

El análisis de los extractos así como el monitoreo del fraccionamiento se realizó mediante cromatografía de capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio cubiertas de silicagel 60 F₂₅₄. Los disolventes empleados para la fase móvil fueron Hex:AcOEt en proporciones definidas, y la visualización se realizó con una lámpara ultravioleta a 254 y 365 nm, y/o utilizando agente revelador H₂SO₄ 5% y Vainillina 1% (anexo 3).

2.2.6. Unión de fracciones.

Las fracciones obtenidas de los fraccionamientos en columna fueron unidas relacionando la altura de las manchas características de cada fracción, y la similitud visual que reflejaron ante luz UV (254-365nm). Se realizó cálculo del Factor de retención (RF) aplicando la fórmula descrita en el anexo 4.

2.2.7. Caracterización estructural de moléculas mediante Resonancia Magnética Nuclear.

El espectro de RNM de los compuestos de *M. alliacea*, fueron registrados en un equipo Varian N^o400-54 ASC a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C, usando CDCl₃. Se colocó una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en un disolvente deuterado en un tubo de vidrio que se sitúa dentro del campo magnético del equipo. El tubo con la muestra hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a la frecuencia, generando las gráficas correspondientes. Los desplazamiento químicos se expresaron en ppm, y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz (García, 2001).

2.2.8. Obtención del aceite esencial por el método de arrastre de vapor.

Se utilizó hojas frescas de *M. alliacea* durante dos horas para obtener aceite esencial por medio de destilación por arrastre de vapor. La muestra fue colocada en el destilador y sometido a fuego lo que generó una corriente de vapor de agua el mismo que circulo por todos los espacios llevando consigo el aceite esencial; la esencia arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa en el Florentino. Posteriormente el aceite esencial fue medido en una probeta, envasado en un frasco ámbar y almacenados en refrigeración a -4°C, hasta su posterior utilización.

2.2.8.1 Determinación de la humedad.

La humedad fue determinada calculando la pérdida de peso al secado de las hojas frescas de *M. alliacea* para lo cual se realizaron pequeños cortes de las hojas y se colocó aproximadamente 1g de la materia vegetal en cápsulas de porcelana previamente taradas, este proceso se realizó por triplicado. Las capsulas con el material fueron colocadas en la lámpara ULTRA X por 15 minutos y posteriormente colocadas en el desecador por 15 minutos . El proceso fue realizado tres veces hasta que su peso se mantuviera estable. Los resultados se reportaron de acuerdo a la fórmula descrita en el anexo 5.

2.2.8.2 Determinación del rendimiento del aceite esencial.

Para la determinación del rendimiento se tomó en cuenta el peso total de la materia vegetal destilada y la cantidad de aceite esencial obtenido. El resultado fue obtenido aplicando la fórmula descrita en el anexo 6.

2.2.9. Determinación de las propiedades físicas del aceite.

2.2.9.1. Densidad relativa.

La densidad del aceite se determinó según la norma ANFOR NFT75-111, el ensayo se realizó por triplicado. Para este análisis obtuvimos el peso vacío de un picnómetro de 1ml, posteriormente se coloca agua en el picnómetro y nuevamente se toma el peso y finalmente se coloca el aceite esencial. Para obtener el peso final el anexo 7 detalla los cálculos respectivos para determinar la densidad del aceite esencial.

2.2.9.2. Determinación del índice de refracción.

Cuando un rayo de luz pasa a través de una sustancia cambia su dirección de forma proporcional al índice de refracción de ésta, de acuerdo con la ley de Snell (Ortuño 2006). Se determinó el índice de refracción según la norma ANFOR NF 75-112 25 (anexo 8) con el refractómetro ABBE. Para ello se calibró el equipo con una gota de agua destilada, a 20 °C, posteriormente se colocó una gota del aceite esencial y se procedió a la lectura respectiva. Los resultados fueron expresados con cuatro cifras decimales.

2.2.10. Identificación de la composición química del aceite esencial.

Para la identificación de los compuestos del aceite esencial de la especie *Mansoa alliacea*, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM) y al detector de ionización de llama (CG-FID), obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos. Se emplearon las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil –metilpolisiloxano) y DB-5 FID.

Se empleó un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, y Detector de Ionización de Llama CG-FID acoplada a un Espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1. Cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. En la tabla 3 se describen los parámetros y características de la columna capilar DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano).

Tabla 3. Parámetros operacionales de la columna capilar utilizada.

DB-5MS	
COLUMNA	
Modelo	Agilent 122-5532 de 0,25mm*30m*0,25µm
Temperatura máxima	350 °C
Flujo	Constante
Flujo inicial	0,9 mL/seg
Presión inicial	44,8 kPa
Velocidad promedio	35 cm/seg
INYECTOR	
Modo	Split
Radio de partición	50:1
Temperatura	250°C
Gas portador	Helio
HORNO	
Temperatura inicial	50°C
Temperatura final	230°C
Gradiente de temperatura	2,5°C/min
DETECTOR	
Temperatura	250°C
Gas portador	Helio

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental.

2.2.10.1. Preparación de las muestras.

Diez microlitros del aceite esencial se disolvieron en 990 µl de CH₂Cl₂ grado HPLC para su inyección. De similar forma se preparó para hidrocarburos de C10-decano a C25-pentacosano, comercialmente conocidos como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, los mismos fueron inyectados en la columna DB- 5 MS esto con la finalidad de obtener los índices de Kovats de cada compuesto.

2.2.10.2. Análisis de los Espectros de Masa.

Los espectros de masa se obtienen convirtiendo los componentes de una muestra en una mezcla de iones gaseosos, que se mueven rápidamente en presencia de un campo magnético y se separan en función de su relación masa/carga (m/z). La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto

químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto. En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.2.10.3. Determinación de los Índices de Kóvats (IK).

Los Índices de Kóvats (IK) se calcularon en base a la comparación de los tiempos de retención de patrones de hidrocarburos a partir del C10 hasta C25 y los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial. Los valores obtenidos se determinaron mediante la fórmula descrita en el anexo 9. La identificación de los compuestos químicos se realizó mediante comparación de los espectros de masas de cada uno de los compuestos obtenidos con los de la librería WILEY 7n.I.

2.2.11. Evaluación de la Actividad Antibacteriana.

Para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC®8427, *Escherichia coli* ATCC®25922 y *Salmonella typhimurium* LT2; y 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, mientras que para la evaluación de la susceptibilidad fúngica se emplearon 3 organismos: *Trichophyton rubrum* ATCC®28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC®28185.

Los valores de CMI se determinaron por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de 5×10^5 ufc/mL en bacterias y 5×10^4 esporas/mL en hongos. La CMI se define como la concentración más baja de sustancia que previene el crecimiento, la cual se determina por la presencia de turbidez después de 24 horas para bacterias y hasta 96 horas para hongos esporulados. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se siguió el procedimiento de dilución doble seriada. La incubación se realizó a 37°C para bacterias y 28 °C para hongos. Se usó ampicilina y gentamicina para bacterias e itraconazol para hongos, como controles positivos y como control negativo se usó DMSO (CLSI. M7-A7; CLSI. M100-S21).

2.2.12. Actividad Antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos y aceite esencial de *M. alliacea* se evaluó mediante tres métodos espectrofotométricos que miden la capacidad de captación de radicales libres. Se utilizó trolox como referencia estándar para la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras. Los resultados fueron expresados en μMol equivalentes de trolox/mg de extracto.

2.2.12.1 Método ABTS.

Es un ensayo de decoloración aplicable tanto para antioxidantes de naturaleza lipofílica e hidrofílica, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes de plasma. El monocatión radical preformado 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) es generado por oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en la presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La influencia tanto de la concentración de antioxidante y la duración de la reacción en la inhibición del catión se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante. Se empleó la técnica de Arnao et al. (2001) con algunos ajustes descritos por Thaipong et al. (2006). En la figura 6 se describe detalladamente el método de ABTS empleado.

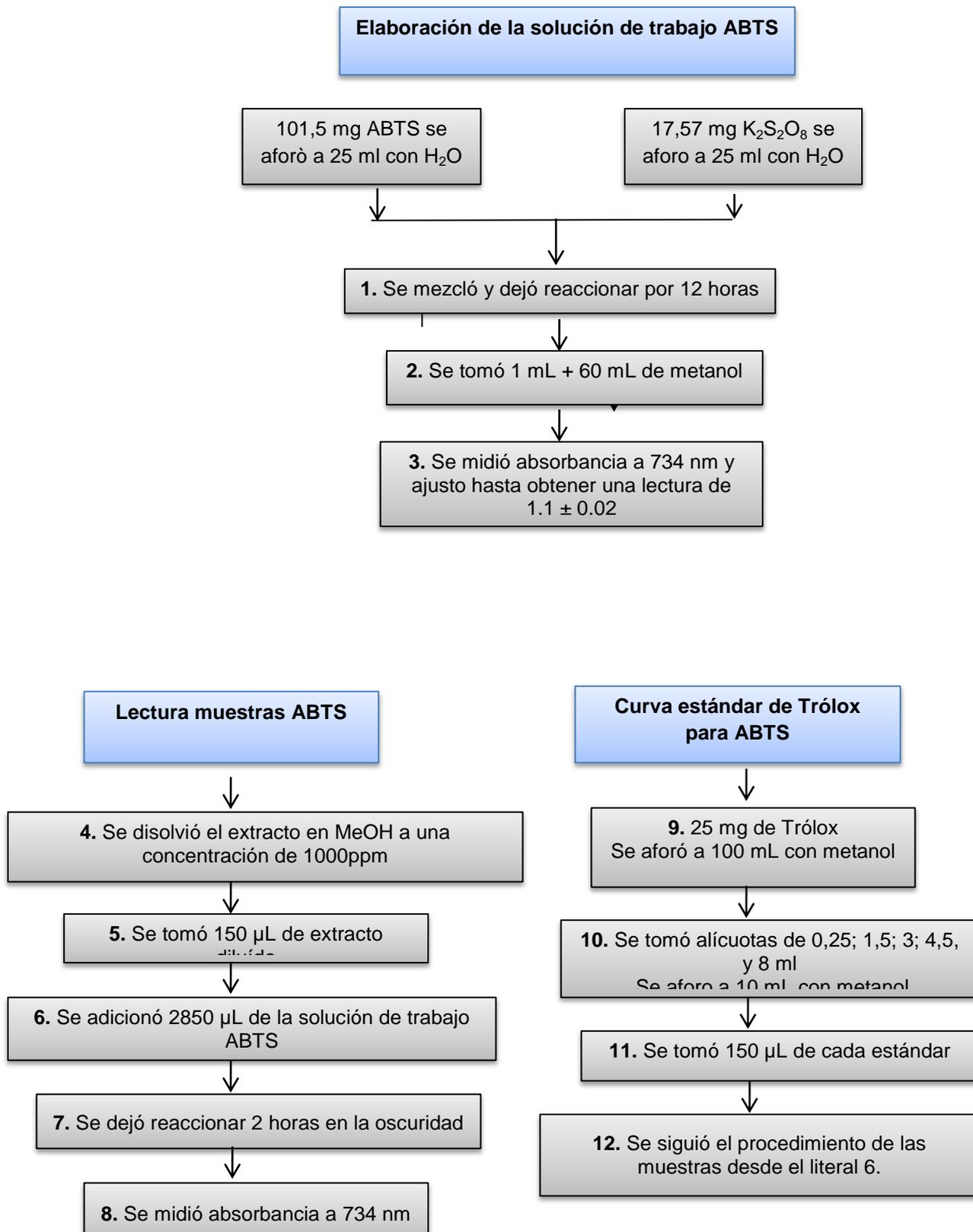


Figura 6. Esquema de la metodología empleada para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método ABTS.

Fuente: Thaipong et al. 2006.

2.2.14.2 Método DPPH.

El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones descritas por Thaipong et al. (2006), consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante siendo medida espectrofotométricamente a 515 nm. El detalle del procedimiento se esquematiza en la figura 7.

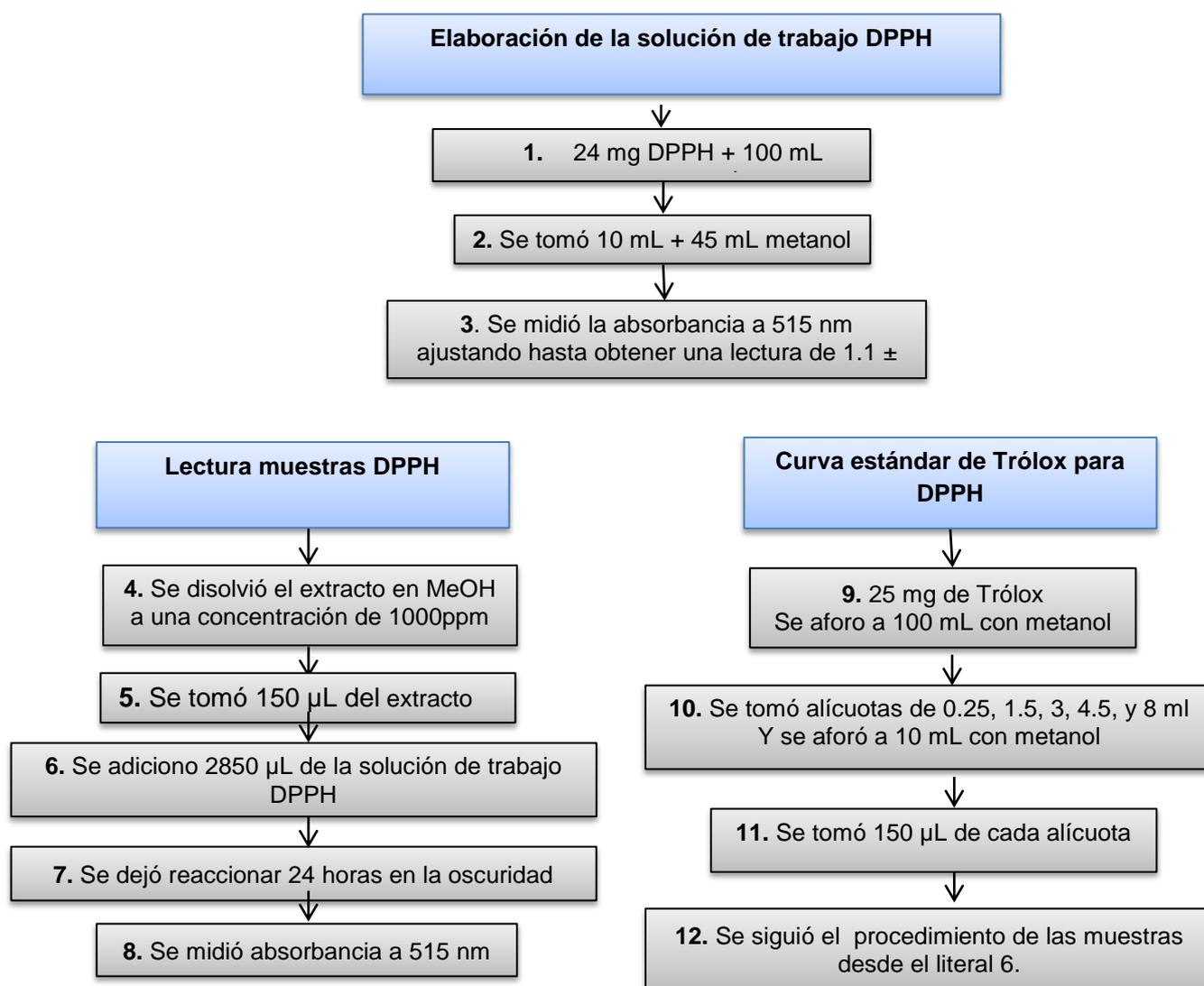


Figura 7. Esquema de la metodología empleada para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método DPPH.

Fuente: Thaipong et al. 2006

2.2.15. Evaluación de Fenoles Totales.

Este método nos permite conocer la concentración de compuestos fenólicos de una muestra en forma general. Se empleó ácido gálico como estándar (control positivo) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico. La ausencia de ácido gálico corresponde al control negativo. Se aplicó la metodología descrita por Folin-Ciocalteu, utilizando las modificaciones descritas por Kong et al. (2010b) y Thaipong et al. (2006). La metodología empleada de detalla en la figura 8.

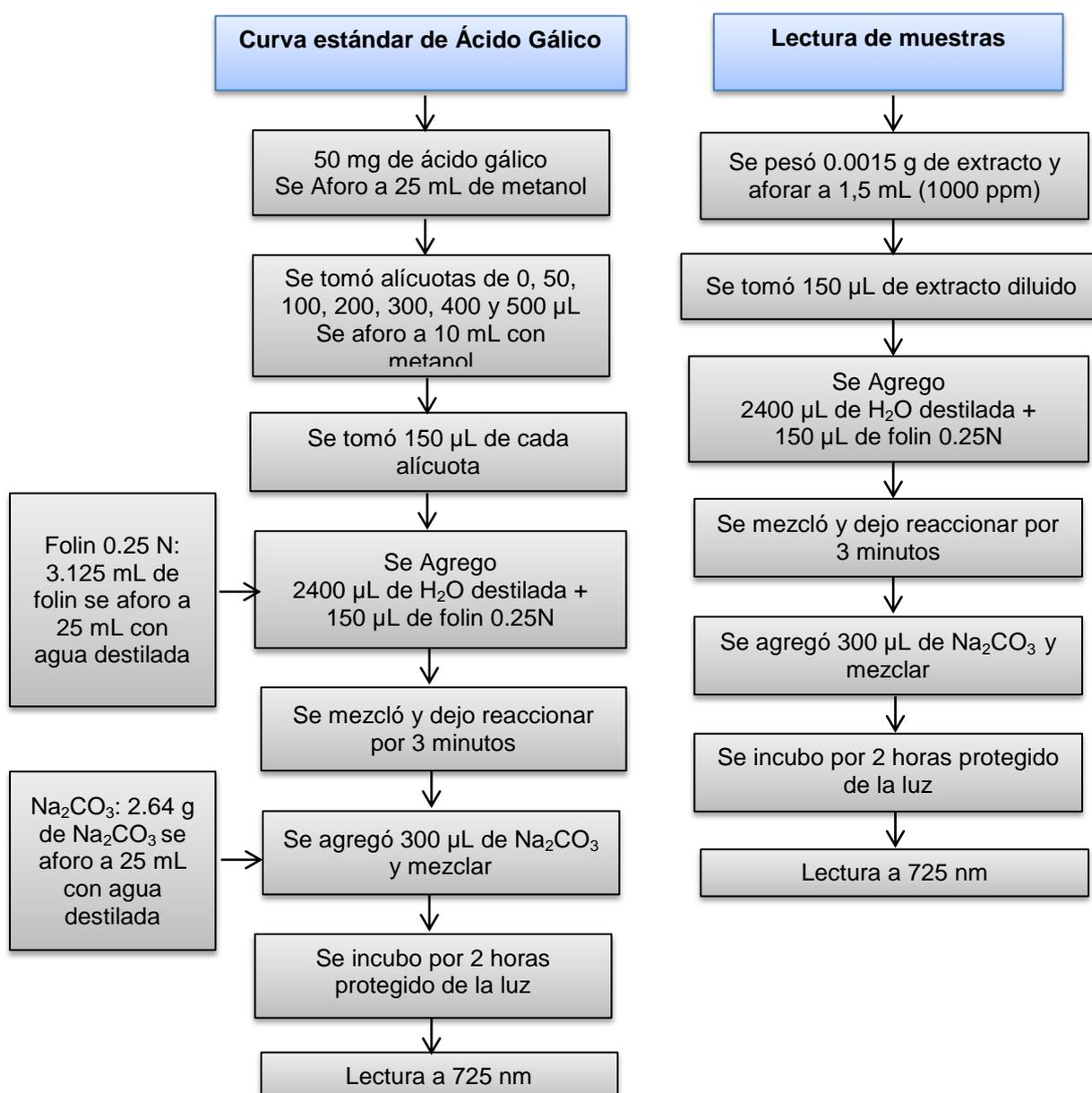


Figura 8. Metodología para la determinación de Fenoles Totales.
Fuente: Thaipong et al. 2006

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tamizaje fitoquímico de las cuatro especies vegetales

El tamizaje fitoquímico se realizó como un estudio preliminar para identificar los metabolitos presentes en las especies vegetales, siendo una guía para definir la especie sobre la que se realizaría su posterior estudio fitoquímico. Los resultados del tamizaje de las cuatro especies vegetales se detallan en las tablas 4, 5, 6 y 7.

Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico de Equisetum arvense

Extracto	Prueba	Resultado
ETEREO	SUDAN	+
	DRAGENDORFF	negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	Negativo
	LIBERMANN-BURCHARD	+
ETANOLICO	CATEQUINAS	+
	RESINAS	+
	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	Negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	+
	LIEBERMANN-BURCHARD	Negativo
	ESPUMA	Negativo
	CLORURO FÉRRICO	Azul
	NINHIDRINA	Negativo
	SHINODA	Negativo
	ANTOCIANIDINAS	+
	KEDDE	Negativo
ACUOSO	FEHLING	+
	DRAGENDORFF	+
	MAYER	Negativo
	WAGNER	+
	ESPUMA	Negativo
	CLORURO FERRICO	Rojo vino
	SHINODA	+
	MUCILAGOS	Negativo
	P. AMARGOS Y ASTRINGENTES	Amargo

Tabla 5. Resultados del tamizaje fitoquímico de *Costus spicatus*

Extracto	Prueba	Resultado
ETEREO	SUDAN	+
	DRAGENDORFF	+
	MAYER	+
	WAGNER	++
	BALJET	Negativo
	LIBERMANN-BURCHARD	+
ETANOLICO	CATEQUINAS	Negativo
	RESINAS	Negativo
	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	Negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	Negativo
	LIEBERMANN-BURCHARD	+
	ESPUMA	+
	CLORURO FÉRRICO	Negativo
	NINHIDRINA	Negativo
	SHINODA	Negativo
	ANTOCIANIDINAS	Negativo
	KEDDE	Negativo
ACUOSO	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	Negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	ESPUMA	+
	CLORURO FERRICO	Verde
	SHINODA	Negativo
	MUCILAGOS	Negativo
	P. AMARGOS Y ASTRINGENTES	Amargo

Tabla 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de *Petiveria alliacea*

Extracto	Prueba	Resultado
ETEREO	SUDAN	+
	DRAGENDORFF	+
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	Negativo
	LIBERMANN-BURCHARD	+
ETANOLICO	CATEQUINAS	+
	RESINAS	Negativo
	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	+
	MAYER	Negativo
	WAGNER	++
	BALJET	Negativo
	LIEBERMANN-BURCHARD	+
	ESPUMA	Negativo
	CLORURO FÉRRICO	Verde
	NINHIDRINA	+
	SHINODA	Negativo
	ANTOCIANIDINAS	Negativo
KEDDE	Negativo	
ACUOSO	FEHLING	+
	DRAGENDORFF	+++
	MAYER	-
	WAGNER	++
	ESPUMA	Negativo
	CLORURO FERRICO	Rojo vino
	SHINODA	+
	MUCILAGOS	Negativo
	P. AMARGOS Y ASTRINGENTES	Insipido

Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico de *Mansoa alliacea*.

Extracto	Prueba	Resultado
ETEREO	SUDAN	+
	DRAGENDORFF	Negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	Negativo
	LIBERMANN-BURCHARD	+
ETANOLICO	CATEQUINAS	+
	RESINAS	Negativo
	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	Negativo
	MAYER	Negativo
	WAGNER	Negativo
	BALJET	Negativo
	LIEBERMANN-BURCHARD	Negativo
	ESPUMA	+
	CLORURO FÉRRICO	Negativo
	NINHIDRINA	Negativo
	SHINODA	+
	ANTOCIANIDINAS	Negativo
KEDDE	Negativo	
ACUOSO	FEHLING	Negativo
	DRAGENDORFF	++
	MAYER	Negativo
	WAGNER	+
	ESPUMA	+
	CLORURO FERRRICO	Verde
	SHINODA	Negativo
	MUCILAGOS	Negativo
	P. AMARGOS Y ASTRINGENTES	Astringente

En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de la especie *Mansoa alliacea*, donde destacan los triterpenos, esteroides, aceites esenciales, catequinas, flavonoides, saponinas, taninos pirocatecólicos y alcaloides. Es importante mencionar que la presencia de alcaloides se detectó vagamente en el extracto acuoso. Los resultados alcanzados fueron similares a los trabajos realizados por Monserrate (2014), Ouaknin (2011) y Sipai et al (2013) quienes reportan la presencia de fenoles en el extracto metanólico; a diferencia del trabajo de Schultes & Raffauf (1990) donde se reporta la presencia significativa de alcaloides en el extracto etanólico.

3.2 Rendimiento y análisis de los extractos obtenidos de *Mansoa alliacea*.

Para extractos totales, el rendimiento se obtuvo de la comparación entre el peso de extracto obtenido y el peso de material vegetal empleado que fue de 500 g, mientras que para extractos desclorofilados, el rendimiento se obtuvo a partir del peso del extracto total versus el peso del extracto resultante luego del proceso. Los resultados se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de las hojas secas de *Mansoa alliacea*

		PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
EXTRACTO TOTAL	Hexano	9,733	1,94
	Acetato de etilo	14,8	2,26
	Metanol	58,24	11,64
DESCLOROFILADO	Hexano	1,37	15,22
	Acetato de etilo	6,53	72,55
	Metanol[†]	9,07	75,48

† Se realizó el proceso de desclorofilación a partir de 20 gramos de extracto total de MeOH, por lo que el rendimiento es de acorde a este valor.

Fuente: Autora.

Para el extracto metanólico el proceso de desclorofilación se realizó mediante extracción líquido-líquido, empleando una mezcla equivalente de Hex:(EtOH:H₂O) siendo la mezcla EtOH: H₂O en proporción 1:1. El extracto obtenido se decantó y evaporó a baja temperatura y presión reducida. Este sistema de repartición empleado fue favorable para el rendimiento del extracto metanólico en relación a los solventes y proporciones empleadas utilizadas en los extractos hexánico y de acetato de etilo.

Los porcentajes de rendimiento oscilan entre 1,94% - 11,64%, de los extractos totales de Hexano, AcOEt y metanol, siendo el extracto de metanol el que presenta mayor rendimiento. De lo observado en la tabla 8, gran parte del extracto obtenido, se pierde durante el proceso de desclorofilado, esto debido a la abundancia de clorofilas y sustancias de naturaleza oleosa como grasas o ceras y la presencia de pigmentos detectados en los extractos hexánico y de acetato de etilo.

La visualización de los compuestos presentes en los tres extractos totales se inspeccionó mediante CCF usando como fase móvil una mezcla de Hex:AcOEt en diferentes proporción es (1:1; 4:6 y 7:3); y finalmente fueron visualizadas ante luz UV (254 y 365nm) y reveladas con H₂SO₄ 5% - vainillina 1% (figura 9).

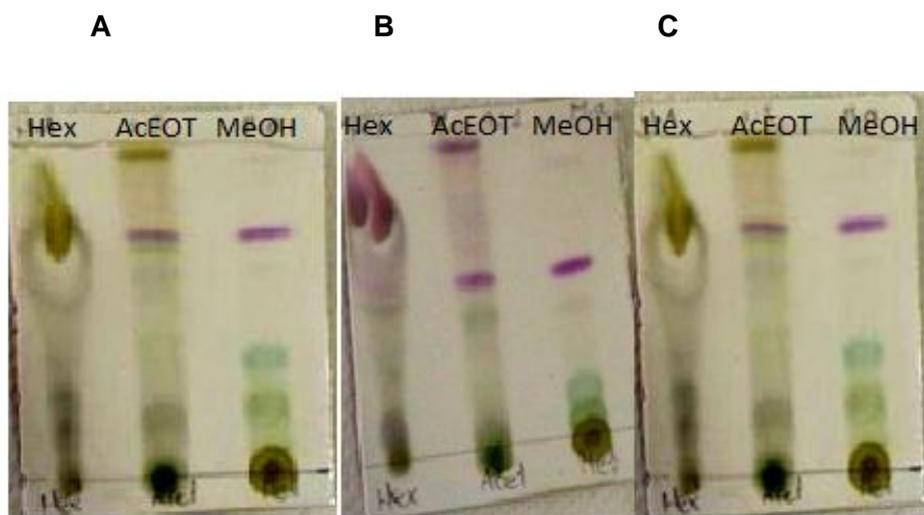


Figura 9. Placas de silica gel fase directa de los extractos de *Mansoa alliacea*. A) F. móvil: HexAcOEt 1:1(v/v); B) F. móvil: Hex-AcOEt 4:6 (v/v); C) F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v).
Fuente: Autora.

3.3. Fraccionamiento del extracto desclorofilado de hexano (MAKH)

Se realizó el fraccionamiento en la columna cromatografica de 1,20 g de extracto empleando como fase estacionaria gel de sílice 60mesh en una relación muestra-sílice 1:75. La columna se eluyó empleando una mezcla de disolventes en proporciones definidas (Hex-AcOEt 8:2; Hex-AcOEt 7:3; Hex-AcOEt 6:4; AcOEt 100% y MeOH 100%) y se recolectaron 26 fracciones de 20 ml cada una. La separación y visualización de los productos obtenidos se inspeccionó mediante CCF, usando como fase móvil una mezcla de Hex,-AcOEt en proporción 1:1 y visualizadas ante luz UV (254 y 365nm) (figura 10).

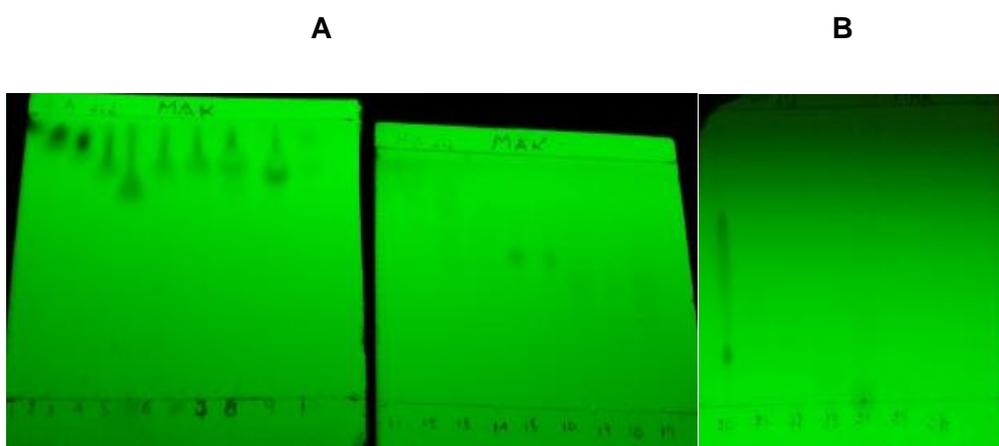


Figura 10. CCF en Hex,-AcOEt 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del extracto MAKH. Se muestran las placas observadas en luz UV 254 nm A) fracciones 1-19. B) fracciones 20-26.
Fuente: Autora.

Se realizó la unión de fracciones de acuerdo al comportamiento cromatográfico de los compuestos, obteniendo 11 subfracciones. En la tabla 9 se describen los pesos y denominación de las fracciones, las eluciones empleadas y la apariencia que presentaron.

Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico del extracto MAKH

FRACCION	DENOMINACION	PESO	POLARIDAD	ASPECTO
1-3	A	40 mg	Hex: AcOEt 8:2	oleoso-anaranjado
4-5	B	177 mg	Hex: AcOEt 8:2	oleoso- amarillo
6-8	C	171 mg	Hex: AcOEt 8:2	oleoso - amarillo
9-10	D	80 mg	Hex: AcOEt 7:3	Oleoso color verde
11-14	E	119 mg	Hex: AcOEt 7:3	Polvo amarillo
15-16	F	80 mg	Hex: AcOEt 7:3	Oleoso amarillo
17-19	G	50 mg	Hex: AcOEt 6:4	Polvo amarillo y blanco
20-23	H	40 mg	Hex: AcOEt 6:4	Polvo verde y blanco
24	I	249 mg	Acetato 100%	Oleoso negro
25	J	18mg	Metanol 100%	Oleoso negro
26	K	7 mg	Metanol 100%	Oleoso negro

Fuente: Autora.

La fracción **A** fue seleccionada para el análisis mediante CG-EM debido a la presencia de un compuesto de mayor abundancia de naturaleza apolar con un r_f de 0,9 en un sistema de elución Hex: AcOEt 1:1. Su coloración y aspecto de la fracción concordaban con los pigmentos reportados en *Mansoa alliacea* (Itokawa et al., 1992). El análisis se realizó un análisis en columna apolar DB5-MS (figura 11). De acuerdo a los espectros de masa y comparación con la base de datos Wiley 7n.l, se pudo determinar la estructura de 4 compuestos: ácido palmítico, ácido esteárico, cis-fitol, y stigmasta-3,5 diene. En la tabla 10 se detallan las características espectroscópicas de los compuestos.

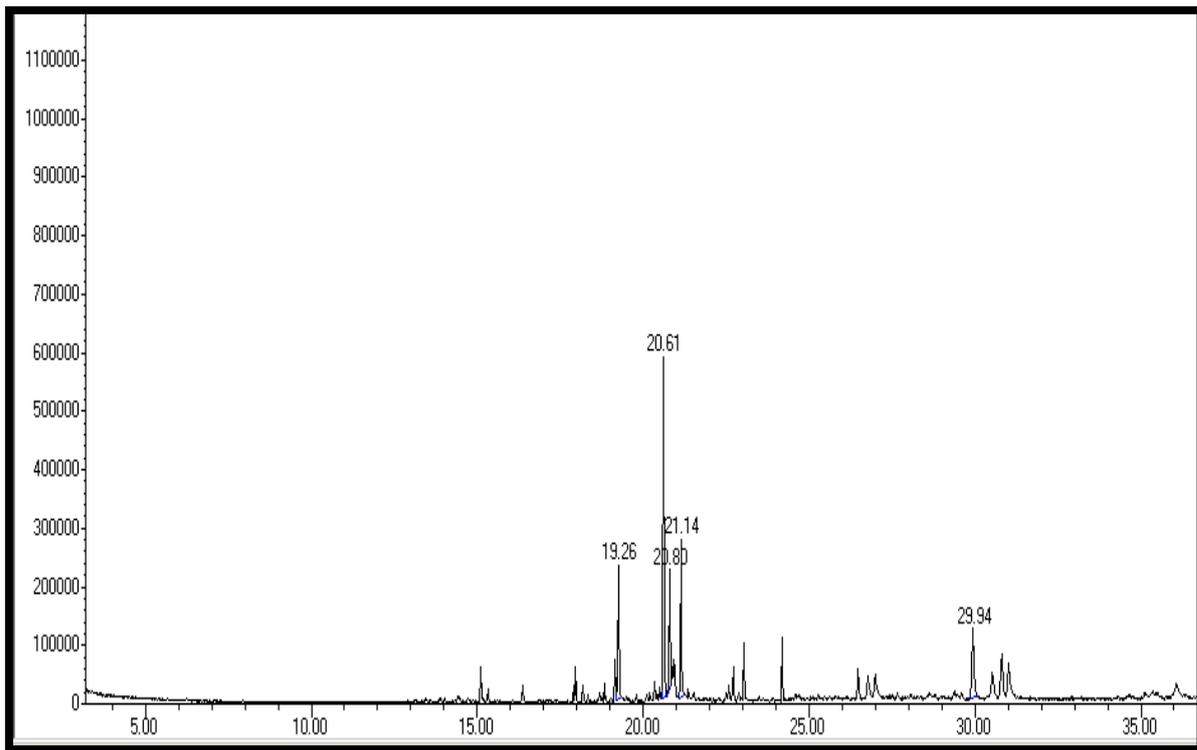


Figura 11. Cromatograma fracción MAKH-A en DB5-MS
Fuente: Autora.

Tabla 10. Compuestos identificados de MAKH-A por CG-MS en columna DB5-MS

Tiempo de retención	Compuestos	Cantidad relativa en DB5-5MS (%)	Peso molecular	Número de registro CAS
19,26	Ácido Palmítico	8,62	256,42	57-10-3
20,61	Cis- fitol	17,78	296,53	150-86-7
20,80	Ácido Esteárico	7,65	284,47	57-11-4
29,94	Stigmasta-3,5-diene	9,28	396,69	79897-80-6

Fuente: Wiley 7n.1 y NIST

Los compuestos identificados en la fracción A son de naturaleza hidrófoba y de alta polaridad, razón por la que se observó aparentemente un solo compuesto en las placas TLC y el fraccionamiento en columna no fue eficaz.

Estudios fitoquímicos sobre el género *Mansoa* reportan la presencia de β -sitosterol (Misra et al., 1995; López 2010; Itokawa et al., 1992) que por un proceso de deshidratación genera el stigmasta-3,5 diene (Cert et al. 2003).

Los dos ácidos grasos, palmítico y esteárico no han sido reportados para este género. La solubilidad en solventes apolares de los ácidos grasos es dada por la presencia de la cadena hidrocarbonada en su estructura (Graciani, 2006). El *cis*- fitol es la porción hidrófoba de la clorofila que le otorga el pigmento característico a la fracción analizada. Los isómeros del fitol no han sido reportados en el género sin embargo en las especies vegetales como *Thymus vulgaris* han sido reportados en los extractos hexánico y metanólico responsables de la actividad antibacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv (Jimenez et al. 2010). El estudio fitoquímico del aceite esencial *Scoparia dulcis* y *Solanum subinerme*, reportan la presencia del *trans*-fitol en un 8.29 y 36.00% respectivamente (Ordaz et al. 2011).

3.4. Fraccionamiento del extracto desclorofilado de AcoEt (MAKA)

El extracto desclorofilado de AcOEt se sometió al proceso de cromatografía empleando sílice-gel fase directa relación 1:50 (extracto: sílice) a partir de 6 g con un sistema de elución de disolventes en proporciones definidas, Hex: AcOEt (8:2; 7:3; 1:1) AcOEt 100% y MeOH 100%, recolectándose 6 fracciones de 500ml cada una. No se utilizó un gradiente continuo de solventes para el fraccionamiento inicial del extracto, sino más bien una elución escalonada para obtener grandes fracciones con compuestos de distinta polaridad para un segundo fraccionamiento más selectivo. Mediante CCF se inspeccionó los compuestos obtenidos (figura 12).

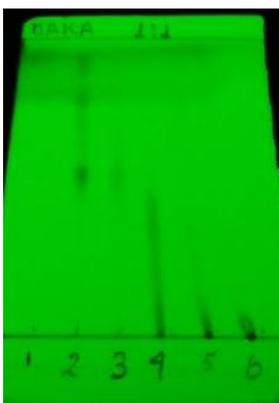


Figura 12. CCF en Hex,-AcOEt 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del extracto MAKA.
Fuente: Autora.

Considerando que en la fracción 2 (figura 13) se evidenció la presencia de un compuesto mayoritario en una proporción considerable, en el sistema de elución Hex:AcEOt 1:1, y que podría ser aislado fácilmente empleando una columna abierta en fase normal se procedió al fraccionamiento de esta subfracción etiquetada como MAKA F2. Se partió con 159 mg de muestra en una proporción 1:10 sílice-muestra y como disolventes de partida una mezcla de

Hex:AcEOt 8,5;1,5 en función del comportamiento cromatográfico demostrado en CCF. Se aplicó un sistema de elución Hex-AcOEt (8,5:1,5; 8:2; 7:3 y 6.5:3.5) en orden creciente de polaridad. Se recolectaron 355 fracciones de 2ml cada una obteniendo un fino fraccionamiento de compuestos. Las fracciones se monitorearon mediante CCF Hex: AcOEt (7:3), visualizadas ante luz UV (254 y 365 nm) y reveladas con H₂SO₄ - vainillina (figura 17).

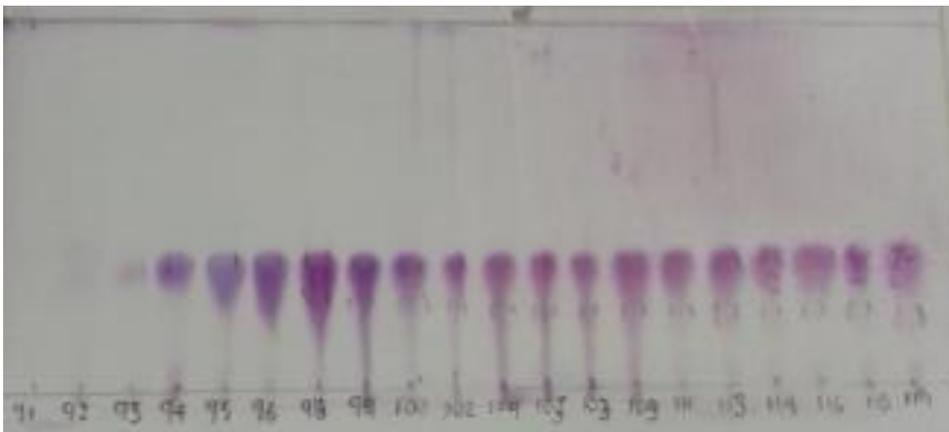


Figura 13. CCF en Hex,-AcOEt 7:3(v/v), de la corrida cromatográfica MAKAF2. Únicamente se muestran las fracciones 91-119 debido a que en ellas se visualizó la presencia de compuestos.

Fuente: Autora.

Finalmente se reunieron 8 subfracciones de acuerdo a su R_f (figura 14). En la tabla 11 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las muestras fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron.

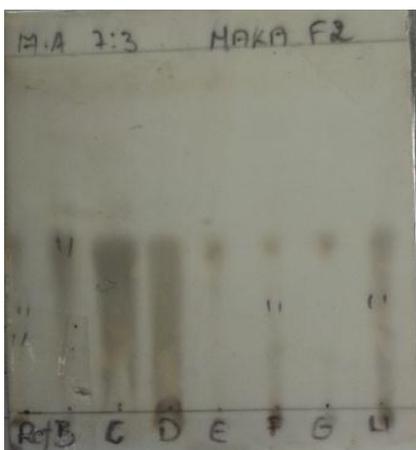


Figura 14. CCF en Hex-AcOEt 7:3(v/v), subfracciones de MAKAF2. Revelada con H₂SO₄ – vainillina.

Fuente: Autora.

Tabla 11. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción MAKА F2

FRACCION	DENOMINACION	PESO	POLARIDAD	ASPECTO
54-58	A	2 mg	Hex: AcOEt 8,5 :1,5	Cristales
93-96	B	4 mg	Hex: AcOEt 8:2	Polvo blanquecino
98-100	C	2 mg	Hex: AcOEt 8:2	Polvo blanquecino
101-119	D	7 mg	Hex: AcOEt 8:2	Polvo amarillo
120-170	E	3 mg	Hex: AcOEt 8:2	Polvo amarillo
179-190	F	1.6 mg	Hex: AcOEt 7:3	Polvo amarillo
220-280	G	9 mg	Hex: AcOEt 7:3	Polvo amarillo
284-350	H	7mg	Hex:AcOEt 6.5: 3.5	Polvo amarillo

Fuente: Autora.

3.4.1. Fracción MAKА-F2B.

El compuesto MAKА_F2-B es soluble en CHCl_3 (tabla 11), e insoluble en Hexano y MeOH., tiene un factor de retención (RF) de 0,4 en un sistema de elución Hex-AcOEt 7:3. En la figura 15 se observa el producto aislado observado en la luz UV a 254 nm.

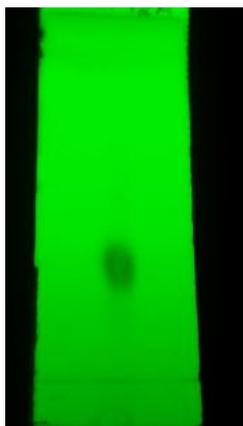


Figura 15. CCF fase directa en Hex -AcOEt 7:3(v/v) placa observada en placas luz UV 254 nm.

Fuente: Autora.

3.4.2. Caracterización Espectroscópica.

La caracterización del compuesto aislado fue determinada mediante los ensayos de ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY de Resonancia Magnética Nuclear y el espectro de masas.

El espectro de masas se obtuvo mediante la técnica ESI-TOF, y fue realizado en el Laboratorio de Química de la Universidad de Pavia- Italia. Se detectó una señal correspondiente al ión quasi-molecular $[\text{M}+\text{Na}]$ con un peso molecular de 480,07, por lo que la masa del compuesto se deduce para 457 g/mol consistente con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. En la figura 16 se muestra el espectro de masas correspondiente.

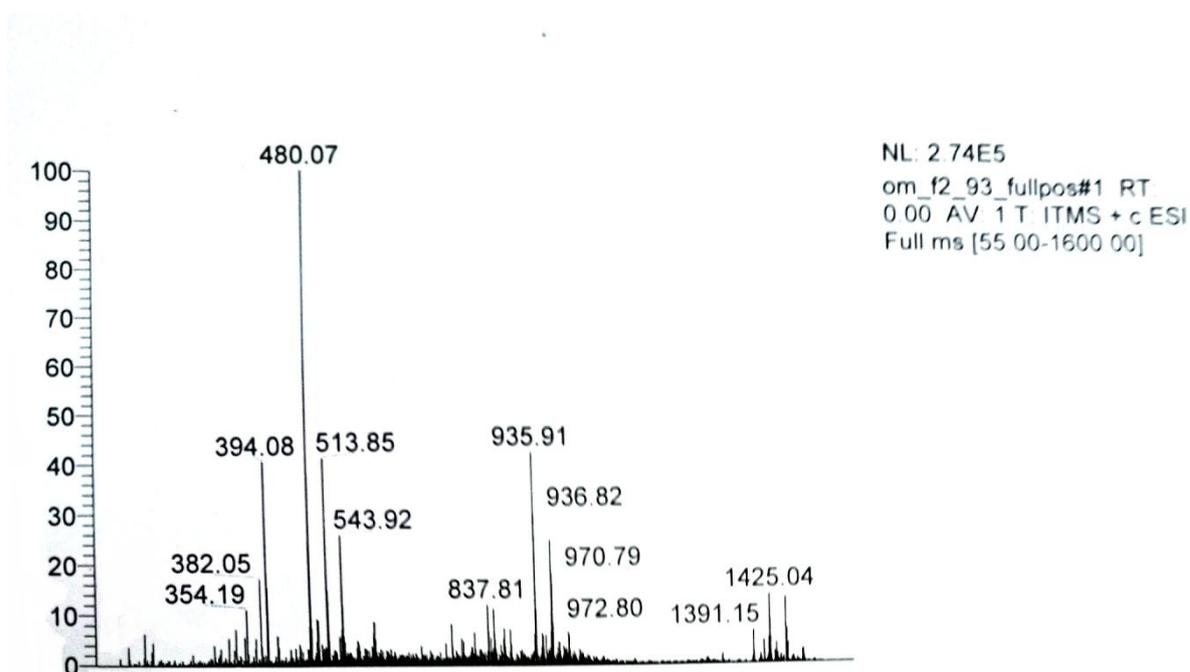


Figura 16. Espectro de masas ESI-TOF de la fracción MAKAF2-B.

El espectro de ^1H reveló señales características de un compuesto de naturaleza triterpénica destacándose las señales δ ppm: 5,28 (t, $J=3.6, 1\text{H}$); 3,21 (m, 1H) típico de un protón en alfa a oxígeno, 7 señales de grupos metilo en la región comprendida entre 0.7 y 1.2 ppm y un grupo de señales entre 1.2 y 2.1 correspondiente a los protones metilénicos.

En la tabla 12 se describen los datos espectrales obtenidos para la fracción MAKAF2B y los datos espectrales del trabajo de Werner et al. (2003) realizados sobre el triterpeno ácido oleanólico. Las señales entre los protones y sus carbonos correspondientes se asignaron mediante el experimento HSQC. Mediante el experimento HMBC confirmamos la posición de los diferentes carbonos obtenidos en el espectro de acuerdo a la nomenclatura dada para el ácido oleanólico. Los datos de protón y carbón obtenidos, el espectro de masas y la comparación con los datos del trabajo de Werner et al (2003) nos permitió confirmar que el

compuesto MAKAF2B correspondía al reportado por la literatura y fue asignado como ácido oleanólico (figura 17). Debido al solapamiento de señales en la región de los metilenos del espectro de protón de MAKAF2B y con una pureza del compuesto de aproximadamente 90%, algunas señales no se pudieron asignar, tal y como se evidencia en la tabla 12.

Tabla 12. Datos espectrales de protón y carbono de la fracción MAKAF2B y su comparación con el ácido oleanólico.

# C	MAKAF2B en Cloroformo-d		Ácido oleanólico en Piridina d5 [†]	
	¹³ C δppm	¹ H δppm (multiplicidad)	¹³ C δppm	¹ H δppm (multiplicidad)
1	38.5	0.89 1.57	30.9	1.02 1.57
2			28.1	1.82 1.82
3	79.1	3.22 dd	78.2	3.44 dd
4	38.9	-	39.4	-
5	55.3	0.72	55.9	0.88 d
6			18.8	1.58 1.39
7			33.4	1.53 1.39
8	39.4	-	39.8	-
9			48.2	1.71 tr
10			37.4	-
11	23.5	1.88 d	23.8	1.96 1.96
12	122.7	5.28 tr	122.6	5.49 s
13	143.7	-	144.8	-
14	41.7	-	42.2	-
15			28.4	1.22 2.19
16			23.8	2.12 tr 1.96
17			46.7	-
18	41.1	2.81 dd	42.1	3.30 dd
19	47.7	1.53	46.6	1.83 1.32
20	30.8	-	31.0	-
21			34.3	1.46
				1.23
22			33.2	1.82 2.04
23	28.2	0.98 s	28.8	1.24s
24	15.7	0.77s	16.5	1.02s
25	15.4	0.91 s	15.6	0.93s
26	17.2	0.75 s	17.5	1.04s
27	26.0	1.13 s	26.2	1.30s
28	182.8	--	180.0	-
29	33.1	0.90 s	33.4	0.97s
30	23.7	0.93 s	23.8	1.02s

[†] Datos tomados del trabajo de Werner et al. (2003)

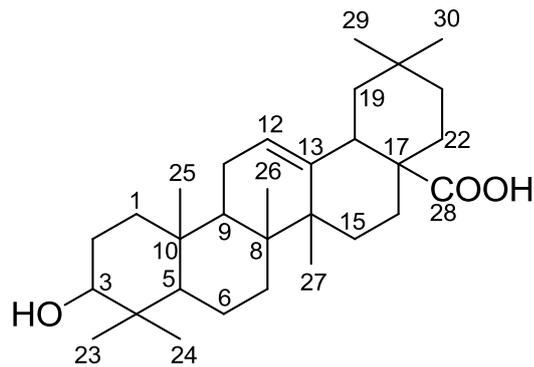


Figura 17. Ácido oleanólico.

El aislamiento del ácido oleanólico a partir del extracto de acetato de etilo de *Mansoa alliacea*, reportado en este estudio, coincide con el estudio realizado por Skelding G., et al (2012), sobre la misma especie, quien reporta el aislamiento de los estudios fitoquímicos realizados a partir de las hojas *Mansoa alliacea*. Dentro del género *Mansoa*, Adams (2007). reporta el compuesto triterpénico en la especie *Mansoa difficilis* a partir del extracto hexánico y metanólico. Peñafiel (1999) y Nieto (2010) afirma que el ácido oleanólico es un potente analgésico contra dolores reumáticos y artríticos, además posee propiedades protectoras vasculares frente a la arteriosclerosis y sus posibles complicaciones, debido a la estimulación de la prostaciclina, favoreciendo la dilatación de los vasos sanguíneos (Ruiz V & Martinez J 2009).

3.5. Aceite Esencial de *Mansoa alliacea*

3.5.1. Rendimiento.

Se obtuvieron 2,2 ml de aceite esencial a partir de 4Kg de hojas frescas, cuyo rendimiento corresponde al 0,05% concordando con el trabajo de Zoghbi et al (2002) cuya especie fue recolectada en el Municipio de Anantapur, estado de Pará-Brasil; en contraste con el trabajo de Olivera et al (2013) cuya especie vegetal fue recolectada en el bosque húmedo tropical del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), que reporta un rendimiento de 0,601% a partir de hojas frescas, siendo el reporte más alto de rendimiento para esta especie. La diferencia del rendimiento entre la misma especie se ve afectada por las condiciones agronómicas en que la especie fue cultivada, la época de recolección (Guzmán, 2004).

3.5.2. Determinación de la Humedad.

En la tabla 13 se detalla el promedio de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación por triplicado.

Tabla 13. Humedad de hojas frescas de *Mansoa alliacea*.

Repeticiones	Hm(%)	\bar{X}	Σ	CV
1	63,90	63,93%	0,03	0,01
2	63,95			
3	63,93			
\bar{X} : Promedio σ : Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación				

Fuente: Autora.

La humedad obtenida en nuestro estudio es muy similar al resultado obtenido en el trabajo anteriormente descrito (Oliveira et al, 2013), donde se reporta una humedad del 60,66%, con una desviación estándar de 1,041. El contenido de humedad de referencia en hojas frescas es del 60% al 80% (Sharapin N. 2000) ajustándose nuestro trabajo a los valores estándares de referencia.

3.5.3. Propiedades Físicas del Aceite Esencial.

El aceite esencial de *M. alliacea* es un líquido viscoso, presenta una coloración verdosa y olor característico a ajo.

3.5.3.1. Densidad.

La tabla 14 detalla la densidad del aceite, desviación estándar y coeficiente de variación. La densidad fue obtenida a partir de tres experimentos independientes.

Tabla 14. Densidad del aceite esencial de *Mansoa alliacea*.

Repeticiones	Densidad	\bar{X}	σ	CV
1	1.09	1.09	0.02	0.01
2	1.07			
3	1.1			
\bar{X} : Promedio σ : Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación				

Fuente: Autora

La densidad promedio del aceite es de 1,09 g/cm³, se ajusta a los rangos de referencia para aceites esenciales que se encuentra de 0,84 a 1,18. Sin embargo el trabajo de Oliveira

(2013) reportó una densidad de 0,8 para *M. alliacea* recolectada en el bosque húmedo tropical del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), siendo factores agronómicos, época de recolección o pequeños cambios genéticos los que determinan la variación existente dentro de la misma especie vegetal (Güenther, 1948).

3.5.3.2 Índice de refracción.

Los índices de refracción se muestran en la tabla 15 la desviación estándar y coeficiente de variación. Los resultados fueron obtenidos a 20 °C a partir de tres experimentos independientes

Tabla 15. Índice de refracción

Repeticiones	Índice de refracción	\bar{X}	σ	CV
1	1,334	1,334	0,0	0,0
2	1,334			
3	1,334			
\bar{X} : Promedio σ : Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación				

Fuente: Autora.

Los aceites esenciales presentan un poder rotatorio particular, debido a que algunos de sus compuestos químicos son ópticamente activos. El valor del índice de refracción para la mayoría de aceites esenciales varía entre 1.43 y 1.61 a 20°C. Oliveira (2013) reporta un índice de refracción de 1,56 sin mencionar la temperatura en que fue medido el aceite esencial; la diferencia de resultados se puede deber a la presencia de impurezas en el aceite o la temperatura en la que fueron medidos.

3.5.4. Composición química del aceite esencial.

La determinación de la composición química se realizó mediante CG-EM utilizando la columna capilar apolar DB-5MS, basándose en la comparación de los espectros de masa con los espectros de la base de datos Wiley 7n.l y adicionalmente comparando los índices de Kóvats calculados, de aquellos reportados en el libro de Adams (2007), y bases de datos como el NIST.

Del análisis de la integración de picos en el cromatograma obtenido, se reporta un total de 5 compuestos, que corresponde al 97,02% del total de compuestos presentes en el aceite esencial; el cromatograma se ilustra en la figura 18.

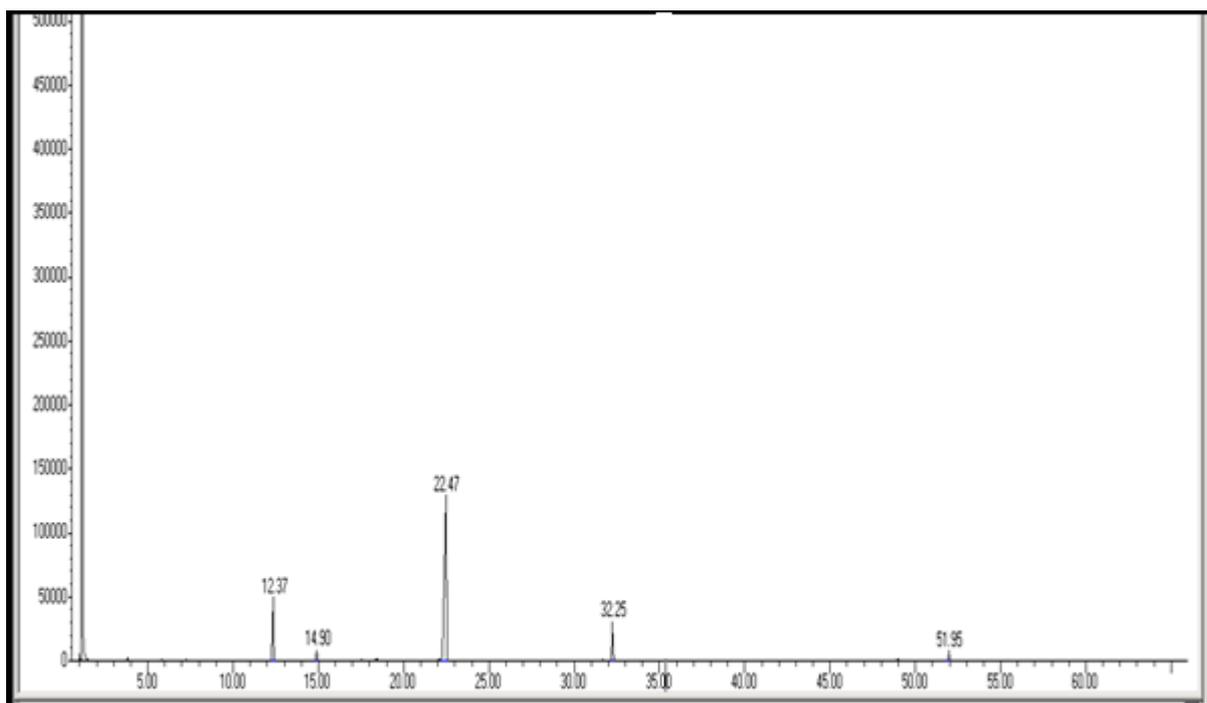


Figura 18. Cromatograma del aceite esencial de *M. alliacea* en DB-5MS.

En la tabla 16 se indican los índices de Kovats calculados y reportados en literatura y el porcentaje relativo de cada compuesto obtenidos en la columna DB5-MS.

Tabla 16. Composición química del aceite esencial de *M. alliacea*

Tiempo Retención	Compuestos	DB-5MS		% Cantidad Relativa DB-5MS
		IKB	IKref	
9,01	Disulfuro, di 2-propenil	1077	1082 ^a	13,28
12,37	Trisulfuro, metil-2-propenil	1133	1142 ^a	2,02
14,90	3 Vinil-1,2-ditiociclohex-5-ene	1 210	1197 ^b	0,51
22,47	Dialil Trisulfuro [†]	1300	1320	70,18
32,25	Dialil Tetrasulfuro	1534	1540 ^c	9,22
51,95	Fitol	2107	2107 ^d	1,99
TOTAL				97,02

IKB: Índice de Kovats determinados experimentalmente
 IKref: Índice de Kovats de acuerdo a referencias bibliográficas ^aref., ^bref. ^cref. ^dref. Anexo 10
[†] Dialil trisulfuro: no fue identificado por CG-EM sino por análisis de RMN luego de extracción cromatográfica.

Fuente: Autora.

3.5.5. Separación del compuesto mayoritario del aceite esencial mediante cromatografía en columna.

El compuesto mayoritario con un porcentaje de 70,18% no fue identificado mediante CG-EM ya que la base de datos reportó resultados erróneos para su identificación química. Por tal razón, se realizó el fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en columna utilizando sílice RP-18. Para facilidad de manejo al aceite esencial se lo denominó KS.

Se disolvió 500 µl de aceite esencial en una alícuota de hexano para la siembra en 500g de sílice manteniendo la relación 1:100 (muestra-sílice). Los compuestos eluyeron en proporciones definidas de polaridad decreciente MeOH:H₂O (7:3; 8:2, 9:1) y MeOH 100%. Se recolectaron 200 fracciones de 5 ml cada una. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas a través de TLC fase inversa (figura 19).

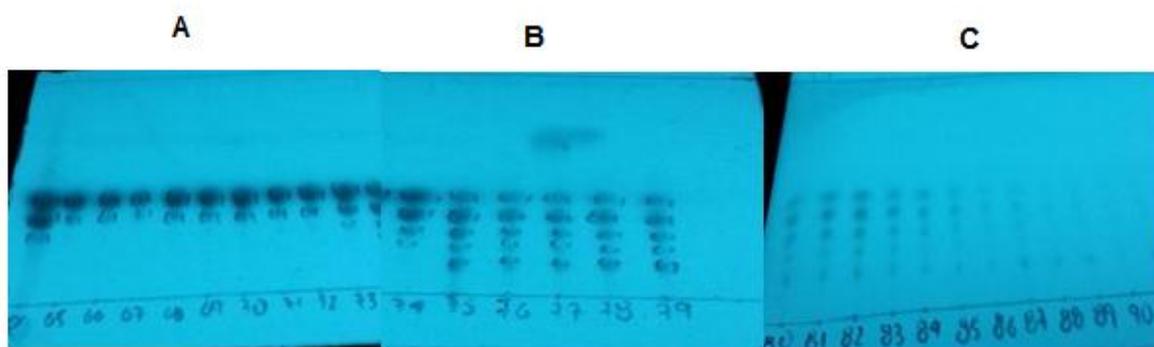


Figura 19. CCF MeOH-H₂O en 1:1 (v/v), de la corrida cromatográfica del aceite esencial. Se muestran las placas observadas en luz UV 254 nm A) fracciones 65-73. B) fracciones 74-79. C) fracciones 80-90.

Fuente: Autora.

Para la eliminación de agua de las fracciones se realizó un procedimiento de bipartición utilizando una proporción equivalente de hexano y la fracción obtenida durante el fraccionamiento. En un embudo de decantación se separa la porción metanólica de la hexánica. El proceso se realizó por triplicado asegurando extraer completamente los compuestos orgánicos de la fracción. Para asegurar una eliminación total de agua en la fracción se adicionó sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) en la porción hexánica recolectada. Se dejó reposar durante 30 minutos para finalmente filtrar y proceder a rotoevaporar a presión reducida y baja temperatura.

En la tabla 17 se exponen las proporciones de disolventes empleados en que las muestras fueron eluidas, así como también la apariencia que presentaron las fracciones.

Tabla 17. Fraccionamiento cromatográfico del aceite esencial de *M. alliacea*

FRACCION	PESO	POLARIDAD	ASPECTO
50-54	2 mg	MeOH-H2O 7:3	Aceite
55-58	11 mg	MeOH-H2O 7:3	Aceite
59-63	54 mg	MeOH-H2O 8:2	Aceite
65-73	78mg	MeOH-H2O 8:2	Aceite
74-100	170mg	MeOH-H2O 8:2	Cristales
101-110	85 mg	MeOH-H2O 9:1	Aceite
180-200	20 mg	MeOH 100%	Aceite

Fuente: Autora

3.5.5.1. Fracción KS 65-73

Del fraccionamiento del aceite esencial se aisló el compuesto mayoritario de naturaleza oleosa color amarillo claro y olor característico a ajo, sabor picante. Con un rendimiento del 33.7% aproximadamente, recalando que en las fracciones siguientes se encontraba el compuesto de interés, dentro de una mezcla de compuestos en el aceite esencial.

La caracterización espectroscópica se realizó mediante Resonancia Magnética nuclear de protón empleando CDCl_3 . En la figura 20 se ilustra el espectro de protón junto con la molécula y su correcta asignación, basada en el desplazamiento químico exhibido por las señales y las integrales encontradas.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3). δ ppm. 3.51 (4H, m); 5.22 (4H, m); 5.89 (2H, m)

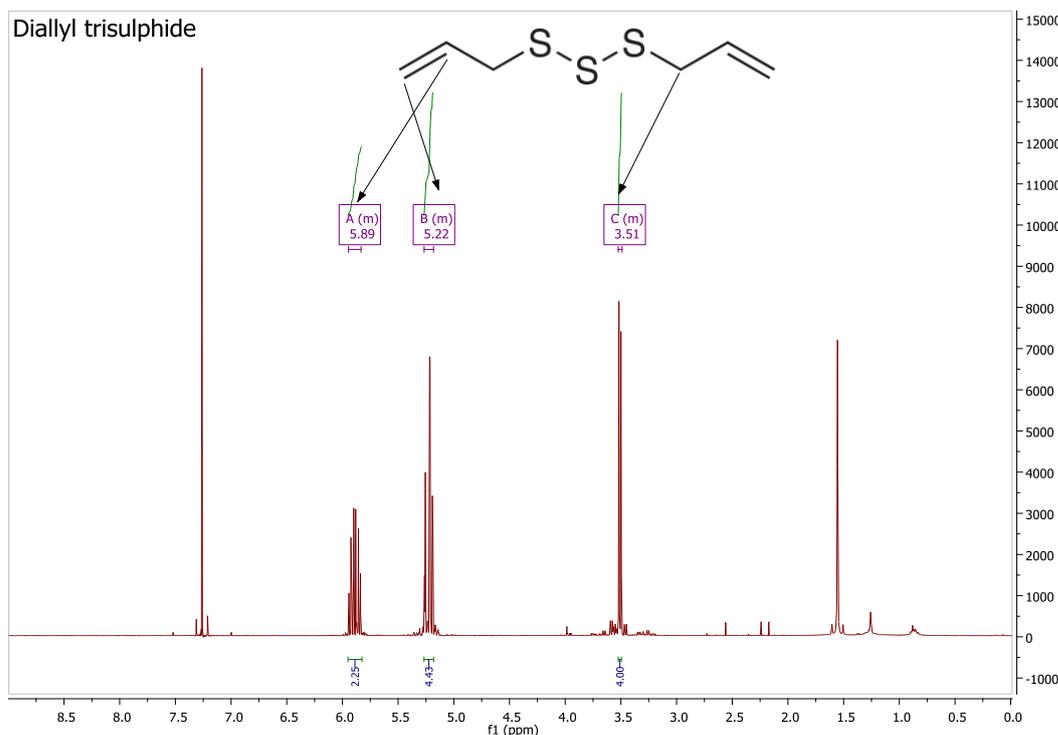


Figura 20. Análisis de resonancia magnética nuclear de protón de la fracción KS 65-73

Fuente: Autora.

Para obtener el peso de la molécula aislada se realizó su análisis mediante CG-EM utilizando la columna capilar apolar DB-5MS, el espectro se visualiza en la figura 21 donde se aprecia que el ión molecular tiene un peso de 178 g/mol.

Library Searched : C:\DATABASE\wiley7n.l
Quality : 58
ID : Trisulfide, di-2-propenyl \$\$ Allyl trisulfide \$\$ Diallyl trisulfide

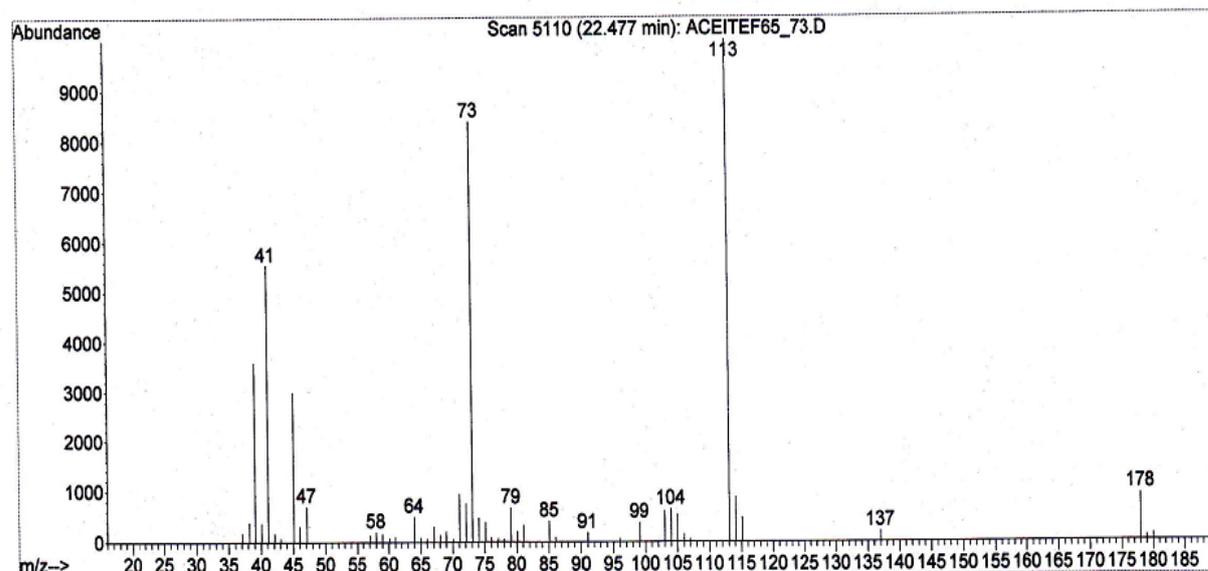


Figura 21. Cromatograma de Diallyl Trisulfide.

Fuente: Autora.

El peso molecular del compuesto de 178,34 g/mol resultó consistente con la fórmula $C_6H_{10}S_3$ y se le asignó el nombre dialil trisulfuro siendo el compuesto mayoritario que le otorga el olor a ajo característico de la planta. De acuerdo a trabajos similares sobre el aceite esencial de *M. alliacea* en diferentes zonas geográficas, dialil trisulfuro es el compuesto mayoritario. Oliveira et al. (2013) en su estudio sobre *M. alliacea* recolectada en Perú, reporta un 67,94% del compuesto en el aceite esencial; mientras que en Brazil, Zoghbi et al (2002) reporta el 58,2%. Estos resultados difieren de los encontrados por Zoghbi et al., (1984) durante su estudio sobre la planta recolectada en la india, donde el porcentaje del compuesto representa el 30,55%.

Del aceite esencial se identificó 4 compuestos sulfurados que además de otorgarle a la especie sus propiedades organolépticas se ha reportado que los compuestos sulfurados son potentes anticancerígenos inhibiendo células tumorales de colon, mama, piel, gástricas (Seki, 2008). Hosono et al. (2005) afirma que el compuesto dialil trisulfuro el más potente entre ellos, que de acuerdo a su estudio molecular en células de colon comprobó que el compuesto sulfurado unido a proteínas específicas como la β -tubulina, forman complejos capaces de detener el ciclo celular y la apoptosis

sucesiva (S-allilmercaptocisteína), siendo de esta manera el responsable de un importante efecto anticancerígeno.

3.6. Actividad Antibacteriana y Antifúngica

La actividad biológica de los extractos y aceite esencial se analizó por el método de microdilución en caldo con los microorganismos detallados en el apartado 2.2.13. De acuerdo a Holetz et al., (2002), se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500 µg/mL moderada, de 500 a 1000 µg/mL mala, y >1000 µg/mL nula. En la tabla 18 se detalla los resultados de la actividad biológica.

Tabla 18. Actividad biológica de los extractos y aceites esencial de *Mansoa alliacea*

Tipo de Extracto	M.O sensible	CMI (µg/ml)	Control (+)	Control (-)
Etéreo	Ef	500	Gentamicina 0,78 µg/mL Ampicilina Ef. St. 3,125 µg/ml	DMSO 5%
Acuoso	-	-		
Etanólico	-	-		
Hexánico	Ef	1000		
AcOEt	Ef	500		
MeOH	-	-		
Aceite Esencial				
Dialil Trisulfuro	Ef Sa	2500		

Ef: *Enterococcus faecalis*,
S.a. *Staphylococcus aureus*

Fuente: Autora

Los resultados indicaron que el extracto etéreo y de Acetato de etilo presentó actividad moderada con 500 µg/ml frente a *Enterococcus faecalis*. Estudios sobre el aceite esencial de *M. alliacea* reportan actividad a concentraciones de 10 mg/mL y 20 mg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 6535 y *Bacillus subtilis* ATCC 6638 respectivamente. (Oliveira et al. 2013).

3.7. Actividad antioxidante.

Mediante los ensayos ABTS, DPPH, y Fenoles Totales de los extractos y aceite esencial se evaluó la capacidad de captación de radicales libres, siendo el extracto hexánico el de mayor actividad con $0,005 \pm 0,00$ µMol Trolox/g planta). La baja capacidad antioxidante de la planta puede deberse a la ausencia o bajo contenido de compuestos fenólicos presentes en la planta, tal y como lo demuestra el ensayo de fenoles totales (Tabla 19).

Tabla 19. Actividad antioxidante de los diferentes extractos y el aceite esencial obtenidos de *M. alliacea*

Extracción	ABTS	DPPH (uMol Trolox/g planta)	FENOLESTOTALES (mg ác. Galico/g planta)
Hexano	0,005±0,00	0,01± 0,00	0,00±0,00
Acetato de etilo	0,001±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
Metanol	0,003±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
Aceite Esencial	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

CONCLUSIONES

De acuerdo al tamizaje fitoquímico realizado podemos concluir que no existe gran variabilidad de compuestos químicos presentes en la especie, la mayoría de ellos se encuentra en el extracto acuoso destacándose los triterpenos, esteroides, aceites esenciales, catequinas, flavonoides, saponinas, taninos pirocatecólicos y alcaloides, ajustándose al perfil químico del género *Mansoa*.

El extracto hexánico y de acetato de etilo mostraron compuestos muy similares revelados tanto en las CCF como en los espectros de RMN, siendo el extracto de acetato de etilo el que presento más rendimiento, siendo favorable para un mejor fraccionamiento y obtención de metabolitos secundarios.

Del fraccionamiento y purificación del extracto desclorofilado de Acetato de Etilo se aisló un triterpeno pentacíclico denominado ácido oleanólico; un compuesto de alta polaridad y bajo rendimiento con respecto al extracto.

La fracción volátil de *M. alliacea* se obtuvo mediante hidrodestilación y la identificación de sus compuestos mediante CG-EM en la columna DB-5MS. Se determinó un total de seis compuestos los mismos que representan el 97.2%, la mayoría son compuestos sulfurados que le otorgan propiedades organolépticas de olor y sabor características de la especie.

El compuesto mayoritario del aceite esencial no fue posible identificarlo mediante el método utilizado en CG-EM, presentando problemas de coincidencia de los índices de Kovats obtenidos con los de la librería Wiley 7n.l y la base de datos NIST 2011. Para su identificación fue necesario un análisis mediante RMN para determinar su estructura química y relacionarla con el peso molecular, obteniendo como resultado el compuesto denominado Diallil Trisulfuro.

La actividad biológica de los extractos y aceite esencial no presentaron resultados favorables frente a las cepas evaluadas y concentraciones empleadas, sin embargo no se descarta su actividad biológica puesto que en literatura se reporta resultados importantes a concentraciones mayores y diversas cepas de microorganismos.

La evaluación de actividad antioxidante de los extractos y aceite esencial no registraron datos significativos como para otorgarle esta característica a la especie vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. (2007). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th edn. Ed. Allured Publishing Corp. Carol Stream.
- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Pub. Corp.: Carol Stream.
- Andrews J. (2001). "Determination of Minimum Inhibitory Concentration", J Antimicrob Chemother, Vol. 48(31), pp. 5.
- Antolovich, M; Prenzler, P; Robards, K; Ryan, D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. The Analyst critical review. 125(2000): 989-1009.
- Araujo-Murakami A., Zenteno, F. (2006). Bosques de los Andes orientales de Bolivia y sus especies útiles. Moraes R., B. Ollgaard, LP Kvist, F. Y H. Bislev. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 146-161.
- Arévalo, G. 1994. Medicina Indígena. Las plantas Medicinales y su Beneficio en la Salud. Shipibo-Conibo", Editorial AIDSESEP, Lima, Perú, 1994. 354 pp.
- Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry. 73(1): 239-244.
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Becerra, M. 2014. "Costumbres y prácticas que utilizan los agentes de la medicina ancestral y su relación en la salud de los moradores, en la parroquia chinga recinto chigüe de la provincia de esmeraldas del año 2014. Pontificia universidad católica del ecuador". Esmeraldas- Ecuador.
- Berg, M. (1993). Plantas medicinales da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2nd edición. Belém: Museu Paraense
- Buitrón, X. (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. Traffic Internacional. Cambridge. 101 p.
- Brand-Williams, W; Cuvelier, M ; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 28(1995): 25-30.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2^a Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
- Castañeda, C; Ramos, L ; Ibáñez, V. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. 8(2008): 56-72.

Cert , A. Lanzon, A. Carelli, A. Albi, T. 2003. Formation of stigmasta-3,5-diene in vegetable oils. Food Chemistry. Volume 49, Issue 3, 1994, Pages 287–293.

Cerón, C. (1993). Etnobotánica del Ecuador. Ediciones Abya - Ayala. Quito, Ecuador. Pp 197.

Cerutti, M., Neumayer, F . 2004. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. vol 7, N 102. pp149-155.

CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute). 2002. Method M38-A, Wayner Ed., 22: 1-27.

CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute). 2006. Method of dilution Antimicrobial Susceptibility Test for bacteria that grow aerobically, approved estándar- seventh edition. Method M7-A7. Vol 26 N°2 p 1-45.

DeFilipps R, Maina S, Crepin J 2007. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/MedPlantsGui1.pdf>. p. 52, accedido en enero 2015.

Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt R., & Santa M.D. 2011. Resonancia magnética nuclear de proton: Aplicación en Química Orgánica”. Madrid- España: Instituto de Química Medica.

Fandohan, P.; Gbenou, J. D.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W. F. O.; Wingfield, M. J., 2004, Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin Contamination in Corn. J. Agric. Food Chem. (52), 6824-6829.

Friebolin, H. 2005. Basic One and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 4 ed. Weinheim: Wiley-VCH. 406.

García A. 2001. Determinación de estructuras por métodos espectroscópicos. Memorias Curso UANL.

Graciani C (2006). Los aceites y grasas: composición y propiedades. AMV Ed. y Mundi-Prensa, Madrid; p. 171.

Güenther, E. The Essential Oils. Volumen I: History – Origin in plants production – Analysis, Litton Educational, New York, 1948, pp.: 241–244.

Gutiérrez, M., Droguet , M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Cataluña- España.

Guzmán S, Cardozo R, García V (2004). Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Brittony Wilson, Guillermo de Ockham. Vol.: 7: 201-215.

Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Biological activity of species used in the Brazilian folk medicine. MemInst Oswaldo Cruz, 97. 1027-31.

Hosono ,T; Fukao, T; Ogihara, J; Ito, Y; Shiba, H; Seki, T; Ariga, T. (2005) Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of β -tubulin. J Biol Chem. 280:41487-93.

Itokawa H, Matsumoto K, Morita H, Takeya K 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. Phytochemistry 31: 1061-1062.

Jiménez M; Cornejo, J; León, R. (2010). Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicrobianos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. (41) 22-29.

Kong, K; Ismail, A; Tan, S; Murthy, K; Prasad, N; Ismail, A. (2010). Response surface optimization for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. Food Science and Technology. 45: 1739- 1745.

Kuskoski M., Asuero G., Troncoso M., Garcia M., Fett R. 2004. Actividad Antioxidante de pigmentos antocianicos. Rev. Bras. Cienc. Tecnol.Alim. v 24, n.4, 691-693.

Lim, Y; Lim, T ; Tee, J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits : A comparative study. Food Chemistry. 103(2007): 1003-1008

López, J. ,Pérez, J. 2010. Fitoquímica y Valor ecológico de olor a ajo en los vegetales. Medicina Naturista. Vol 4. N.º 1. I.S.S.N.: 1576-3080. Pp: 15-23.

Martin, F., Hay, A. Corno, L. Gupta, M. Hostettmann, K. 2007. Iridoid glycosides from the stems of *Phithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). Phytochemistry; 68: 1307-1311

McClain D., Kalinich J., Ramakrishnan N. (1995). Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes. The FASEB Journal. 9: 1345-1354.

McMurry, J. (2012). Química Orgánica. Cengage Learning Editores.

Miranda, M., 2002. Farmacognosia y Productos naturales, La Habana – Cuba 126p.

Misra, T; Singh, R; Pandey, H; Prasad, C; Sharma S. (1995). A novel pentacyclic triterpene acid from *Adenocalymma alliacea* leaves. J Nat Prod 58: 1056-1058.

Monserate V (2014). Elaboración de un condimento para carnes a partir de hojas deshidratadas de *Mansoa alliacea* de origen ecuatoriano (Ajo sachá) con actividad antioxidante. (Tesis de pregrado de la Escuela Superior Politécnica del Litoral) recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25204/1/tesis%20terminada%20cd.pdf>.

Nieto, M. (2010). Utilización del ácido oleanólico para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Biochem Pharmacol. 79:198-208.

- Ocaña, A. M.; Fernández López, C. & Altarejos, J. 1998. Chemical composition of the essential oils from the aerial parts of *Bupleurum gibraltarium* Lam. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 9-19.
- Oliveira M et al. 2013. Propiedades Fisicoquímicas y bioactivas in vitro de Aceite de Escencial de *Mansoa Alliacea* (LAM) A Gentry. *El ceptosmid*. Vol 2. 96-102.
- Ordaz, G; Dármas, H; Yañez, D; Moreno, S. (2011). Chemical composition of essential oils from leaves of *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) and *Solanum subinerme*(Solanaceae) from Sucre, Venezuela. *Rev. Biol Trop*. 59(2) 585-595.
- Ordóñez, P., Vega, M., Malagón, O., 2005. Estudio fitoquímico de Especies vegetales nativas utilizadas en la medicina tradicional de la Provincia de Loja. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. *Lyonia*, (10), 2.
- Ortuño M, 2006. Manual Práctico de Aceites Esenciales, aromas y perfumes, Aiyana Ediciones, pp.: 99-100.
- Ouaknin, L; Lameira, O; Rocha, T; Santos, F. (2011). Avaliação fenológica e screening fitoquímico de *Mansoa Alliacea* (lam.) A. Gentry - Bignoniaceae. Belém: Embrapa Amazônia OrienREvtal. 73-82.
- Palá-P; Pérez, A; Velasco, A; Sanz, J; Conejero, F. 2001. Seasonal variation in the chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 29, 663-672.
- Peñafiel, E. (1999). Evaluación del ácido oleanólico en tres flujos extractivos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) por cromatografía gaseosa. *Anales Científicos UNALM* 119(38) 252-262
- Pérez, D. (2002). Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. *Folia Amazónica* 13: 87-108.
- Pinedo, M. (1999). Sistemas de producción de plantas promisorias con principios activos en la selva baja del Perú. Programa del Camu Camu. pp 96-104
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53: 4290- 4302.
- Rao., M., Kjaer, A., Madsen J., Rao., E. (1978). Diallyl di-, tri- and tetrasulphide from *Adenocalymma alliacea*. *Phytochemistry* 17: 1660-1661.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Panala, A., Yang, M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237.

- Revilla, J. (2001). Plantas da Amazônia. Oportunidades Econômicas e Sustentáveis. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. 291-297.
- Rios M., Koziol M., Pedersen H., Granda G. 2007. Plantas Útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas. Ediciones Abya-Yala.
- Rocha, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, 78: 157.
- Ruiz, L. (2000). Amazonía Ecuatoriana: Escenario y Actores del 2000. Ecuador: EcoCiencia.
- Ruiz, V; Martínez, J. (2009). Essential oils of *Salvia blancoana* ssp. *Mariolensis* and *S. microphylla*: two taxa from the north of Alicante (Spain) used in traditional herbal liquors. *Revista de Fitoterapia* 10: 149.
- Russo, T., Meszaros, M. (1988). *Orgánica en viales*, Flinn Scientific, INC.: Batavia, 26:27.
- Rzedowski J., Calderón G. (1993). Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. Bignoniaceae. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío, 22: 13-22.
- Sanchez, C., Larrauri, J., Saura, F., (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.
- Sawai, J., Maekawa Y. (2002). Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *Journal of industrial Microbiology and Technology*, 29, 296.
- Seki, T; Hosono, T; Fukao, T; Inada, K; Tanaka, R; Ogihara, J; Ariga, T. (2008). Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pac J Clin Nutr.* 17 (S1):249-252.
- Seri-consultores, 1992. *Cultura y Naturaleza: un enfoque global sobre salud indígena en la Reserva de Biosfera del Manu, Madre de Dios, Perú*
- Silva, M; Lisbôa P; Lisbôa, R. (1977). *Nomes vulgares de plantas amazônicas*. Belém: INPA. 1009-1010.
- Sipai, S; Patel I; Rathod D; Shrimali G; Patel A; Rami E. (2013). Phytochemical studies on *Mansoa alliacea* (Lam.). *Internacional Journal of Advances in Pharmaceutical Research* 4(6) 1823-1828.
- Schultes, R., Raffauf, R. (1990). *The Healing Forest*. Discorides Press, Portland, Oregon. 107: 303.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. RIPROFITO. Colombia.
- Sharapin, N. (2000). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acids reagents. *Am.J. Enol. Viticulture.* 78:144-158.

Skelding, G; Da Silva, E; Santos, L; Zoghbi, M; Araújo, I; Uetanabaro, A.(2012). Volatile and non- volatile compounds and antimicrobial activity of *Mansoa difficilis* (Cham.) Bureau & k. Schum. (Bignoniaceae). *Quim. Nova.* 11(35) : 133-135.

Swain, T., Hillis, W. (1959). The Phenolic constituents of *prunus domestica*. *Science of Food and Agriculture.* 10: 63-68.

Thaipong, K; Boonprakob, U; Crosby, K; Cisneros, L; Hawkins, D.(2006). Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis.* 19(2006): 669-675.

Vega, M. (2001). *Etnobotánica de la amazonia peruana.* Ediciones Abya – Ayala. Quito Ecuador. Pp 119-121.

Werner S; Simic N; Weis R; Saf, R; Kunert, O. (2003). Spectral Assignments and Reference Data. Complete assignments of H and C NMR resonance of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11- oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 41: 636-638.

Willard, H; Dean, F; Merrit, J; Settle, J.(1991). *Métodos Instrumentales de Análisis.* Editorial Iberoamérica. México.

Wilkinson, J. M. "Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts", *Modern Phytomedicine*, pp. 157-171, 2007.

Youngson, R. (2003). *Antioxidantes y Radicales Libres.* Editorial Edaf, S.A. Madrid.

Zoghbi, M., Andrade, E., Maia, J. (2002). Volatile constituents from *Adenocalymma alliaceum* Miers and *Petiveria alliacea* L., two medicinal herbs of the Amazon. *Flavour Fragr. J.* 17 : 133–135.

Zoghbi, M., Ramos, L., Maia, J., da Silva, M., Luz, A. (1984). Volatile sulphides of the Amazonian garlic bush. *J. Agric. Food Chem.*; 32 : 1009–1010.

ANEXOS

Anexo 1. Marcas de identificación de los ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico.

PRUEBA	METABOLITO	RESULTADO
SUDAN	GRASAS Y ACEITES	Si en las paredes del tubo de ensayo se observa a presencia de grasa o aceite se considera positivo el ensayo.
DRAGENDORFF	ALCALOIDES	Si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).
MAYER		
WAGNER		
BALJET	CUMARINAS Y COMPUESTOS LACTÓNICOS	Considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.
LIEBERMANN-BURCHARD	TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración: Rosado-azul, muy rápido Verde-intenso, visible aunque rápido Verde oscuro-negro, al final de la reacción.
CATEQUINAS	CATEQUINAS	La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo
RESINAS	RESINAS	La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo
FEHLING	AZUCARES REDUCTORES	El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.
ESPUMA	SAPONINAS (Tipo esteroidal y triterpénica)	El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos.
CLORURO FERRICO	FENOLES TOTALES/ TANINOS	Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos
NINHIDRINA	AMINOÁCIDOS LIBRES O AMINAS EN GENERAL	Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.
SHINODA	FLAVONOIDES	El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo: intensos en todos los casos.
ANTOCIANIDINAS	FLAVONOIDES C6-C3-C6	La aparición de color rojo a marrón en la fase amíllica, es indicativa de un ensayo positivo.
KEDDE	GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Un ensayo positivo es cuando aparece una coloración violáceo, persistente durante 1 y 2 horas
MUCILAGOS	ESTRUCTURAS TIPO POLISACÁRIDOS	Si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.
P. AMARGOS Y ASTRINGENTES		Reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

Anexo 2. Calculo para la determinación del Rendimiento.

$$\%R = \left(\frac{b}{a}\right) x 100$$

Dónde:

%R= porcentaje de rendimiento

a= peso inicial de la muestra

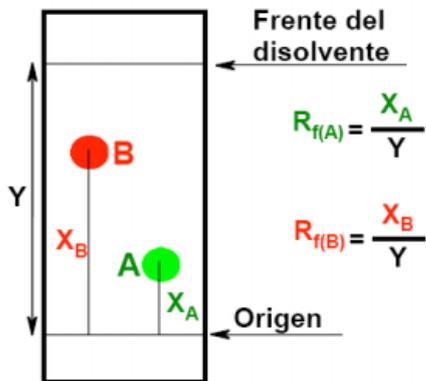
b= peso obtenido al final del proceso.

Anexo 3. Preparación del Revelador Acido Sulfurico 5% y vainillina 1%

Reactivos	Composición	Procedimiento
Ácido sulfúrico	250 ml Etanol	Se aforan los 12,5 ml de ácido sulfúrico en 250 ml etanol
	12,5 ml Acido sulfurico	
Vainillina	250 ml etanol	Se disuelve 12,5 g de vainillina en 250 ml de etanol
	12,5 g vainillina	

Anexo 4. Cálculo del Factor de retención (Rf)

El Rf es la distancia recorrida del compuesto/distancia recorrida por el disolvente.



$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Dónde:

X= distancia recorrida por el compuesto desde la línea de origen hasta el centro de la marca del compuesto

Y= distancia recorrida por el disolvente desde la línea de origen hasta la línea frente del disolvente.

Anexo 5. Determinación de la humedad

$$Hm = \frac{m1 - m2}{m1 - cv} \times 100$$

Dónde:

Hm= porcentaje de humedad

cv= peso de la capsula vacía (g)

m1= peso de la capsula + muestra a analizar (g)

m2= peso de la capsula + muestra seca (g).

Anexo 6. Determinación del rendimiento del aceite esencial.

Los resultados se expresaron bajo la siguiente formula:

$$R = \frac{v}{p} \times 100$$

Dónde:

R= rendimiento expresado en porcentaje

v= volumen del aceite obtenido (mL)

p= peso de las hojas frescas de *Mansoa alliacea* (g).

Anexo 7. Determinación de la Densidad Relativa.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d= densidad relativa

m0= peso del picnómetro vacío (g).

m1= peso del picnómetro + agua destilada (g)

m2= peso del picnómetro + muestra de aceite esencial (g).

Anexo 8. Determinación del Índice de refracción a norma ANFOR NF 75 -112

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es $(589.3 \pm 0.3)\text{nm}$, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C , salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30°C según el punto de fusión del aceite considerado.

Equipos:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002 .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20°C , se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

Modo de operación:

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C , según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Anexo 9. Calculo para la determinación del Índice de Kóvats (IK).

El Índice de Kóvats se obtiene utilizando la siguiente formula:

$$IK = 100n + 100 \times \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right)$$

Dónde:

IK= Índice de Kóvats

n= número de átomos de carbón en el n-alcano

t_{Rx}= tiempo de retención el compuesto estudiado, que eluye en el centro de los n- alcanos.

t_{Rn}= tiempo de retención del n- alcano que eluye antes del compuesto estudiado.

t_{RN}= tiempo de retención del n-alcano, que eluye después del compuesto estudiado.

Anexo 10. Bibliografía de los índices de Kóvats reportados en la literatura.

A) Mahattanatawee, K.; Perez, P; Davenport, T; Rouseff, R. (2007). *Comparison of three lychee cultivar odor profiles using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-sulfur detection*, J.Agric. Food Chem., 55, 5, 1939-1944.

B) Sinha, N; Guyer, D; Gage, D; Lira, C. (1992). *Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 5, 842-845. *Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 40, 5, 842-845.

C) Zoghbi, M; Andrade, E; Maia, J. (2002). *Volatile constituents from Adenocalymma alliaceum Miers and Petiveria alliacea L., two medicinal herbs of the Amazon*, Flavour Fragr. J., 17, 2, 133-135.

D) Miyazawa, M; Tamura, N. (2007). *Components of the essential oil from sprouts of Polygonum hydropiper L. ('Benitade')*, Flavour Fragr. J22, 3, 188-190.