

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA



**“ESTUDIO QUIMICO DEL ACEITE ESENCIAL DEL
TE INKA (*ophryosporus peruvianus*)”**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

LICENCIATURA EN CIENCIAS

CON MENCIÓN EN QUIMICA

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO LOZADA

LIMA – PERU

2001

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

A la M.Sc. Otilia Acha de la Cruz, por el asesoramiento permanente en el desarrollo del presente trabajo, así como el desinteresado apoyo al facilitarme material bibliográfico, equipos y reactivos.

A la Universidad de Sao Paulo y a la Srta. Ingrit Collantes Diaz, bachiller egresada de nuestra especialidad, por su colaboración y apoyo en la toma de espectros de resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases de las muestras analizadas.

A TECSUP - Laboratorio de Química por su colaboración en la toma de espectros IR y UV.

Al personal del Laboratorio N°12 de la FC-UNI, Sr. Manuel Mezarina y Jorge Aguilar, por su apoyo en la utilización de materiales y reactivos.

A todos mis amigos que de una u otra manera me brindaron su apoyo en la realización y culminación del presente trabajo.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. MARCO TEORICO	4
2.1 ACEITES ESENCIALES	4
2.2 SEPARACION E IDENTIFICACION DE COMPONENTES	7
2.2.1 Métodos cromatográficos	7
2.2.2 Cromatografía de Gases	8
2.2.3 Métodos espectroscópicos	8
III. PARTE EXPERIMENTAL	11
3.1 RECOLECCION DE MUESTRA	11
3.2 IDENTIFICACION BOTANICA	12
3.3 ANALISIS PRELIMINAR DE LA MUESTRA	16
3.4 IDENTIFICACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS	17
3.4.1 Ensayos en la fracción metanólica de ¼ volumen	19
3.4.2 Ensayos en la fracción metanólica de ¾ volumen	20
3.4.3 Test para aceites esenciales	21
3.5 EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES	22
3.6 SEPARACION DE COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL	24
3.6.1 Pruebas preliminares de CCF en cromatofolios	24
3.6.2 Preparación de diazometano	26
3.6.3 Metilación del aceite esencial con diazometano	26
3.6.4 Cromatografía en columna del aceite esencial	28
IV. CARACTERIZACION DE COMPUESTOS	32
4.1 PROPIEDADES DEL ACEITE ESENCIAL	32
4.1.1 Características organolépticas	32
4.1.2 Propiedades físicas y químicas	32
4.1.3 Reacciones características de coloración	35
4.2 ESPECTROSCOPIA DEL ACEITE ESENCIAL	38
4.3 COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL	39

4.3.1 Estudio cromatográfico y espectral del compuesto de la fracción N°5	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
5.1 ACEITE ESENCIAL	43
5.1.1 Espectroscopia	43
5.1.2 Propiedades del aceite esencial	43
5.2 COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL	44
5.2.1 Fracción N°5 (compuesto FA)	44
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII BIBLIOGRAFIA	51
IX. ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

	Pag.
TABLA N°1 Resultados del análisis preliminar del " <i>ophryosporus peruvianus</i> "	17
TABLA N°2 Resultados del análisis fitoquímico preliminar del " <i>ophryosporus peruvianus</i> "	21
TABLA N°3 Datos experimentales obtenidos de las extracciones del aceite esencial del " <i>ophryosporus peruvianus</i> "	23
TABLA N°4 Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de Sílica gel	30
TABLA N°5 Resultados de las propiedades físicas y químicas del Aceite esencial del " <i>ophryosporus peruvianus</i> "	35
TABLA N°6 Resultados de las reacciones de coloración del aceite Esencial del " <i>ophryosporus peruvianus</i> "	37
TABLA N°7 Datos comparativos de RMN- ¹ H y ¹³ C del Trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno y el compuesto FA	46
TABLA N°8 Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H y ¹³ C del β-cariofileno y del cis-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno	47
TABLA N°9 Plantas que contienen epoxi-cariofileno	Anexo N°6

INDICE DE FIGURAS

		Pag.
FIGURA N°1	Muestra (<i>ophryosporus peruvianus</i>)	13
FIGURA N°2	Muestra (primera etapa de crecimiento)	14
FIGURA N°3	Muestra (segunda etapa de crecimiento)	15
FIGURA N°4	Marcha fitoquímica preliminar	18

INDICE DE ESPECTROS Y CROMATOGRAMAS

		ANEXO
ESPECTRO N°1	Infrarrojo del aceite esencial	4
ESPECTRO N°2	Ultravioleta del aceite esencial	4
ESPECTRO N°3	RMN- ¹ H Fracción N°5	5
ESPECTRO N°4	RMN- ¹³ C Fracción N°5	5
ESPECTRO N°5	Masas Fracción N°5	5
CROMATOGRAMA N°1	CG-MS del aceite esencial	4
CROMATOGRAMA N°2	CG Fracción N°5	5

INDICE DE ABREVIATURAS

CG	cromatografía de gases
CG-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas
IR	espectroscopía infrarroja
UV	espectroscopía ultravioleta
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear del protón
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear del carbono 13
CCF	cromatografía en capa fina
CC	cromatografía en columna
CPP	cromatografía en placa preparativa
Tr	tiempo de retención
DCM	diclorometano
MeOH	metanol

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1	IDENTIFICACION BOTANICA
ANEXO N°2	REACTIVOS UTILIZADOS EN LA MARCHA FITOQUIMICA
ANEXO N°3	REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS REACCIONES CARACTERISTICAS DE COLORACION
ANEXO N°4	CG-MS Y ESPECTROS DEL ACEITE ESENCIAL
ANEXO N°5	ESPECTROS Y CROMATOGRAMA DE LA FRACCION N°5 (COMPUESTO FA)
ANEXO N°6	PROPIEDADES FISICAS Y BIOLOGICAS DEL COMPUESTO IDENTIFICADO (TRANS-1(2)-EPOXI-8(14)-CARIOFILENO)

INTRODUCCION

En la actualidad, naturaleza, plantas, ecología aparecen como necesidad normal del hombre en su relación con el medio. Es suficiente recordar que los vegetales fueron los primeros medicamentos utilizados por el hombre para aliviar el sufrimiento físico y curar las enfermedades. Se reconocen dentro de la historia del medicamento como los precursores de la farmacoterapia moderna. (1)

La Naturaleza fue y sigue siendo una fuente potencial de drogas, se estima que de las 500,000 mil especies de plantas superiores, sólo el 5-10% ha sido investigado, en relación a la composición química o actividad biológica. Paralelamente miles de especies vegetales vienen siendo utilizadas desde los inicios por la medicina popular, cuyo conocimiento empírico ha llegado de una generación a otra por la transmisión oral.

La relación entre el hombre y su medio vegetal fue íntima y vital, en realidad éste vivió con las plantas y dependió de ellas, por lo que la botánica y la medicina tuvieron una estrecha vinculación, teniendo las plantas y drogas obtenidas de ellas una gran preponderancia entre todos los medicamentos de los códigos farmacéuticos y de las primeras farmacopeas.

En los últimos años ha despertado gran interés el uso de remedios vegetales, apoyado por una amplia cobertura de los medios de difusión y publicaciones no profesionales que muchas veces entregan informaciones equivocadas, incluso algunas peligrosas.

La gran mayoría de la población mundial mantiene vigente la utilización de las plantas medicinales. Su correcto empleo representa una condición importante para satisfacer las necesidades de salud como también para promover la autonomía de un país. (1)

Los productos naturales proporcionan una gran variedad de compuestos, cada uno de ellos con una estructura química singular presentando actividades biológicas diversas. Las plantas pueden considerarse como un laboratorio de biosíntesis apto para proveer y suplir las necesidades de los seres vivos.

Los productos naturales se han dividido con cierta arbitrariedad en 2 grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. El ser vivo sintetiza una

serie de sustancias; las que son inmediatamente empleadas para continuar con su ciclo vital se denominan metabolitos primarios y entre estos se encuentran los lípidos, carbohidratos, proteínas, etc; mientras el otro grupo de compuestos de menor proporción en la naturaleza se denomina metabolitos secundarios (para el químico es sinónimo de Productos Naturales), y comprenden los flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides, antocianinas, lactonas, etc. (2, 3)

Los productos naturales o metabolitos secundarios se encuentran localizados en todas las partes de la planta y su concentración varía de 0,1 a 2% excepto en algunos casos que tienen mayor porcentaje en las resinas y en la amapola. La concentración de los compuestos no es igual en las diferentes partes de la planta y las clases de compuestos contenidos en raíces, tallos, hojas, etc, difieren en algo.

Normalmente el tratamiento químico para el aislamiento de los componentes debe efectuarse por separado con cada una de las partes de la planta, preferentemente con materiales frescos o partes tiernas de la planta. Este aislamiento de componentes se realiza generalmente de las plantas medicinales y son utilizadas posteriormente para la elaboración de medicamentos. Estas sustancias aisladas puras son perfectamente definidas y por consiguiente dotadas de propiedades constantes. Una vez identificados los llamados "principios activos", se trata de copiar y reproducir la estructura natural, llegando a la industrialización de productos sintéticos. En muchos casos la fabricación industrial sintética es compleja y de costo elevado, lo que obliga a recurrir a los organismos vegetales para obtener la sustancia deseada.

El Perú beneficiado con una geografía muy variada y un clima diversificado, posee un extraordinario potencial de Recursos Naturales de origen vegetal como plantas medicinales que no son debidamente aprovechadas por adolecer de tecnologías propias por falta de incentivos para la investigación y/o por desconocimiento de las mismas. (3).

La especie ophryosporus peruvianus (Te Inka), que es la planta motivo de este estudio, forma parte del amplio grupo de plantas medicinales existentes en nuestro país, como tal, ha sido y es utilizada por el hombre generalmente para la curación de sus enfermedades. Los sinónimos vulgares de esta planta son:

cushpishka, chichi casha, chichis, japia japia, kulpishka (2). En los pueblos de la sierra de Lima (Huarochiri, Yauyos, etc) esta especie (*ophryosporus peruvianus*) es conocida como “puschca” o “arenilla”.

Entre algunas de las múltiples propiedades dentro de la medicina folklórica que presenta esta planta puede citarse: problemas estomacales, del hígado, molestias de la próstata, regulador de la sangre, alivia el mal aliento, desinflamante, etc. Las características que presenta esta planta motiva el estudio de los principios activos responsables de las propiedades curativas; investigar y proponer los compuestos químicos que actúan en el ser humano. El presente trabajo inicia la investigación con el estudio de aceites esenciales de las flores de la planta.

II. MARCO TEORICO

2.1 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son compuestos volátiles formados por mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas. En la antigüedad a la fragancia de las plantas se les denominaba “*Quinta Esencia*”, por lo que hoy en día recibe el nombre de aceite esencial.

Los compuestos olorosos se encuentran situados en glándulas odoríferas existentes dentro o fuera de las células vegetales; el mecanismo de extracción en ambos casos es similar. El calor y el vapor de agua sobre todo estando húmeda la planta, hinchan las paredes celulares y facilitan el paso de los aceites esenciales al exterior (ósmosis).

Para la extracción de aceites esenciales existen varios métodos adaptados a la naturaleza y propiedades de la esencia o de los cuerpos aromáticos de donde procedan; dentro de ellos tenemos:

Destilación con vapor, se realiza pasando una corriente de vapor de agua a través de la materia vegetal a extraer, condensando en un extremo. Al dejar reposar aparecen dos capas, una corresponde al agua y la otra al aceite (por lo general menos densa). Esta técnica de arrastre de vapor permite separar los componentes volátiles del material no volátil sin necesidad de subir la temperatura del baño por encima de 100°C, nos permite aislar los aceites sin correr el riesgo que se descompongan térmicamente, (algunos aceites sin embargo no destilan a esta temperatura por lo que se utiliza agua salada que aumenta 8°C la ebullición normal del agua). (3)

Expresión, se realiza colocando el material en presencia de solventes volátiles como el éter de petróleo, éter etílico, etc.

Enflorado, consiste en untar 2 placas con un material graso (cera). El vegetal triturado en pequeñas porciones se coloca sobre una de ellas y se presiona con la otra, el aceite se adhiere a la cera y luego puede ser extraído con solventes.

La desventaja de estos dos últimos métodos radica en el hecho que al extraer el aceite esencial también se está extrayendo otros compuestos de naturaleza no polar, lo que complicaría un poco el trabajo de separación.

Los aceites esenciales se extraen generalmente de plantas, arbustos, semillas y tallos. Se encuentran normalmente en las glándulas o en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales, pueden estar diseminados por toda la planta o bien concentrados en las flores o en las semillas.

Existen en la naturaleza muchas familias de plantas que contienen estos aceites esenciales; entre las que presentan un mayor porcentaje de aceites tenemos: (4)

Rutaceae	:	limón, naranja, mandarina, etc.
Labiaceae	:	menta, salvia, romero, etc.
Piperaceae	:	pimiento, matico, etc.
Umbelíferae	:	anís, hinojo, ajeno, etc.
Mirtaceae	:	eucalipto, clavo, etc.
Leguminosae	:	acacia, habas, tonka, etc.
Lauraceae	:	laurel, canela, etc.
Coniferae	:	cedro, enebro, pino, etc.
Gramineae	:	citronella, hierba luisa, palmarosa, etc.
Asteraceae	:	manzanilla, arnica, te inka, etc.

Los aceites esenciales están generalmente formados por un gran número de hidrocarburos de 10 y 15 átomos de carbono, a los que se les denomina monoterpenos y sesquiterpenos respectivamente. Compuestos con mayor número de carbonos (que son extraídos principalmente de gomas y resinas de plantas y árboles) como los di y triterpenos, no son arrastrables por vapor (o en muy poca proporción), como tampoco lo son los compuestos con 40 átomos de carbono (tetraterpenos). (3)

Las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales son muy diversas puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas de

las que en la esencia de una planta prácticamente puede encontrarse solo uno o muchos compuestos juntos como en la de jazmín o en la de manzanilla. (5)

La presencia de terpenoides en los aceites provocan que se produzcan peróxidos, los cuales ayudan a la resinificación y deterioro de las mismas por lo que es común mantener los aceites en solventes a baja temperatura.

La distribución de terpenoides en diferentes partes de la planta es estudiada a fondo, dado que aparte de su determinación estructural y su aporte a estudios taxonómicos de las especies involucradas, su amplio uso industrial y sus aplicaciones medicinales despertaron el interés por el conocimiento de nuevas estructuras y promovieron el vasto trabajo sintético realizado en este campo.

Aparte de su aplicación medicinal (como antiséptico frente a diversos microorganismos, *tomillo*, *eucalipto*, *romero*; como antiespasmódico *manzanilla*, *toronjil*; como carminativo *anís*, *hinojo*, *badiana*; como espectorante *eucalipto*; antihelmíntico *quenopodio*, etc), los aceites esenciales tienen un gran campo de aplicación a nivel industrial, son muy utilizados en perfumería por su agradable olor, en gastronomía como condimentos, saborizante y aromatizante de bebidas y alimentos, como repelente de insectos y como disolvente de sustancias grasas. Respecto al papel biológico, se cree que estas esencias intervienen como hormonas en la polinización, sirven de atrayente de insectos poleníferos, regulan la transpiración y son productos de desecho metabólico.

El contenido de aceites esenciales en las plantas es variable, generalmente se encuentra entre 0,1 y 3%, existiendo algunas excepciones como por ejemplo el clavo de olor con más de 15% de principio activo (eugenol) y la badiana (o badania) con más de 5%.

Los aceites pueden clasificarse de acuerdo al principal componente que contienen, así:

Con hidrocarburos	trementina o aguarrás (α,β pineno)
Aldehidos	canela (aldehido cinámico)
Alcoholes	menta (mentol)

Cetonas	:	alcanfor (D-alcanfor)
Fenoles	:	clavo de olor (eugenol)
Oxidos	:	eucalipto (1,8-cineol)
Esteres	:	lavanda
Azulenos	:	manzanilla (chamazuleno)

A pesar de la constitución química heterogénea de los aceites esenciales, presentan ciertas propiedades en común, como por ejemplo: (1)

1. olor intenso
2. generalmente líquidos a temperatura ambiente
3. volátiles (diferencia con los lípidos)
4. arrastrables por el vapor de agua
5. sensibles a la oxidación (tendencia a polimerizarse)
6. densidad de 0,84 - 1,18g/cc (la mayoría menos densa que el agua)
7. índice de refracción elevado
8. punto de ebullición relativamente alto 100 - 250°C
9. solubles en solventes orgánicos
10. casi insolubles en agua

2.2 SEPARACION E IDENTIFICACION DE COMPONENTES

Para la investigación de productos naturales se requiere extraer los metabolitos secundarios de las plantas, para luego aislar y purificar los compuestos de interés utilizando los métodos cromatográficos. Estos compuestos son analizados por espectroscopía, la cual nos permite obtener las estructuras químicas correspondientes.

2.2.1 METODOS CROMATOGRAFICOS

La cromatografía es el procedimiento en el cual una solución de sustancias a separar se desplaza en una dirección predeterminada por una disposición de aparatos, por medio de una materia sólida, insoluble inorgánica u orgánica, mas o menos finamente re-

partida, siendo retenidos los compuestos en medida individualmente distinta. (6)

En cromatografía tenemos un sistema de tres componentes, adsorbente, medio de elución y compuesto cromatografiado. El comportamiento cromatográfico depende tanto del adsorbente como del medio de elución. Se emplean como adsorbentes; óxidos, óxidos hidratados o sales, que son combinaciones polares o polarizables. (7)

2.2.2 CROMATOGRAFIA DE GASES (8, 9)

La cromatografía de gases es una técnica analítica utilizada en la separación, identificación y medida de los componentes de una mezcla. Se basa en la diferencia de velocidades de migración de los componentes de una mezcla al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo relleno de material adecuado.

Se emplean en gran escala en análisis de mezclas orgánicas complejas, como los que se encuentran comúnmente en derivados del petróleo, aceites esenciales, perfumes, insecticidas, ácidos grasos, etc. Se emplean para analizar mezclas de componentes que vaporicen o se volatilicen a temperatura de 0 a 450°C, y para cualquier sustancia que pueda calentarse dando una presión de vapor de unos 30mmHg sin alterarse o descomponerse.

Este tipo de análisis es, en muchos casos, el único método que permite separar en una sola operación mas de 100 componentes de una mezcla. Empleada con espectroscopía de masas o espectroscopía infrarroja, permite aislar e identificar los componentes de una mezcla.

2.2.3 METODOS ESPECTROSCOPICOS

Los métodos espectroscópicos son métodos físicos utilizados en la identificación de las estructuras de los compuestos aislados.

1. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (10)

Método espectroscópico de análisis no destructivo basándose en la absorción de energía en la zona de la radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos cuando se colocan estos en un campo magnético intenso y de alta homogeneidad.

Los núcleos de todos aquellos isótopos que presenten espín nuclear (es decir que al menos uno de los valores de masa o carga de los átomos sea impar ^1H , ^{13}C) presentarán el fenómeno de resonancia magnética nuclear.

Para el trabajo utilizamos los espectros originados por el protón y por el carbono 13.

2. ESPECTROMETRIA DE MASAS (11)

Método espectroscópico de análisis que nos proporciona valiosa información acerca del peso molecular de los compuestos y de algunos posibles grupos presentes, esto debido a la fragmentación de la molécula originada al someterla a una irradiación con un haz de electrones (bombardeo electrónico) o con luz ultravioleta de longitud de onda corta (fotoionización).

3. ESPECTROCOPIA ULTRAVIOLETA (UV) (11)

Método espectroscópico de análisis. Se mide en el rango de longitudes de onda entre 200 y 500 nm. La espectroscopia ultravioleta proporciona información de absorciones características de ciertos grupos funcionales una vez determinado el tipo de compuesto. Estructuras con dobles enlaces aislados presentan absorciones de luz UV a longitudes de onda menores a 200 nm, estructuras con dobles enlaces conjugados absorben a longitudes de onda mayores a 200 nm, mientras que dobles enlaces conjugados presentan una molécula mayor será la longitud de onda de luz que absorba.

4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR) (11, 12)

Método espectroscópico de análisis. La radiación infrarroja basa su medición en la oscilación y vibración de las moléculas. Los átomos que forman las moléculas oscilan o vibran constantemente alrededor de su posición de equilibrio, las frecuencias de estas vibraciones son de la misma magnitud de las frecuencias de la radiación IR, por lo que existe una interacción entre ambas y ocurre una absorción de la energía de radiación por las moléculas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Es importante mencionar que las etapas experimentales de laboratorio que abarca el análisis preliminar, marcha fitoquímica, extracción y metilación de aceites, separación de compuestos, propiedades físicas y químicas y reacciones de coloración, fueron realizadas en el Ambiente de Investigación de Química Orgánica de Productos Naturales del Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

La parte espectroscópica (RMN-¹H, RMN-¹³C, Cromatografía de Gases y Espectroscopía de Masas) fue realizada en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Sao Paulo – Brasil, gracias a la colaboración de la Srta. Ingrid Collantes Diaz, bachiller egresada de nuestra Especialidad.

Los Espectros Ultravioleta e Infrarrojo fueron tomados en el Laboratorio Químico de Tecsup durante un curso llevado en esa Institución.

3.1 RECOLECCION DE MUESTRA

La muestra conocida con el nombre vulgar de Té Chino o Té InKa, fue recolectada en el pueblo de San Pedro de Casta ubicado en la provincia de Huarochirí, departamento de Lima, Perú a 3100 m.s.n.m. en el mes de octubre de 1996, bajo condiciones ambientales de temperatura igual a 12°C y humedad relativa de 60%¹

La planta crece en forma de arbustos erguidos, cuya altura oscila entre 0.5 a 1.5 metros (Figura N°1). En su primera etapa de crecimiento se caracterizan por presentar hojas pequeñas (1 a 4 cm de largo) de color verde (Figura N°2). La siguiente etapa presenta la formación de pequeñas flores de color amarillo, desapareciendo progresivamente las hojas iniciales (Figura N°3). En esta etapa de crecimiento se recomienda la recolección de las flores de la planta, dejando los tallos para una nueva cosecha.

¹ Termohigrómetro: Prazisione – Hygrometer (-30 – 50 °C)

Esta especie es una planta silvestre que se extiende desde Chile, Argentina hasta el Ecuador, en el Perú se expande en todos los Andes y se encuentra geográficamente a un nivel de altura entre 800 y 3500 m.s.n.m.

3.2 IDENTIFICACION BOTANICA

La muestra fue remitida al Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, Lima Perú, siendo identificada por el Biólogo Hamilton Beltrán cuyo resultado se detalla a continuación:

División	:	Angiospermas
Clase	:	Dicotiledóneas
Subclase	:	Sympetalae
Orden	:	Campanulales
Familia	:	Asteraceae (compuestas)
Género	:	Ophryosporus
Especie	:	<u>Ophryosporus peruvianus</u> (Gmel.) King & H. Rob.

La muestra se encuentra registrada con el número: USM 137003.

Se adjunta la constancia en el anexo N°1.

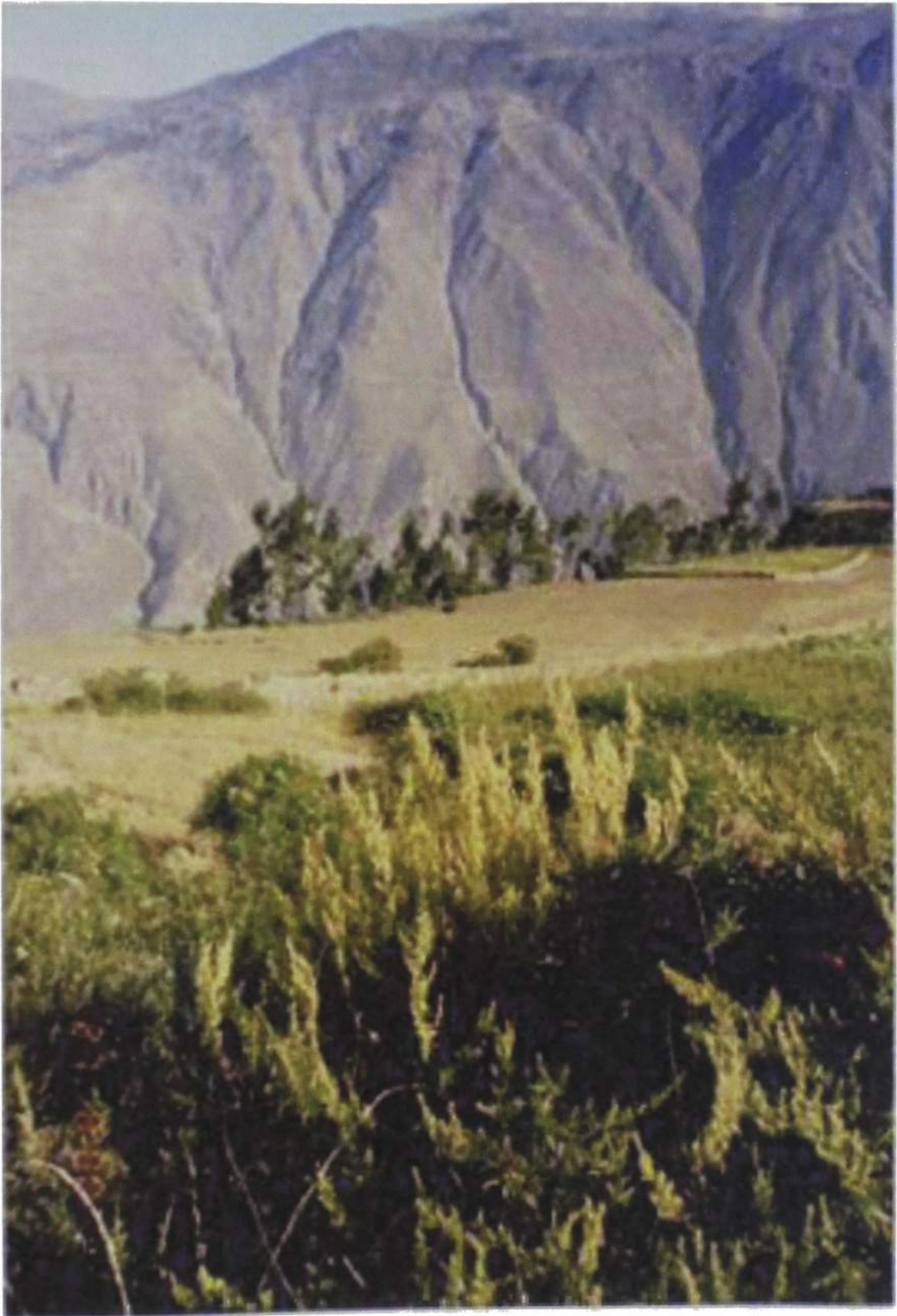


Fig. N°1 : MUESTRA (*ophryosporus peruvianus*)



Fig. N°2 : MUESTRA (primera etapa de crecimiento)



Fig. N°3 : MUESTRA (segunda etapa de crecimiento)

3.3 ANALISIS PRELIMINAR DE LA MUESTRA *ophryosporus peruvianus*

La muestra recientemente colectada, fue sometida a un análisis preliminar (se trabajó con las flores de la planta), cuyo proceso y resultados se detallan a continuación:

1. Humedad

Se pesó exactamente en una cápsula previamente pesada 1,0g de muestra y se llevó a una estufa² por 1,5 horas a 100-110°C. Se dejó enfriar en el desecador y se pesó repetidamente hasta obtener un peso constante. Esta prueba se realizó por triplicado.

2. Cenizas

Se pesó exactamente en una cápsula previamente pesada 1,0g de muestra y se llevó a una mufla³ por 2,5 horas a 800°C. Se dejó enfriar en un desecador y se pesó repetidamente hasta obtener un peso constante. Las cenizas obtenidas presentan una coloración blanca-verdosa. Esta prueba se realizó por triplicado.

3. Porcentaje de Grasa

Se pesó exactamente 2,0g de muestra y se extrajo por 4 horas con n-hexano (hasta que el solvente no presente color al momento de la extracción) en un equipo Soxhlet (balón previamente tarado). Se evaporó el solvente en baño maría, se dejó enfriar el balón en desecador y se pesó repetidamente hasta peso constante. Esta prueba se realizó por triplicado.

² Estufa Memmert UM400, Laboratorio de Productos Naturales FC-UNI

³ Mufla Termolyne Furnace 1400 (ambiente – 1200°C)

TABLA N°1
RESULTADOS DEL ANALISIS PRELIMINAR DEL
“*ophryosporus peruvianus*” (Te inka)

ANALISIS	RESULTADO (%)
Humedad	20,15
Cenizas	5,44
Grasas	13,62

3.4 IDENTIFICACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS-MARCHA FITOQUIMICA **(13, 14)**

Para poder determinar los principios activos (metabolitos secundarios) presentes en la muestra *ophryosporus peruvianus* (te chino o te inka), se realizó la marcha fitoquímica preliminar (Curso de Productos Naturales 1994 dictado por M.Sc. Otilia Acha de la Cruz de acuerdo al método de Rondina & Coussio), el proceso está esquematizado en la figura N°4

DESCRIPCION DEL PROCESO

Se tomaron 50g de muestra secada a 40°C, molida en un molino de cuchillas y tamizada con una malla de 325 um.

Se realizaron pruebas y ensayos en el laboratorio, observándose los siguientes resultados:

El extracto de n-hexano obtenido después del reflujo con el equipo soxhlet era de color verde oscuro, debiéndose a la gran cantidad de pigmentos de clorofila que se extraen con algunos principios activos. En este extracto se realizó la prueba de Lieberman Burchard (para triterpenos y esteroides). Se calentó la solución hasta obtener un residuo pardo negruzco, adicionándose el reactivo de Lieberman Burchard y dejándose reposar por varios minutos. Se formaron 2 capas, la interfase fue de color verde azulado, indicando la prueba positiva.

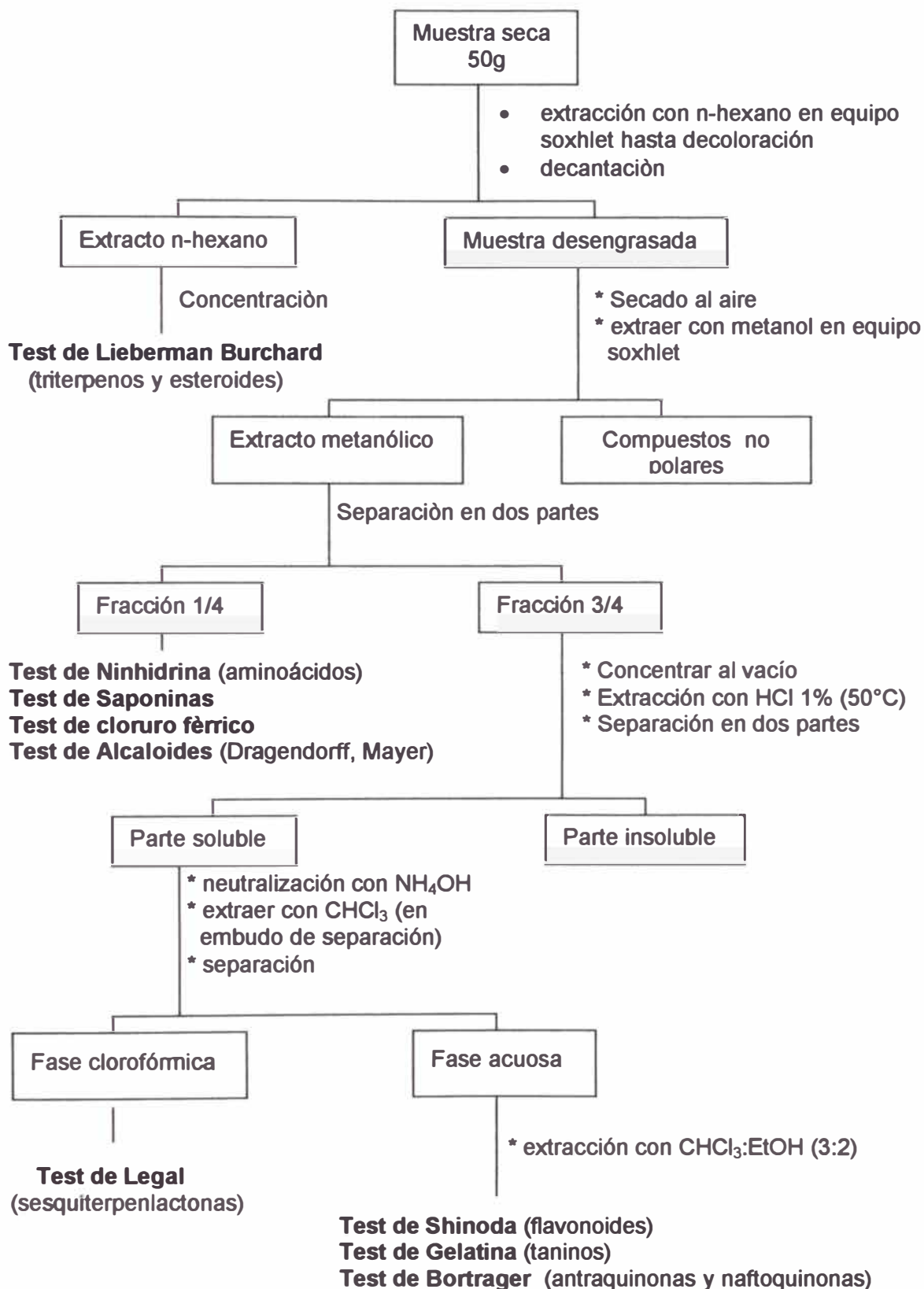


Fig. N°4 : MARCHA FITOQUIMICA

La muestra previamente desengrasada se extrajo con metanol, obteniéndose un extracto de color pardo oscuro. El extracto se dividió en dos fracciones consistentes en $\frac{3}{4}$ (30ml) y $\frac{1}{4}$ (10ml) del volumen.

3.4.1 ENSAYOS EN LA FRACCION METANOLICA DE $\frac{1}{4}$ DE VOLUMEN (10ml)

La preparación de reactivos se especifica en el anexo N°2

1. TEST DE NINHIDRINA

A 1ml de solución se adicionó solución de ninhidrina al 2,5% y se calentó a ebullición 20 segundos. No se observó cambio de coloración azul o violeta característica de aminoácidos, lo que indicó que la reacción fue negativa.

2. TEST DE ALCALOIDES

A 1ml del extracto metanólico se le agregó 3 gotas de HCl 2N, esta solución fue de color verde amarillento. Se dividió en 2 partes iguales, a la primera se le hizo el ensayo con el reactivo de Dragendorff, obteniendo una solución de color naranja con poco precipitado; a la segunda se le hizo el ensayo con el reactivo de Mayer, obteniendo una suspensión color crema. Estas reacciones indicaron la presencia de alcaloides.

3. TEST DE SAPONINAS

En un tubo de ensayo se tomó 1ml de muestra y se mezcló con agitación con 20 gotas de solución de sulfato férrico en ácido acético glacial y 1 gota de solución de sulfato férrico en ácido sulfúrico concentrado (Reacción de Keller – Killiani).

Después de 5 minutos no se observó coloración azul o verde característicos de saponinas, lo que indicó que la reacción fue negativa.

4. TEST DE CLORURO FERRICO

Se tomó 1 ml de muestra y se agregó 1ml de FeCl₃ al 1%, se observó una coloración azul negruzca, lo que indicó una reacción positiva por la presencia de compuestos fenólicos y/o flavonoides.

3.4.2 ENSAYOS EN LA FRACCION METANOLICA DE ¾ DE VOLUMEN (30ml)

1. TEST DE LEGAL

Se tomó 2 ml de muestra de la solución clorofórmica y se agregó el reactivo de sesquiterpenlactonas, observándose una coloración rojo-naranja intensa lo que indicó que la reacción fue positiva.

2. TEST DE SHINODA

Se tomó 1 ml de muestra de la fase acuosa y se agregó el reactivo de Shinoda, observándose tonos rojos, lo que indicó que la reacción fue positiva debido a la presencia de flavonoides.

3. TEST DE TANINOS

Se tomó 2 ml de muestra de la fase acuosa y se adicionó 1 ml de la solución de gelatina al 1%. No se observó la formación de precipitado blanquecino, lo que indicó que la reacción fue negativa debido a la ausencia de taninos.

4. TEST DE BORTRAGER

Se tomó 1 ml de muestra de la fase acuosa y se adicionó 1ml del reactivo de Bortrager. No se observó tonos rojos en la fase acuosa, lo que indicó que la reacción fue negativa debido a la ausencia de antraquinonas y naftoquinonas.

3.4.3 TEST PARA ACEITES ESENCIALES (14)

Se realizó una prueba para la detección de aceites esenciales que consistió en colocar 5 g de muestra fresca en un tubo de ensayo, se agregó agua destilada y se llevó a ebullición por 5 minutos. La aparición de pequeñas gotas aceitosas en el agua indicó la prueba positiva de aceites en la planta.

Los resultados del análisis fitoquímico se detallan en la tabla N°2

TABLA N°2
RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL
“*ophryosporus peruvianus*” (Te Inka)

ENSAYO	RESULTADO	CARACTERISTICO DE:
Test de Ninhidrina	Negativo	Aminoácidos y proteínas
Test de Dragendorff	Positivo	Alcaloides
Test de Mayer	Positivo	Alcaloides
Test de Saponinas	Negativo	Saponinas
Test de Molish	Negativo	Azúcares
Test de FeCl ₃	Positivo	Compuestos fenólicos
Test de Legal	Positivo	Sesquiterpenlactonas
Test de Shinoda	Positivo	Flavonoides
Test de Bortrager	Negativo	Antraquinonas, naftoquinonas
Test de Taninos	Negativo	Taninos
Test de Lieberman Burchard	Positivo	Triterpenos y esteroides
Test de aceite esencial	Positivo	Aceites esenciales

3.5 EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES DE LA MUESTRA “ophryosporus peruvianus” (Te Inka)

La extracción de aceites esenciales se realizó por el método de arrastre de vapor .

Se llenó el balón de 2 litros con 1300 ml de agua destilada y se cargó la columna con 250g de muestra fresca. Una vez montado el equipo se extrajo el aceite aproximadamente por 2 horas, recibiendo el aceite esencial en éter etílico. La planta presentaba la característica de formar apelmazamiento del material extraído, obstaculizando el paso del vapor de agua e impidiendo el proceso de extracción del aceite, a diferencia de otras plantas las cuales pueden ser extraídas por muchas horas, lo cual optimiza la extracción.

Luego se obtuvo la mezcla de aceite esencial y éter etílico separándose 0,5 a 0,7 ml de aceite eliminando los residuos de agua con sulfato de sodio anhidro previamente activado a 240°C.

El proceso de extracción de aceites esenciales descrito se repitió 15 veces, los cuales se indican en la tabla N°3

TABLA N°3

DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS DE LAS EXTRACCIONES DE ACEITE ESENCIAL DEL “*ophryosporus peruvianus*” (Te Inka)

Extracción	Peso de muestra (g)	Peso de aceite (g)	Porcentaje de aceite (%)
1	250	0.45	0.18
2	250	0.54	0.21
3	250	0.56	0.22
4	250	0.54	0.21
5	250	0.62	0.25
6	250	0.48	0.19
7	250	0.60	0.24
8	250	0.64	0.25
9	250	0.52	0.20
10	250	0.54	0.21
11	250	0.60	0.24
12	250	0.62	0.25
13	250	0.51	0.20
14	250	0.54	0.21
15	250	0.58	0.23
TOTAL	3750	8.34	0.22

El porcentaje de aceite esencial varía entre 0.18% (mínimo) y 0.25% (máximo).

Se reunieron las 15 porciones de aceite esencial obtenido anteriormente y se realizó una destilación fraccionada al vacío con la finalidad de eliminar el éter etílico con el que se extrajo la muestra, obteniéndose 8,2g de aceite esencial sin solvente.

3.6 SEPARACION DE COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL DEL

“*ophryosporus peruvianus*”

Las condiciones experimentales utilizadas para las pruebas cromatográficas preliminares en cromatofolios y las separaciones de compuestos en cromatografía en columna, fueron las siguientes:

Pruebas preliminares de cromatografía de capa fina (CCF):

Placas	:	Cromatofolios MERCK
Soporte	:	Sílica-Gel 60 GF ₂₅₄₋₃₆₆
Dimensiones	:	100x10x0,2 mm
Eluyentes	:	n-hexano, diclorometano
Revelador	:	Acido sulfúrico al 25%

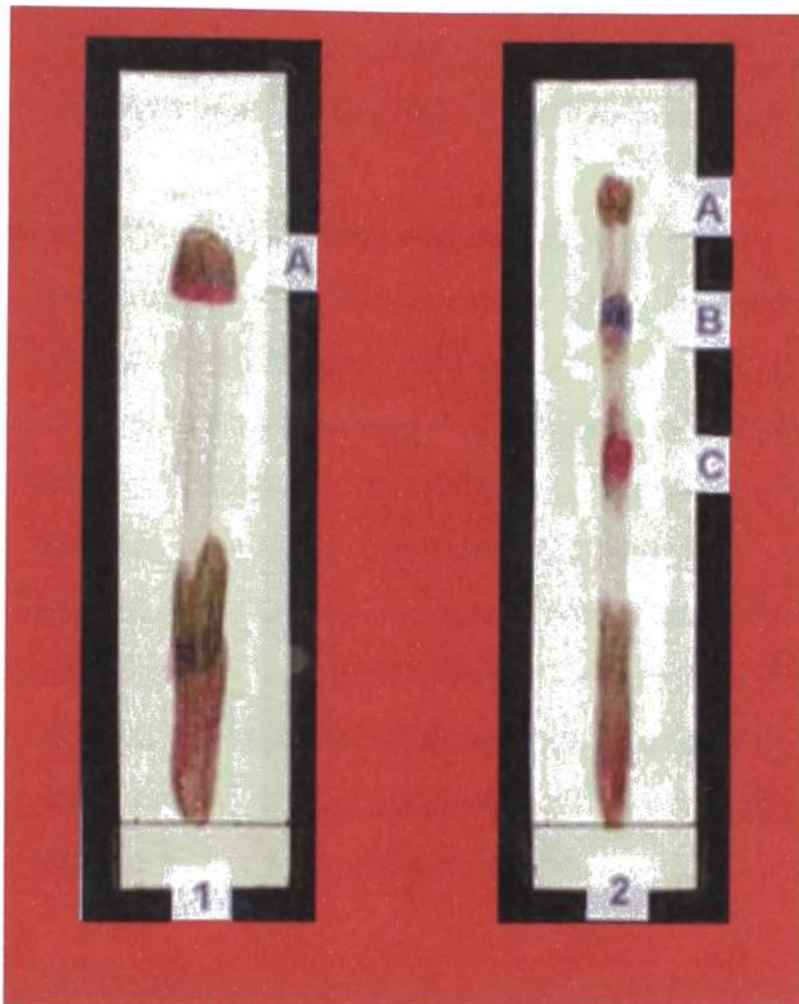
Cromatografía en columna (CC):

Soporte	:	Sílica-Gel 60 GF ₂₅₄
Dimensiones	:	400x30 mm
Eluyentes	:	Diclorometano, Metanol, Acetona

3.6.1 PRUEBAS PRELIMINARES DE CCF EN CROMATOFOLIOS

GF₂₅₄₋₃₆₆

Se realizaron algunas pruebas preliminares en los cromatofolios, y se obtuvieron los siguientes resultados:



Eluyente: n-hexano
 Revelador: H₂SO₄ 25% (ac)

Diclorometano (CH₂Cl₂)
 H₂SO₄ 25% (ac)

Cromatograma N°1

Rf (A) = 0.79

Cromatograma N°2

Rf (A) = 0.90

Rf (B) = 0.71

Rf (C) = 0.52

En los cromatogramas se observó una mancha no definida (cola extendida) por lo que se decidió metilar la muestra de aceite para separar los componentes pesados, que aparecen en la cola, y de este modo obtener mejor resolución.

Para realizar la reacción de metilación fue necesario preparar el diazometano (al instante), el cual se describe a continuación:

3.6.2 PREPARACION DE DIAZOMETANO (16)

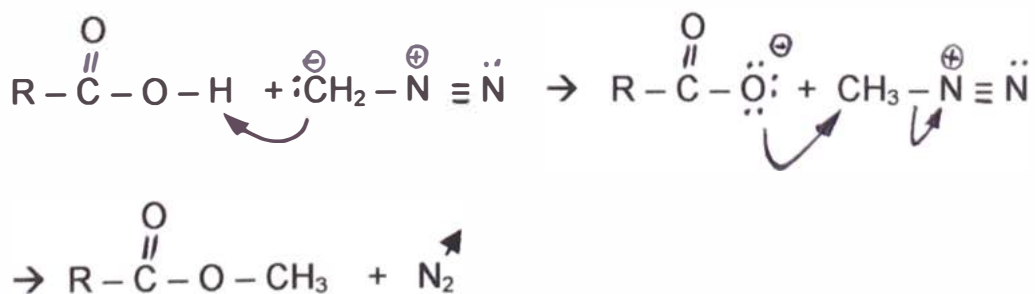
Se colocó una solución de 5g de KOH contenidos en 25ml de etanol y 7ml de agua destilada en un balón de 500ml (conectado a un condensador recto y equipado con un baño de hielo para recibir el destilado). Se adicionó una solución de 21,4g de N-metil-N-nitroso-p-tolueno-sulfonamida (DIAZALD) y 240ml de éter etílico. Se calentó en baño maría entre 60-65°C. Se destiló la solución hasta que el destilado (éter etílico) fue incoloro. La solución colectada contenía cerca de 3g de diazometano (CH₂N₂).

Este procedimiento se llevó a cabo en campana de extracción debido a la toxicidad del producto.

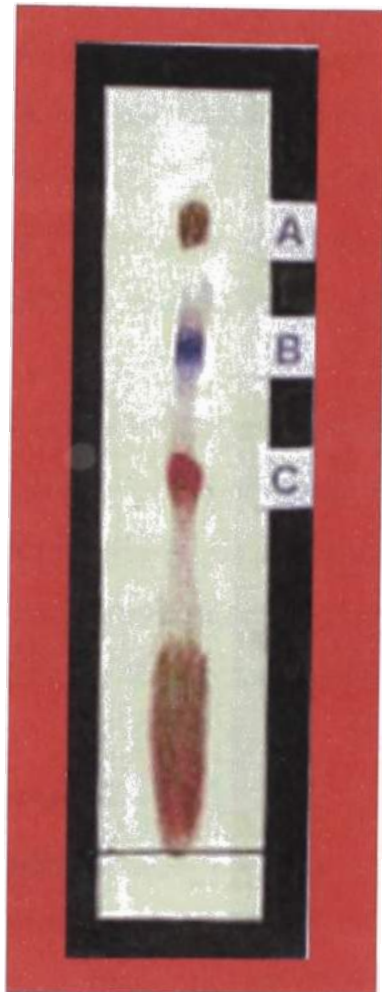
3.6.3 METILACION DEL ACEITE ESENCIAL CON DIAZOMETANO

Se disolvió 664mg de aceite en 20ml de éter etílico. Se adicionó gota a gota una solución de diazometano recién preparado (mantenido con baño de hielo), hasta que cesó el desprendimiento de gas. La solución tenía un color amarillo pálido (lo que indicaba el exceso de diazometano).

La reacción química y el mecanismo de metilación llevada a cabo es el siguiente: (17)



Se tomó la muestra metilada (solución amarilla), con un capilar y se inyectó en un cromatofolio, obteniéndose el siguiente cromatograma:



Placa	Cromatofolio GF ₂₅₄
Eluente	Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
Revelador	H ₂ SO ₄ 25% (ac)

R_f (A) = 0.88

R_f (B) = 0.69

R_f (C) = 0.51

La reacción con diazometano permitió separar los compuestos carboxilados (R-COOH) presentes en el aceite esencial, del resto de compuestos más livianos.

3.6.4 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LA MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL METILADA

Se utilizó una columna de vidrio empacada por vía húmeda con Silica-Gel 60 GF₂₅₄ , evitando la formación de burbujas o rajaduras. Esto se consiguió añadiendo primero el eluyente a la sílica y esta se mezcló poco a poco en la columna (la sílica debe tener en todo momento el disolvente, diclorometano, para evitar que se reseque).

La columna tenía en la parte inferior un pedazo de algodón, suficiente para que la sílica no se filtre.

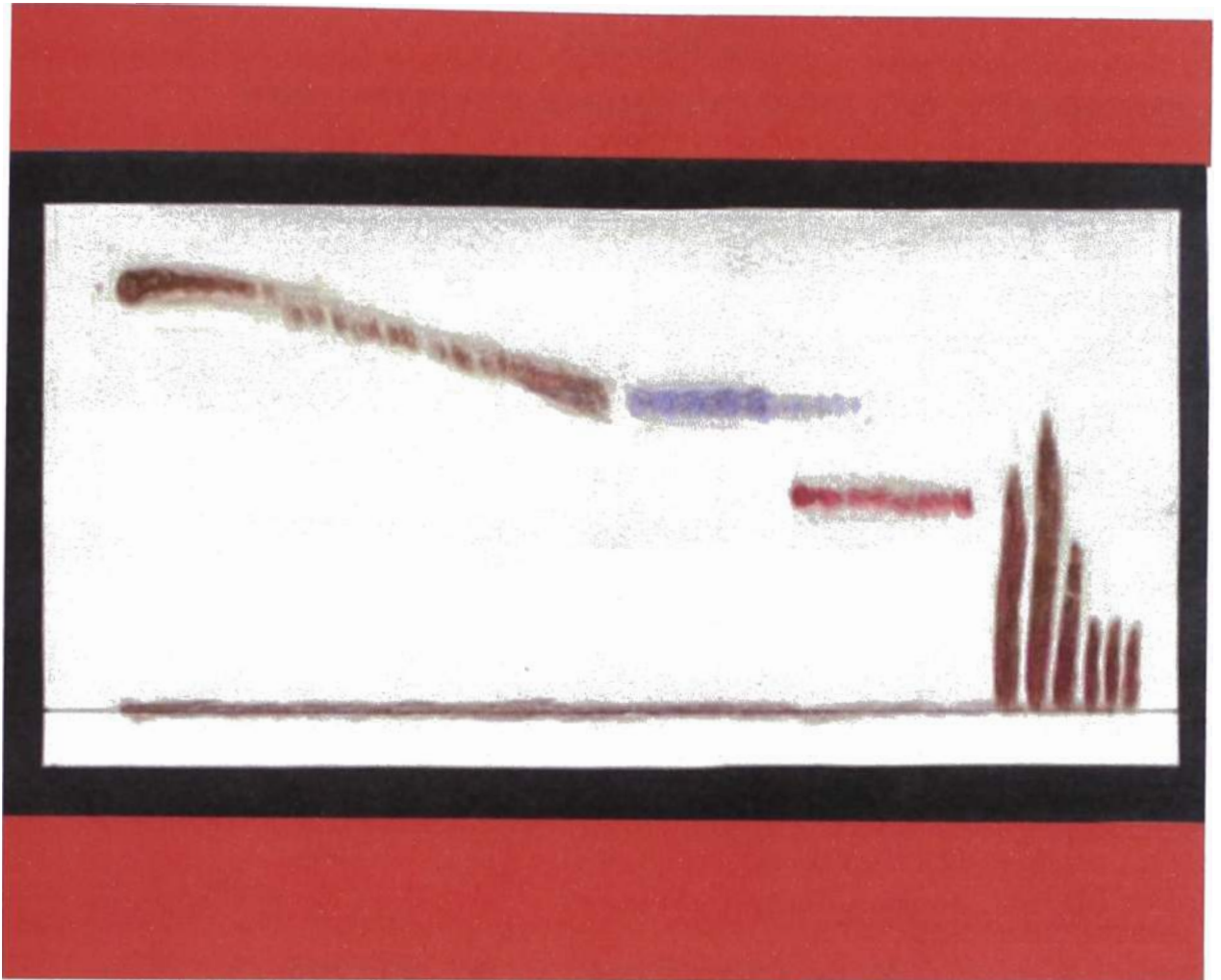
Una vez empacada la columna se procedió a aplicar la muestra disuelta en la menor cantidad posible del solvente menos polar.

La elución fue en el siguiente orden:

Diclorometano	250ml
Diclorometano : Metanol (99:1)	100ml
Diclorometano : Metanol (95:5)	100ml
Diclorometano : Metanol (90:10)	100ml

En total se obtuvieron 46 fracciones de 15ml (aproximadamente) cada una.

Se evaporaron las muestras a temperatura ambiente y se realizó una cromatografía en cromatofolios de cada fracción, obteniéndose el siguiente cromatograma comparativo (de las 46 fracciones):



Soporte	Sílica-Gel 60 GF ₂₅₄
Eluyente	Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
Revelador	H ₂ SO ₄ 25% (ac)

Se reunió los componentes semejantes, uniendo las fracciones que tenían idéntico valor de R_f o similar desplazamiento, obteniéndose 8 nuevas fracciones cuyas características se muestran en la tabla N°4:

TABLA N°4
FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE SILICA GEL

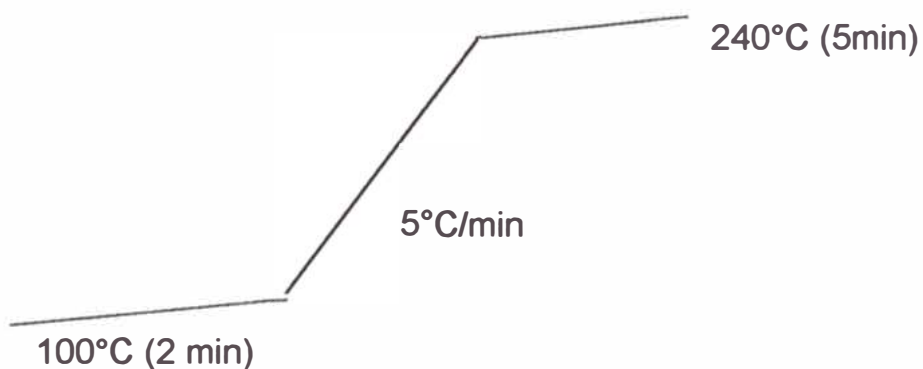
FRACCIONES	N°	Rf	PESO (mg)
3-6	F1	0.88	104.0
7-11	F2	0.82	18.8
12-17	F3	0.75	29.8
18-22	F4	0.70	24.2
23-31	F5	0.66	56.8
32-39	F6	0.45	27.0
40-43	F7	-----	112.0
44-46	F8	-----	30.0

1. ESTUDIO DE LA PUREZA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CC DE SILICA-GEL

Con la finalidad de chequear la pureza de las fracciones obtenidas se les tomó a cada una de ellas una cromatografía de gases, utilizando las siguientes condiciones experimentales:

Gas de arrastre	Helio
Soporte	Sephadex LH 20
T° inyector	180°C
T° detector	260°C

Rampa de calentamiento:



De acuerdo al resultado de los cromatogramas se trabajó con la fracción N°5, cuyo cromatograma se encuentra en el anexo N°5.

Se intentó trabajar con la fracción N°1, a la que se le realizó una nueva cromatografía en columna de sílica-gel impregnada con nitrato de plata, obteniendo nuevas fracciones, las cuales mostraron impurezas, motivo por el cual no se presentaron en este trabajo.

Las fracciones restantes no fueron trabajadas debido a la gran cantidad de compuestos presentes, las mismas que presentaron señales muy cercanas.

IV. CARACTERIZACION DE COMPUESTOS

4.1 PROPIEDADES DEL ACEITE ESENCIAL DEL “ophryosporus peruvianus”

4.1.1 CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS

Color	Amarillo verdoso
Olor	aromático
Aspecto	Consistencia aceitosa

4.1.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

1. DENSIDAD (14)

Se pesó con aproximación al diez milésimo un picnómetro de 5ml totalmente limpio y seco. Luego se agregó aceite esencial hasta el borde del picnómetro, teniendo cuidado de evitar el derrame del aceite por las paredes. Una vez lleno, se pesó repetidamente hasta obtener un valor constante.

$$\text{Densidad} = 0.88 \text{ g/ml}$$

2. INDICE DE REFRACCION (14)

Para esta determinación se utilizó el refractómetro de Abbe⁴ a temperatura igual a 20°C.

$$\text{Indice de Refracción} = 1.4885$$

Este valor indica la existencia de hidrocarburos aromáticos en el aceite esencial.

Los aceites esenciales con índice de refracción menor de 1,47 y densidad menor de 0,9, sugieren un alto contenido de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es

⁴ Refractómetro ABBE RLI NR5633

mayor que 0,9 y el índice de refracción menor que 1,47 es posible que haya compuestos oxigenados alifáticos, mientras que las que presentan índices de refracción mayores de 1,47 y densidades menores de 0,9 sugieren la existencia de hidrocarburos aromáticos. Los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos presentan densidades e índices de refracción superiores a 0,9 y 1,47 respectivamente.

3. PUNTO DE CONGELACION (14)

Se colocó aproximadamente 1ml de aceite en un tubo de ensayo de 130x10mm, el cual se unió con un termómetro de modo que la base del tubo coincidió con el bulbo del termómetro. Se colocaron ambos en un baño de hielo picado - sal y se anotó la temperatura en la cual el aceite empieza a cristalizarse.

Punto de Congelación < -10°C

4. PUNTO DE EBULLICION (14)

Se colocó aproximadamente 1ml de aceite en un tubo de ensayo de 130x10mm, el cual se unió con un termómetro de modo que la base del tubo coincidió con el bulbo del termómetro. Se colocaron ambos en un baño de aceite, calentándose progresivamente y anotando la temperatura en la cual la muestra empezó a ebullición.

Punto de Ebullición = 110 - 200°C

5. INDICE DE ACIDEZ (13)

A 1,0g de muestra se le agregó 5ml de etanol y 5 gotas de fenolftaleína, se tituló con solución etanólica de hidróxido de potasio 0,1N hasta la aparición de una coloración persistente por 30 segundos. Se hizo paralelamente un blanco.

Indice de acidez = 14 mg KOH / g

El índice de acidez representa el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1g de aceite esencial.

6. INDICE DE ESTER (13)

A 2,0g de muestra se agregó 25ml de solución etanólica de hidróxido de potasio 0,5N y se reflujo por 45 minutos. Se enfrió y se agregó 20ml de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleína. Se tituló con ácido clorhídrico 0,5N. Se hizo paralelamente un blanco.

Indice de éster = 24 mg KOH / g

El índice de éster representa el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los ésteres contenidos en 1g de aceite esencial.

7. INDICE DE SAPONIFICACION (15)

En un balón de 125ml con condensador de reflujo se agregó 1g de aceite, 25ml de alcohol isopropílico y 25ml de KOH 1N (solución alcohólica). Se sometió a reflujo 2 horas, se enfrió y luego se añadió 2 gotas de fenolftaleína. El exceso de base se tituló con una solución de HCl 0,25N.

Indice de saponificación = 47.55 mg KOH / g

El índice de saponificación representa el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar un gramo de grasa.

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

TABLA N°5
RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL
ACEITE ESENCIAL DEL “*ophryosporus peruvianus*” (Te Inka)

PROPIEDAD	RESULTADO
Densidad	0,88 g/ml
Indice de refracción	1,4885
Punto de congelación	< -10°C
Punto de ebullición	110 – 200 °C
Indice de acidez	14 mg KOH / g
Indice de éster	24 mg KOH / g
Indice de saponificación	47,55 mg KOH / g

4.1.3 REACCIONES CARACTERISTICAS DE COLORACION (13, 15)

Se realizaron las reacciones de coloración debido a que proporciona información acerca de los grupos funcionales presentes en el aceite esencial. Los ensayos fueron los siguientes:

1. ALCOHOLES (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,1g de hidróxido de potasio y 0,5ml de aceite esencial, se calentó hasta completa disolución. Luego se enfrió el tubo, se añadió 1ml de éter etílico y 0,5 ml disulfuro de carbono hasta que se observó la formación de un precipitado ligero de color amarillo.

2. ALDEHIDOS Y CETONAS (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,5ml de aceite esencial, 1ml de alcohol etílico al 95% y 2ml de solución de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNFH), se frotó la pared del tubo con una varilla y se calentó la mezcla a ebullición por 5 minutos, observándose ligera formación de un precipitado. (la preparación de reactivos se detalla en el anexo N°3)

3. PRESENCIA DE INSATURACIONES (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,2ml de aceite esencial y 2ml de tetracloruro de carbono, luego se añadió gota a gota una solución acuosa de permanganato de potasio al 0,01% y una gota de solución de carbonato de sodio al 5%, se agitó suavemente. La decoloración instantánea indicó la presencia de insaturaciones.

4. ANILLOS AROMATICOS (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,5ml de aceite esencial y 1ml de tetracloruro de carbono, se tomó 4 gotas de esta solución y se colocó en un tubo que contenía 1ml del reactivo ácido sulfúrico - formaldehído. Se formó una coloración rojo-sangre lo cual indicaba resultado positivo.

Los derivados bencénicos desarrollan coloración que va desde el naranja hasta el rojo, mientras que los derivados del naftaleno desarrollan color que va desde el azul hasta el verde.

5. COMPUESTOS FENOLICOS (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,5ml de muestra, 1ml de alcohol etílico y una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1% observándose una coloración verde lo que indicó resultado positivo.

6. PRUEBA DE TOLLENS (15)

Se colocó en un tubo de ensayo 0,5ml de muestra, se añadió gotas de reactivo de Tollens recientemente preparado y se dejó en reposo para que se produzca la reacción, observándose formación de un espejo de plata.

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

TABLA N°6
RESULTADOS DE LAS REACCIONES DE COLORACION DEL
ACEITE ESENCIAL DEL “ophryosporus peruvianus” (Te inka)

ENSAYO	RESULTADO	CARACTERISTICA	PRODUCTO
Alcoholes	Positivo	Ligero precipitado amarillo	$R - O - \overset{\text{S}}{\parallel}{C} - S - H$
Aldehídos y cetonas	Positivo	Ligero precipitado naranja	$R - NH - N = C <$
Insaturaciones	Positivo	Decoloración instantánea	$\begin{array}{c} HO \quad OH \\ \quad \\ - C - C - \end{array} + MnO_2$
Anillos aromáticos	Positivo	Color rojo sangre	$Ar - CH_2^+ \text{ (complejo)}$
Compuestos fenólicos	Positivo	Color verde	$[Ar - O]_3 Fe$
Prueba de Tollens	Positivo	Espejo de plata	$R - COO^- + Ag + NH_3$

4.2 ESPECTROSCOPIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL “*ophryosporus peruvianus*” (antes de la metilación)

Los análisis espectrales tomados al aceite esencial purificado del *ophryosporus peruvianus*, muestran los siguientes resultados:

a. ESPECTRO IR (espectro N°1, anexo N°4)

Equipo	:	Perkin Elmer
Laboratorio	:	Laboratorio Químico – TECSUP
Operador	:	Personal del Laboratorio
Fecha	:	22.11.98

Características del Espectro

ν^{-1} (cm⁻¹)

3400	grupos -OH
2955, 2924, 2862	grupos -CH, -CH ₂ , -CH ₃
1691, 1646	estiramientos C = C
1376, 1256	estiramientos C - O
887	flexión -C = CH ₂

b. ESPECTRO UV (espectro N°2, anexo N°4)

Equipo	:	Perkin Elmer, Spectrofotometer UV/VIS Lambda 3B
Laboratorio	:	Laboratorio Químico – TECSUP
Operador	:	Carlos Montenegro
Fecha	:	22.11.98
Solvente	:	Metanol

Características del Espectro

Máximo de absorción λ max. 403nm

c. CG – MS (cromatograma N°1, anexo N°4)

Equipo	Hewlett Packard 5890 Serie II
Laboratorio	Laboratorio de investigación Universidad de Sao Paulo – Brasil
Operador	Personal de Laboratorio
Fecha	09.02.01

Características del cromatograma

El CG muestra 28 picos (compuestos) de mayor abundancia, con un tiempo de retención desde 3,5 hasta 28,3 minutos.

La espectroscopía de masas muestra los espectros de 22 compuestos del total de 28, todos ellos con valores de masa entre 150 y 220 m/z, a excepción de los dos últimos compuestos que presentan señales sobre 250 m/z.

4.3 COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DEL “*ophryosporus peruvianus*”

De acuerdo a los resultados espectrales, se procedió a identificar al compuesto presente en la fracción N°5 del aceite esencial del “*ophryosporus peruvianus*”, el cual se detalla a continuación:

4.3.1 ESTUDIO CROMATOGRAFICO Y ESPECTRAL DEL COMPUESTO DE LA FRACCION N°5

Esta fracción muestra un componente en la cromatografía de capa fina, la cual se muestra en el siguiente cromatograma:



Placa Cromatofolio
Eluyente DCM : MeOH (10:1)
Revelador H₂SO₄ 25% (ac)

R_f = 0.84

A. CROMATOGRAFIA DE GASES (cromatograma N°2, anexo N°5)

Equipo Hewlett Packard 5890 Serie II
Laboratorio Laboratorio de investigación
 Universidad de Sao Paulo – Brasil

Operador : Personal de Laboratorio
Fecha : 04.01.01

Característica del cromatograma

Presenta una señal:

Fracción	Compuesto	Tr (min)
F5	FA	17,1

A la fracción F5, en la cual se observa un compuesto puro, se le denominó **compuesto FA**

B. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN-¹H, RMN-¹³C): COMPUESTO "FA".

Espectro de RMN-¹H (espectro N°3, anexo N°5)

Equipo : Varian – Inova 300 MHz
Laboratorio : Laboratorio de Investigación
Universidad de Sao Paulo – Brasil
Operador : Personal de Laboratorio
Fecha : 04.01.01
Solvente : CDCl₃

Características del Espectro

Señal (ppm)	Multiplicidad
0,97	singulete
0,99	singulete
1,22	singulete
2,89	doble doblete
4,88 – 4,97	doblete

Espectro de RMN-¹³C (espectro N°4, anexo N°5)

Equipo	:	Varian – Inova 300 MHz
Laboratorio	:	Laboratorio de Investigación Universidad de Sao Paulo – Brasil
Operador	:	Personal de Laboratorio
Fecha	:	04.01.01
Solvente	:	CDCl ₃

Características del espectro:

Señal (ppm)	Característica
152	zona olefínica
113	zona olefínica
64	carbonos epoxidados

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 ACEITE ESENCIAL DEL “*ophryosporus peruvianus*”

5.1.1 ESPECTROSCOPIA

El CG-MS, IR y UV tomados al aceite esencial, muestran los siguientes resultados experimentales:

El CG-MS presenta señales cuyos valores de tiempos de retención (Tr) están entre 3,5 hasta 28,3 minutos. Las señales que aparecen entre 3,5 y 7 minutos pueden corresponder a monoterpenos, las que aparecen entre 7 y 13 minutos a sesquiterpenos, entre 13 y 17 minutos a sesquiterpenos oxigenados y mayores de 17 a compuestos mas pesados como diterpenos. (22)

El espectro IR presenta señales en 3400cm^{-1} , característicos de grupos OH-, señales en 2955, 2924 y 2862cm^{-1} que corresponden a grupos -CH, -CH₂-, -CH₃, 1691, 1646cm^{-1} a estiramientos C=C, 1376, 1256cm^{-1} estiramientos C - O y señal en 887cm^{-1} que corresponde a flexión - C = CH₂. (18)

El espectro UV muestra una señal ancha en 403nm, lo que indica la presencia de compuestos con muchas insaturaciones y grupos aromáticos. (18)

5.1.2 PROPIEDADES DEL ACEITE ESENCIAL

De acuerdo a los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial del *ophryosporus peruvianus* observamos lo siguiente:

La densidad del aceite (0,88 g/cc) y el índice de refracción (1,4885), nos sugieren la presencia de hidrocarburos terpénicos e hidrocarburos aromáticos. (14)

El punto de ebullición relativamente alto (110 – 200°C) nos sugiere la existencia de sesquiterpenos.

Los valores obtenidos para el índice de acidez indican la presencia de hidrógenos libres, el índice de éster y de saponificación in-

dican la presencia de compuestos con grupos -COOR y de grupos saponificables.

5.2 COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL

5.2.1 FRACCION N°5 (compuesto "FA")

El cromatograma de esta fracción muestra una señal con un $T_r = 17,1$ minutos (cromatograma N°2, anexo N°5)

El CG-MS (cromatograma N°1, anexo N°4) presenta un $T_r = 14,4$ minutos⁵, cuyo espectro de masas correspondiente (espectro N°5, anexo N°5) muestra un $M^+ = 220$, y algunos picos característicos de algunos grupos:

$m/z = 205$ (pérdida del grupo metilo)

$m/z = 93$ (C_7H_9)

$m/z = 79$ (C_6H_7)

$m/z = 55$ (C_4H_7)

El espectro de RMN-¹H (Espectro N°3, anexo N°5) presenta señales características de protones de grupos metilénicos terminales en 4,88 y 4,99 ppm (dobletes), las señales que aparecen en 1,01 ppm (singulete) y 1,03 ppm (singulete) corresponden a protones metílicos. La señal que aparece en 1,22 ppm (singulete) puede corresponder a un protón metílico unido a un carbono oxigenado (22). También aparece una señal a 2,90 ppm (doble doblete).

El índice de deficiencia de hidrógeno para este compuesto (considerando un sesquiterpeno) es igual a 4. Como lo muestra el espectro de RMN-¹H, el compuesto presenta insaturaciones, que podría ser 1, para este caso debería existir 3 anillos, y en el caso que existan 2 insaturaciones deberían existir dos anillos.

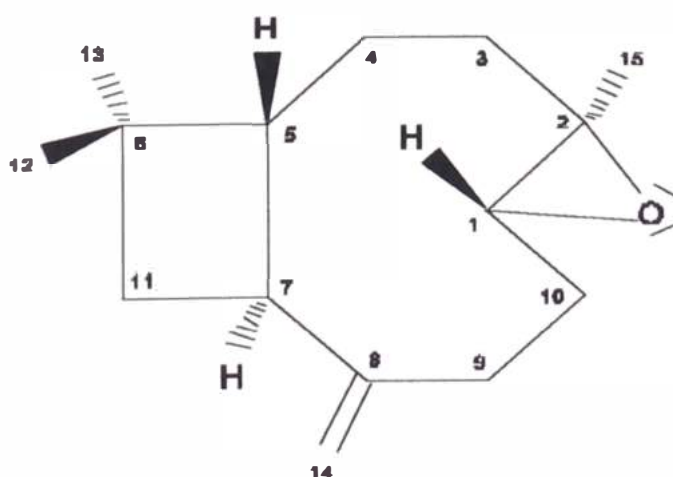
⁵ La diferencia en el tiempo de retención de los cromatogramas del mismo compuesto, se debe a las diferentes condiciones experimentales en las que fueron tomadas

El espectro de RMN-¹³C (espectro N°4, anexo N°5) presenta señales en la zona olefínica en 113 y 152 ppm; presencia de un carbono epoxidado en 64 ppm ; señales de grupos metílicos de carbono cuaternario en 17,2; 21,8 y 30,1 ppm. (17).

El espectro de RMN-¹³C muestra en total 15 señales bien definidas, lo que confirma la presencia de un compuesto sesquiterpenoide.

Comparando los datos espectrales con la referencia bibliográfica (17, 19, 20, 21, 23) identificamos el siguiente compuesto FA como el trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno, cuya estructura es la siguiente:

TRANS-1(2)-EPOXI-8(14)-CARIOFILENO



VERIFICACION DE ESTRUCTURA

Con el propósito de verificar la estructura, en la tabla N°7 se muestra los datos comparativos de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C obtenidos experimentalmente con los datos teóricos (17, 19, 20, 21, 23).

TABLA N°7

DATOS COMPARATIVOS DEL RMN- H Y RMN- C DEL TRANS-1(2)-EPOXI-8(14)-CARIOFILENO Y EL COMPUESTO FA

C	RMN- ¹³ C teórico	RMN- ¹³ C experimental		RMN- ¹ H teórico	RMN- ¹ H experimental
1	57.0	60.1	CH	2.89 (dd)	2.90
2	61.3	64.0	C		
3	35.4	34.2	CH ₂		
4	27.6	27.4	CH ₂		
5	50.4	50.9	CH		
6	41.5	40.0	C		
7	48.1	48.9	CH		
8	154.3	152.0	C		
9	33.9	30.1	CH ₂		
10	27.6	27.4	CH ₂		
11	39.7	39.4	CH ₂		
12	31.0	30.4	CH ₃	0.99 (s)	1.03
13	26.8	30.0	CH ₃	0.97 (s)	1.01
14	108.2	113.0	CH ₂	4.86 – 4.97	4,88 – 4.99
15	19.7	17.2	CH ₃	1.2(s)	1.22

Para determinar la posición trans del compuesto, se hizo una comparación de los desplazamientos RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto FA con el compuesto cis-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno, el cual se muestra en la tabla N°8. Adicionalmente mostramos los datos del β-cariofileno. (17)

TABLA N°8

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE RMN-¹³C DEL β-CARIOFILENO Y CIS-1(2)-EPOXI-8(14)-CARIOFILENO

Carbono	β-cariofileno		Cis-epoxi-cariofileno
1	120.6	CH	61.0
2	137.4	C	55.8
3	40.3	CH ₂	36.6
4	28.9	CH ₂	27.5
5	52.8	CH	53.8
6	33.5	C	35.0
7	48.4	CH	47.8
8	154.0	C	152.7
9	29.2	CH ₂	29.5
10	34.3	CH ₂	30.5
11	40.2	CH ₂	37.7
12	22.5	CH ₃	21.6
13	30.0	CH ₃	22.5
14	112.0	CH ₂	112.1
15	17.0	CH ₃	18.8

Observamos algunas diferencias con el trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno. El β -cariofileno presenta variaciones sobre todo en los carbonos 1 y 2 debido a la posición del doble enlace. El cis-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno presenta ligeras variaciones en los carbonos 1 , 2 por lo que se puede concluir y verifica la estructura del trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno, cuyas propiedades físicas y actividad biológica se muestran en el anexo N°6.

VI CONCLUSIONES

1. El estudio realizado en la planta "*ophryosporus peruvianus*" (Te Inka), constituye un primer aporte al estudio químico de principios activos de esta planta.
2. El CG-MS del aceite esencial del "*ophryosporus peruvianus*", muestra 28 señales, de las cuales 22 corresponden a compuestos de mayor porcentaje y 6 señales a compuestos en menor proporción. Dentro de estas 28 señales se identificó 1 compuesto, cuyas estructura corresponde:

Compuesto FA trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno

3. El compuesto identificado del aceite esencial de esta planta, trans-1(2)-epoxi-8(14)-cariofileno, de acuerdo a la bibliografía [\(24, 25\)](#) presenta las siguientes actividades biológicas:
antiinflamatoria, antiedémica, antitumoral, fungicida e insecticida.

VII RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de los compuestos del aceite esencial del “*ophryosporus peruvianus*”. El trabajo realizado permitió la identificación de 1 compuesto de un total aproximado de 28 que se observan como señales en el CG-MS.
2. Continuar con el estudio de los principios activos del “*ophryosporus peruvianus*” (alcaloides, sesquiterpenlactonas, triterpenos, esteroides y flavonoides), identificados en la marcha fitoquímica.
3. Verificar la actividad biológica de la planta “*ophryosporus peruvianus*” de acuerdo a los compuestos identificados y aplicarlos tanto en la medicina tradicional como científica.
4. Difundir el conocimiento de las propiedades del “*ophryosporus peruvianus*”, como una planta silvestre medicinal oriunda del Perú, para que pueda ser utilizado por la población como una alternativa al alivio de algún dolor o enfermedad.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Montes, Marco; Wilkomirsky, Tatiana; Valenzuela, Lucy, "Plantas Medicinales", Ediciones Universidad de Concepción, Concepción 1992, 207p.
2. Soukup, Jaroslav, "Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros", Editorial Salesiana, Lima 1976 .
3. Limaylla Aguirre, Clemente, "Química de los Productos Naturales", Tomo I, Ediciones Vicente, Ayacucho 1984, 92p.
4. Tejada Rodriguez, Manuel, "Ensayos químicos en el aceite esencial del *Mintostachys Spicata*", TESIS, Lima 1980, 53p.
5. Gros, Eduardo; Pomilio, Alicia, "Introducción al estudio de los Productos Naturales", Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Editora Eva V. Chesneau, Washington D.C 1985, 145p.
6. Randerath, Kurt, "Cromatografía en capa fina", Editorial URMO S.A, Bilbao 1974, 291p.
7. Pavia D. L. y G. Kriz, "Química Orgánica Experimental", Editorial Universidad de Barcelona, Barcelona 1978, pag. 138-141.
8. D. Stambux, Jorge; "Manual Práctico de Cromatografía de Gases"; Perkin Elmer Corporation, 1970, 38p.
9. McNair, Harold; "Cromatografía de Gases"; Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos" (OEA); Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico"; Washington D.C 1981.

10. Joseph-Natan, Pedro; "Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1 y Carbono-13"; Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos OEA, Programa Regional de Apoyo Científico y Tecnológico; Washington DC; 1973.
11. Skoog, Douglas; Larry, James; "Análisis Instrumental"; Editorial Mc Graw-Hill, cuarta edición, España 1,997, 935p.
12. Morcillo Rubio, Jesus; "Espectroscopia Infrarroja"; Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos OEA, Editorial Eva V. Chesneau; Washington DC 1980, 80p.
13. Lock de Ugaz, Olga, "Investigación Fitoquímica", Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, segunda edición, Lima 1994, 300p.
14. Dominguez, Xorge, "Métodos de Investigación Fitoquímica", Editorial Limusa, México 197 , 281p.
15. Gibaja Oviedo, Segundo, "Guía para el análisis de los compuestos de carbono", UNMSM Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones, Lima 1977, 215p.
16. Fieser, Louis; Fieser, Mary; "Reagents for Organic Synthesis"; Editorial John Wiles and Sons, INC; 1967.
17. Verónica Nuñez, Cecilia, "Sesquiterpenos e Esteroides da Gasca do Tronco de Guarea Guidonia (L.); Maestrado, Universidade de Sao Paulo, 1996.
18. E. Prescott, W. Simons; "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos"; Editorial Alhambra S.A, España 1989.

19. Yutaka Orihara, Kenji Saiki and Tsutomu Furuya; *Phytochemistry* (35) 635-639, 1994.
20. Simon F. R. Hinkley, Nigel B. Perry and Rex T. Weavers; *Phytochemistry* (35), 1489 - 1494, 1994.
21. Robert P. Adams, "Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy", Academic Press, INC 1989.
22. Barboza Brochini, Claudia; "Terpenos de Guarea Guidonia", Tese de Doutorado, Universidade de Sao Paulo, Instituto de Química, 1997.
23. Hans-Jorg Schneider, Pawan K. Agrawal; "Magnetic Resonance in Chemistry"; Vol. 1 (24), 718 – 722, 1986.
24. Multiple Activities, Modulo 18, [www.rrz.uni-amburg.de/biologie/byonline / library/drduke/module18.htm](http://www.rrz.uni-amburg.de/biologie/byonline/library/drduke/module18.htm)..
25. Dr. Duke's, "Phytochemical and Ethnobotanical database", Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland 2001.
26. A. Ulubelen, G. Topeu, C. Eris, M. Kartal, S. Kurucu and Bozoc-Johansson; *Phytochemistry* (36), 971 – 974, 1994
27. G. Ourisson, S. Hunavalli, C. Ehret; "Selected Constants Sesquiterpenoids" Editorial Pergamon Press, Samaceta – Paris 1966; 70p.