

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



**ESTUDIO DE ACEITES ESENCIALES EN LA ESPECIE**  
***Tagetes elliptica Smith* (chinche)**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR:**  
**ERIKA BEATRIZ LOPEZ AGUILAR**

**ASESOR**  
**MSc. OTILIA ACHA DE LA CRUZ**

**LIMA – PERÚ**

2010

A ti Dios que eres mi luz  
y a mi madre a quien le debo todo.

Dedico esta tesis a mis padres por su invaluable  
apoyo durante mi formación profesional  
a mis hermanos que siempre los tengo presente

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi asesora de tesis Msc. Otilia Acha de la Cruz por el apoyo en la investigación de mi tesis, al Dr. Lothar Hennig, del Instituto de Leipzig-Alemania por la purificación del compuesto principal encontrado en el aceite esencial de la planta en estudio, a la Lic. Koralí Durand por llevar mis muestras al Instituto de Leipzig-Alemania y traer los espectros impresos, al Dr. Nino Castro de la Pontificia Universidad Católica del Perú por su apoyo constante en este trabajo de investigación, al Lic. Golfer Muedas por su colaboración en material bibliográfico, a la Sra. Soila Tasilla, Ing. Marcelino Davila, por su constante apoyo en los reactivos y consejos en esta investigación, a la Msc. Virginia Torpoco por su apoyo en la corrección de mi tesis y colaboración de material bibliográfico, y a mis amigos y amigas que de una u otra manera contribuyeron con el desarrollo de este trabajo de investigación, y sobre todo a mi hermana Lic. Miriam López por su colaboración en la recolección de la planta en estudio.

## INDICE

<b>I. ASPECTOS GENERALES</b>	<b>1</b>
A. INTRODUCCION	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	2
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	<b>4</b>
A. ASPECTOS BOTANICOS DEL GENERO TAGETES	5
1. Tagetes elliptica	5
2. Otras especies del genero Tagetes	6
2.1 Tagetes minuta	6
2.2 Tagetes erecta	7
2.3 Tagetes lucida (Pericón)	7
2.4 Tagetes patula	8
B. ACEITES ESENCIALES	9
1. Introducción	9
1.1 Definición	9
1.2 Composición Química	10
1.3 Clasificación	10
2. Métodos de extracción de aceites esenciales de plantas	11
2.1 Extracción por arrastre de vapor de agua	11
2.2 Extracción por solvente	12
2.3 Extracción por centrifugación	12
2.4 Extracción por fluido supercrítico (EFS)	12
2.5 Extracción por expresión	13
3. Análisis de aceites esenciales	13
3.1 Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica)	13
3.2 Análisis físico-químico u otros	13
i. Características Organolépticas	13
ii. Características Físicas	13
iii. Calidad de los Aceites Esenciales	13
iv. Determinación de Propiedades Físico-Químicas del Aceite Esencial	14
a. Índice de Refracción	14

b. Densidad	14
c. Índice de Acidez	14
d. Índice de Ester	15
e. Índice de Saponificación	15
f. Punto de ebullición	16
g. Punto de congelación	16
h. Humedad	17
i. Cenizas	17
4. Métodos cromatógrafos de purificación de aceites esenciales	18
4.1 La cromatografía en capa fina – CCF	18
4.2 La cromatografía de columna	19
4.3. Cromatografía de gases	19
5. Identificación de los constituyentes del aceite esencial	21
5.1 Espectrometría de masa	21
5.2 El acoplamiento de la espectrometría de masas con la cromatografía de gases	25
5.3 Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, RMN <sup>1</sup> H	26
5.4 Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono, RMN <sup>13</sup> C	28
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
A. COLECCIÓN DE LA MUESTRA	30
B. DETERMINACION SISTEMATICA (IDENTIFICACION BOTANICA)	30
C. ANALISIS CUALITATIVO DE PRINCIPIOS ACTIVOS	31
1. Tratamiento Preliminar	31
2. Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica)	31
a. Muestra	31
b. Procedimiento	31
c. Resultado	31
D. EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA DE CHINCHE	31
D.1 Procedimiento de extracción	31

D.2	Resultados	32
D.3	Características del aceite esencial	32
1.	Constantes Físico químicas del Aceite Esencial	32
2.	Características organolépticas	33
3.	Reacciones de coloración de grupos funcionales	33
E.	ANALISIS CROMATOGRAFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA <i>Tagetes elliptica Smith</i> (chinche)	34
1.	Cromatografía de gases	34
2.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC-EM)	37
F.	PURIFICACIÓN CROMATOGRAFICA DEL ACEITE ESENCIAL	38
1.	Análisis preliminar por cromatografía de capa fina –CCF	38
2.	Cromatografía en columna – CC (Perú)	39
3.	Cromatografía en columna – CC (Alemania)	40
G.	IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA DEL OXIDO DE MYRCENO	41
1.	Espectro de Masas	41
2.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del Oxido de myrceno	43
3.	Espectros RMN <sup>13</sup> C del Oxido de myrceno	46
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>59</b>
Anexo N°1	Estrutura aisladas del Género tagetes	60
Anexo N°2	Marcha fitoquímica preliminar (Rondina & Coussio,1969)	63
Anexo N°3	Resultados de la marcha fitoquímica preliminar	83
Anexo N°4	Características del equipo de arrastre de vapor	84
Anexo N°5	Variación del volumen del aceite esencial con relación al tiempo	85
Anexo N°6	Características del aceite esencial y sus componentes	86
Anexo N°7	Recolección de la muestra	94
Anexo N°8	Constancia de identificación botánica	95

Anexo N°9 Equipo de destilación de arrastre de vapor y separación del aceite esencial en el vaso florentino	96
Anexo N°10 Cromatografía de capa fina	97
Anexo N°11 Cromatografía de columna	98
Anexo N°12 Espectros de masa componentes del aceite esencial de la planta de chinche	99

## FIGURAS

Figura 1 Diagrama de un cromatografo de gases	19
Figura 2 Espectro de masa del Oxido de myrceno	23
Figura 3 Cromatograma de gases del aceite esencial de la planta <i>Tagetes elliptica Smith</i> (chinche)	35

## TABLAS

Tabla I Estructura de los compuestos del acete esencial	22
Tabla II Desplazamientos químicos (d,ppm) de los átomos de hidrogeno en el espectro RMN <sup>1</sup> H del Oxido de myrceno en CDCL <sub>3</sub> (teórico)	27
Tabla III Desplazamientos químicos (d,ppm) de los átomos de carbono del Oxido de myrceno en CDCL <sub>3</sub> (teórico)	28
Tabla IV Rendimiento del aceite esencial a presión atmosférica	32
Tabla V Reacción de coloración	33
Tabla VI Principales contituyentes del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> mediante cromatografía de gases(ver figura 3)	36
Tabla VII Desplazamientos químicos (d,ppm) de los átomos de hidrogeno en el espectro RMN <sup>1</sup> H del Oxido de myrceno en CDCL <sub>3</sub> Espectros 2 (experimental)	44
Tabla VIII Desplazamientos químicos (d,ppm) de los átomos de carbono en el espectro RMN <sup>13</sup> C del Oxido de myrceno en CDCL <sub>3</sub> Espectros 3 (experimental)	47

## ESPECTROS

Espectros 1 Espectro de massa del Oxido de myrceno	42
Espectros 2 RMN <sup>1</sup> H (a 600 MHZ, en CDCL <sub>3</sub> ) del Oxido de myrceno	45
Espectros 3 RMN <sup>13</sup> C (a 600 MHZ, en CDCL <sub>3</sub> ) del Oxido de myrceno	48



## **I. ASPECTOS GENERALES**

## A. INTRODUCCION

La presente investigación constituye el estudio químico del aceite esencial presente en la planta *Tagetes elliptica (chinche)*, planta silvestre que se distribuye en valles del Perú Andino (Canta, Huancayo, Chancay, etc.) y en la selva alta. Su hábitat natural está entre los 1000 a 4500 m.s.n.m. El aceite esencial de esta planta se encuentra principalmente en sus hojas y tallos jóvenes. Los aceites esenciales presentes en miembros de la misma familia (Asteraceae) son muy utilizados como condimentos, y tienen aplicación medicinal para el alivio de los cólicos estomacales, dismenorrea y carminativo.

El material fresco necesario para el estudio fue recolectado en el distrito de Huaros, provincia de Canta, departamento de Lima, Perú, ubicado a 3500 m.s.n.m aproximadamente, en octubre del 2005.

Este estudio de investigación comprende la evaluación de los métodos de extracción por arrastre de vapor de agua para la obtención del aceite esencial de la planta *Tagetes elliptica Smith* (chinche), la purificación cromatográfica (cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía de gases) y la identificación espectroscópica (espectro de masas, resonancia magnética nuclear RMN<sup>1</sup>H, resonancia magnética de RMN<sup>13</sup>C).

## B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. El aislamiento e identificación (espectroscópica) del Oxido de myrceno (2,2-dimetil-3-(3-metilenepent-4-enyl) oxirano) del aceite esencial del chinche (*Tagetes elliptica Smith*)
2. El análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los “Principios Activos” de la planta de chinche.

Nuestro objetivo principal es el aislamiento e identificación del principal componente contenido en las hojas y tallos del aceite esencial del chinche, que nos llevó al estudio y

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento y de las técnicas de identificación espectroscópicas.

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación.

Así, se describirán métodos de cromatografía de capa fina y de columna. Asimismo, se describe la aplicación de espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear de hidrogeno RMN<sup>1</sup>H, de carbono RMN<sup>13</sup>C, en la identificación de la estructura molecular.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

## **A. ASPECTOS BOTANICOS DEL GENERO TAGETES**

El género *Tagetes* tiene 60 especies, pertenece a la familia (Asteraceae) y son nativos de la zona que se extiende desde el Sudoeste de Estados Unidos, México, en toda América del Sur, Australia, Europa y Perú. También es cultivada en la India, en particular la especie *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*.

Existen varios tipos de *Tagetes* de los cuales son: *Tagetes elliptica*, *Tagetes minuta*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes patula*. (Gupta, Y.C. 2002).<sup>20</sup>

### **1. *Tagetes elliptica***

**a. Hábitat:** Es una planta nativa de la sierra del Perú, se la encuentra entre 1 000 – 4 500 m.s.n.m. es silvestre y cultivada.

**b. Nombres comunes:** chinche, chincho, chikchimpa, chinchuca, huacatay, monte huacatai (y), sinsu, shilshil, yacuchinchu(o). Los *Tagetes elliptica*, conocida popularmente como chincho en la provincia de Huanuco, y chinche en la provincia de Canta-Lima

**c. Descripción:** hierba perenne, erecta acespitosa, glabra, hasta 1,80m de alto; hojas opuestas, pinnatisectas, y con glándulas oleíferas; flores numerosas en capítulos dispuestos en cimas corimbiformes terminales, amarillas; fruto en aquenio fusiforme, semillas negras. Toda la planta presenta o tiene un olor fuerte y característico.

**d. Usos alimenticios:** las hojas y brotes tiernos como en ajíes, guisos, asados, pachamanca, etc.

**e. Usos medicinales:** casos de dismenorrea (las hojas). Constituirse en el profiláctico y terapéutico mas recomendado por los médicos veterinarios para el control y tratamiento de la terrible salmonelosis (Brack, Antonio. 2003).<sup>5</sup>

**f. Composición Química:** Contiene Flavonoides, aceites éteres, diterpenos, polienos, tiofenos y sus propiedades medicinales es carminativo, dismenorrea, cólicos estomacales (Agapito, T. et.al. 2004).<sup>1</sup>

En el extracto metanolico se aislaron dos nuevos Glucósidos de flavonoles quercetina 3-(3'',6''- diacetilgalactósido) y quercetina 3-(2'',3'', 4''-triacetilgalactósido) (D'Agostino, M. et.al.1992).<sup>9</sup>

## **2. Otras especies del genero Tagetes**

**2.1 *Tagetes minuta***, nativa de América del Sur incluida Colombia han tenido mayor desarrollo como cultivo en Brasil y Argentina. Pero Brasil es el mayor exportador de su aceite esencial para perfumería. (Soule, J.A. 1993).<sup>55</sup>

### **2.1.1 Componentes comunes del aceite esencial en hojas y flores**

Tagetona,  $\beta$ -ocimeno

### **2.1.2 Componentes especifico del aceite esencial en hoja y flores**

#### **a. Hojas**

Dihydrotagetone,  $\alpha$ -felandreno, limoneno, o-cymeno, así como los isómeros de  $\beta$ -ocimeno, tagetona y tagetenona (Gil, A. et.al. 2000).<sup>18</sup>

#### **b. Flores**

(z)- $\beta$ -ocimeno (38,77%), dihydrotagetona (9,07%), (z)-tagetona (7%), (z)-ocimenona y (s)-ocimenona (20%) (Garg, S.N. et.al. 1998).<sup>14</sup>

## **2.2 *Tagetes erecta***

### **2.2.1 Componentes comunes del aceite esencial en hojas y flores**

Piperitona, piperitenona y limoneno

### **2.2.2 Componentes especifico del aceite esencial en hojas, tallos y flores**

**a. Hojas**

Piperitona (50.7%), piperitenona (13.2%) y (E)- $\beta$ -ocimeno (6.7%) (Ogunwande, Isiaka A. et.al. 2006).<sup>38</sup>

**b. Flores**

1,8-cineol (23.1%),  $\alpha$ -pineno (11.8%),  $\alpha$ -terpineol (10.7%), piperitona (8.0%) y sabinene (5.6%) (Ogunwande, Isiaka A. et.al. 2006).<sup>38</sup>

Limoneno,  $\beta$ -cariofilene, metileugenol, (E)-ocimeno, piperetona, piperitenona y  $\alpha$ -terpinoleno (Gutiérrez, R. et.al. 2006).<sup>21</sup>

(Z)- $\beta$ -ocimeno (42.2%), dihidrotagetona (14.3%), (Z)-tagetona (8.3%), limoneno (7.3%), (E)-ocimenona (6.1%) y (Z)-ocimenona (5.3%) (Singh, Gurdip. et.al. 2003).<sup>53</sup>

**c.- Hojas, tallos y flores**

$\beta$ -cariofileno (8.5 y 35.2%), terpinoleno (18.4 y 6.3%), (E)-ocimenona (12.6 y 9.8%), (Z)- $\beta$ -ocimeno (10.4 y 13.7%), piperitenona (10.4 y 2.6%), (Z)-ocimenona (5.5 and 7.7%) y limoneno (6.2 y 2.5%) (Sefidkon, F. et.al. 2004).<sup>51</sup>

**2.3 *Tagetes lucida* (Pericón)**, En Honduras existe la costumbre de agregar "Pericón" al aguardiente nacional llamado "guaro" y se guarda en recipientes oscuros. Después de algún tiempo de añejamiento el guaro adquiere una coloración verde y un sabor que recuerda al anís. Investigadores mexicanos han informado que esta planta compuesta de la familia asterácea fue usado por los indios Náhuatl y Huichol con el objeto de embrutecer los sentidos de las víctimas de sus sacrificios humanos y como un psicotrópico cuando se fumaba combinado con tabaco silvestre: Nicotina rústica. Le llamaban Yahutli, Tumutsali, etc. Algunos estudios fotoquímicos han revelado que contienen coumarinas lactonas y terpenos (Cambar, P. 1984).<sup>6</sup>

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

La flor y la hoja tienen aceite esencial compuesto por 16.5% de limoneno, 14%  $\beta$ -ocimeno, 28%  $\beta$ -cariofileno, 4-5% mircenol, tagetona, dihidrotagetona, tetrahidrotagetona, estragol (alta proporción), éter metílico de eugenol, linalool, alil-anisol y anetol. Las hojas se usan para infusión (IICA, CEDEMETRA. 2005).<sup>12</sup>

Es una hierba que crece en América central y del Sur, su aceite esencial se caracteriza por estragol, metileugenol y anetol. Su aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y se analizó por GC, dos fases estacionarias y CG-MA con diferentes técnicas de ionización, siendo sus principales componentes anetol (23,8%), el metileugenol (24,3%) y el estragol (33,9%) (Bicchi, C. et al. 1997).<sup>2</sup>

El estragol es el componente principal (55-89%) en el aceite esencial, pero pinene, linalool, anetol, eugenol metil éster,  $\beta$ -farneseno,  $\beta$ -ionona, guajol y terthienyl también fueron detectadas, el estado de la hierba seca contiene aceite esencial 0,08-1,48% (Galambosi, B. et al. 2004).<sup>15</sup>

**2.4 *Tagetes patula***, creciente en el Norte de la India. El aceite esencial extraído de las hojas y analizado por CG y GC/EM, sus componentes principales son: limoneno (6.2-13.6%), (z)- $\beta$ -ocimeno (0.3-8.3%), dihidrotagetona (4.5-8.1%), terpinoleno (0-11.2%), p-cimeno-8-ol (3.4-11.0%), piperitona (6.1-11.9%), piperitenona (2.7-8.1%),  $\beta$ -cariofileno (2.3-8.0%) y trans-sesquisabineno hidrato (2.0-12.5%) (Sagar, D. et al. 2005).<sup>49</sup>

Recogido en los Andes de Venezuela, el aceite esencial obtenido por hidrodestilación dando 0.13%, y analizado por CG / EM se obtuvieron sus principales componentes que son: piperitona (33.77%), trans- $\beta$ -ocimeno (14.83%), terpinoleno (13.87%) y  $\beta$ -cariofileno (9.56%) (Rondon, M. et al. 2006).<sup>48</sup>

Los aceites en la flor son ricos en  $\beta$ -cariofileno (53.5%) y en las hojas terpinoleno (21.1%) (Szarka, Sz. et al. 2006).<sup>50</sup>



El aceite esencial extraído por destilación de vapor, fue evaluado por sus propiedades antimicóticas y analizados por el CG y CG/EM treinta componentes fueron identificados, lo que representa el 89,1% del total detectado. Los principales componentes fueron piperitona (24,74%), piperitenona (22,93%), terpinoleno (7,8%), dihidro tagetone (4,91%), cis-tagetona (4,62%), limoneno (4,52%), y allo-ocimeno (3,66%) (Romagnoli, C. et.al. 2005).<sup>46</sup>

La estructura química de los componentes mayoritarios, determinado por métodos espectros (RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y EM) son: 5-(4-acetoxi-1-butinilo)-2,2'-bithiopheno, 5-(buten-1-nyl)-2,2'-bithiopheno y 5-acetyl-4-hidroxi-2-isopropenylbenzofuran; (Parodi, F. et.al. 1988).<sup>39</sup>

## **B. ACEITES ESENCIALES**

### **1. INTRODUCCION**

#### **1.1 Definición**

No tiene una definición precisa y pueden considerarse como compuestos olorosos presentes en los vegetales de los que se extrae. También se les conoce como aceites volátiles o etéreos. Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles generalmente destilables por arrastre con vapor de agua.

Están constituidos por sustancias químicas, que normalmente contiene el aroma o el sabor característico del vegetal del cual proceden y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizante). Por tanto son un grupo especial de compuestos que se encuentran presentes solo en algunas especies vegetales.

Por lo general se presentan en estado líquido. A veces semisólidos y muy rara veces sólidos. Son insolubles en agua, volátiles en corriente de vapor de agua y se evaporan a temperatura ambiente y presión atmosférica ordinaria.

## 1.2 Composición Química

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 constituyentes los que pueden tener diferente naturaleza química; tales como:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y aldehídos),
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

Los principales componentes responsables del aroma de los aceites esenciales son los terpenos. Los terpenos se clasifican por el número de unidades isopreno ( $C_5H_8$ ).

Tomando como unidad de terpeno la de 10 átomos de carbono (dos unidades de isopreno), se distingue entre monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), etc.

Los principales componentes son:

Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como por ejemplo los pinos y muchos tipos de cítricos. Uno de los terpenos más comunes es el pineno, que se encuentra, entre otros, en la trementina, extraída del pino.

Algunos de los terpenos más usuales son el limoneno, felandreno, canfeno, cariofileno.

## 1.3 Clasificación<sup>3</sup>

Los aceites esenciales se clasifican según en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

a) De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y típicamente son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de páprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

b) De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores; debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, frutilla, etc.).

c) Los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, etc.).<sup>3</sup>

## **2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS**<sup>34</sup>

Existen diversos métodos para extraer los aceites esenciales.

### **2.1 Extracción por arrastre de vapor de agua**

La muestra vegetal generalmente fresca, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa.

Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la alta pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

## **2.2 Extracción por solvente**

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasa y ceras, obteniendo al final una esencia impura. A nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solvente; porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias.

## **2.3 Extracción por centrifugación**

Los aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a los conseguidos por extracción por arrastre de vapor, gracias a no ser un proceso térmico. Los aceites obtenidos son más estables debido a los oxidantes naturales presentes.

## **2.4 Extracción por fluido supercrítico (EFS)**

El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico. Las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción.

## **2.5 Extracción por expresión**

El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado.

## **3. ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES**

### **3.1 Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica) (Anexo N° 3)**

Se ha revisado dos procedimientos citados en la bibliografía:

- a. Rondina, R. and Coussio, J.,(1969) <sup>47</sup>
- b. Lock de Ugaz, Olga (1988)<sup>34</sup>

### **3.2 Análisis físico-químico u otros**

#### **i. Características Organolépticas**

Las propiedades más importantes que determinan la calidad de un aceite esencial son: aspecto, color, olor y sabor. <sup>26</sup>

#### **ii. Características Físicas**

Las propiedades físicas de un aceite esencial puro son constantes dentro de ciertos límites. Es por eso que su análisis permite identificar un aceite, así como descubrir adulteraciones y /o deterioro del aceite.<sup>26</sup>

#### **iii. Calidad de los Aceites Esenciales**

**Factores externos** como el clima, suelo, la incidencia de plagas, enfermedades y maleza y las condiciones técnicas de cultivo, cosechas y manejo de postcosecha.

**Factores internos** que pueden influir en la composición y la calidad del aceite esencial.<sup>18</sup>

#### **iv. Determinación de Propiedades Físico-Químicas del Aceite Esencial**

##### **a. Índice de Refracción**

Es la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción de un ángulo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa del aire al aceite esencial manteniendo a una temperatura constante.

Consiste en la medición del ángulo de refracción del aceite esencial manteniendo la condición de transparencia e isotropismo siendo la longitud de onda de la luz 589.3 nm que corresponde a la línea D del sodio y siendo la temperatura de 20°C.

Se mide con el refractómetro ABBE a 20°C. Se coloca 2 a 3 gotas de la muestra sobre la superficie del prisma interior y se cierra las superficies prismáticas apretando la cabeza del tornillo.<sup>26</sup>

##### **b. Densidad**

La Densidad a 20°C de un Aceite Esencial es la relación entre el peso (masa) de un volumen dado de aceite esencial y su volumen, determinados a 20°C. La densidad, en gramos por mililitros, se da por la siguiente fórmula.<sup>27</sup>

$$\delta = 0.99718 \cdot (P2 - P1) / (P1 - P)$$

##### **c. Índice de Acidez**

Se conoce con el nombre de índice de acidez al número de miligramos de hidróxido de potasio, necesario para neutralizar los ácidos libres contenidos en un gramo de Aceite Esencial.

Colocar 1g de la muestra, agregar 5mL de etanol y 5 gotas de fenolftaleína y titular con KOH etanólico 0.1N hasta la aparición de una coloración persistente por 30seg.

Paralelamente hacer una prueba en blanco.<sup>28</sup>

Cálculo:

$$IA. = \text{índice de acidez} = 56.1 * N * V / P$$

Donde:

P: Peso en gramos, N. Normalidad NaOH (0.1 N) y

V: Volumen NaOH en mL.

#### **d. Índice de Ester**

El índice de éster comprende el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los esteres contenidos en un gramo de aceite esencial.

Colocar 1g de la muestra, agregar 25mL de KOH etanolico 0.5N y reflujar 45min. Enfriar. Agregar 20mL de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleina. Titular con HCL 0.5N. Paralelamente hacer una prueba en blanco.<sup>29</sup>

Cálculo:

$$I.E. = \text{índice de éster} = (56.1 * N * (V_1 - V) / P) - IA$$

Donde:

P: Peso en gramos, N: Normalidad HCL (0.5), V: Volumen HCL 0.5N utilizado para la determinación (mL) y V<sub>1</sub>: Volumen HCL 0.5N utilizado para la prueba en blanco (mL).

#### **e. Índice de Saponificación**

El índice de saponificación es el número de miligramos de hidróxido de potasio, requeridos para saponificar 1g de sustancia grasa.

El principio del método consiste en saponificar una cantidad de muestra, mediante un exceso de solución alcohólica de hidróxido de potasio, valorando luego dicho exceso con ácido clorhídrico 0.5N.

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

Colocar 1mL de muestra, agregar 25mL de alcohol isopropilico y 25mL de una solución alcohólica KOH 1N. Se somete a reflujo la mezcla por 2 horas. Se enfría y luego se añaden 2 gotas de una solución de fenolftaleina. El exceso de base se titula con una solución de HCL 0.5N. Paralelamente hacer una prueba en blanco.<sup>30,15</sup>

Cálculo:

$$\text{I.S.} = \text{índice de saponificación} = 56.1 (V_1 - V_2) N / P.$$

Donde:

P: Peso en gramos, N. Normalidad HCL (0.5),

V1: Volumen HCL 0.5N (mL) empleado en la valoración del ensayo en blanco y V2: Volumen HCL 0.5N (mL) empleado en la valoración de la muestra.

### **f. Punto de ebullición**

Se define en términos de la presión de vapor del líquido, se espera que el punto de ebullición se relacione con el calor molar de evaporización: a mayor calor de evaporización mayor será el punto de ebullición. En última instancia, el punto de ebullición y el calor de evaporización esta determinado por la magnitud de las fuerzas intermoleculares.<sup>13</sup>

### **g. Punto de congelación**

Es la temperatura constante o máxima, observando durante la fase de liberación del calor latente de solidificación, cuando este aceite esencial en estado líquido es enfriado.

El principio se basa en la observación de las variaciones de temperatura que acompañan a la solidificación de los aceites esenciales, cuando estos son enfriados lenta y progresivamente.<sup>32</sup>



#### **h. Humedad**

La presente norma tiene como objeto determinar la humedad y cualquier otra materia volátil bajo las condiciones del ensayo.

Se aplica a todas las grasas y aceites comestibles incluyendo emulsiones, tales como mantequillas y margarinas.

Se pesa exactamente una cantidad de muestra de aceite esencial y se introduce en un vaso o crisol tarado que ha sido previamente secado en la estufa y enfriado en el desecador. Se calienta la muestra sobre la plancha, rotando suavemente con la mano para evitar salpicaduras debidas a una ebullición rápida del agua. Se enfría a la temperatura ambiente, en desecador, y se pesa.<sup>35</sup>

La humedad fue realizada a las hojas y tallo de la planta *Tagetes elliptica Smith* se secaron en un horno al vacío a 100°C a un peso constante (aproximadamente 5 horas) (métodos AOAC 926.08 y 925.09, 1990). La pérdida de humedad se determinó gravimétricamente.<sup>22</sup>

El porcentaje de humedad de la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = (W_i - W_f) / W_i * 100$$

Donde:

$W_i$  = Masa de la muestra inicial

$W_f$  = Masa de la muestra después del secado

#### **i. Cenizas**

La materia orgánica volátil se eliminó al incinerar la muestra a 550°C en un horno eléctrico.

El residuo se cuantificó gravimétricamente y se calculó el porcentaje de cenizas (método AOAC 923.03, 1990).<sup>23</sup>

$$\text{Cenizas (\%)} = W_f / W_i * 100$$

Donde:

$W_f$  = Masa final

$W_i$  = Masa de la muestra después del secado

#### **4. METODOS CROMATOGRAFICOS DE PURIFICACION DE ACEITES ESENCIALES <sup>11</sup>**

Entre los principales procedimientos de purificación tenemos las técnicas cromatográficas.

La cromatografía es un procedimiento físico-químico que permite separar los componentes de una mezcla mediante el desplazamiento diferenciado de cada uno de ellos sobre una superficie estacionaria.

Es una técnica capaz de separar compuestos en base a diferencias de su afinidad por una fase estacionaria y una móvil.

En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo.

La muestra se introdujo en la fase móvil y los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación.

**4.1 La cromatografía en capa fina – CCF** se utiliza para obtener información rápida y sencilla sobre:

a) Los distintos componentes presente en la muestra de aceite esencial de chinche, lo que nos permite: identificar la presencia de un determinado constituyente.

b) Seleccionar las condiciones de trabajo (adsorbente y eluente) mas eficaces para realizar la purificación del aceite esencial del chinche por cromatografía de columna.

c) Una ventaja en CCF es que sólo se requiere de 1ml de aceite esencial para realizar el análisis.

**4.2 La cromatografía de columna** permite la purificación de cantidades mensurables de muestra, de manera que se puede lograr la purificación de varios mililitros de aceite esencial. Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. La elección del disolvente es crucial para una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión (cromatografía flash). La columna se prepara mezclando el soporte con disolvente y se rellena la columna poniendo en el fondo de ésta un poco de algodón o lana de vidrio, para evitar que el adsorbente quede retenido en la columna y el disolvente es enrasado hasta el nivel del soporte. A continuación se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido (n-Hexano), recogiénose en tubos de ensayo de color ámbar para que no se oxide o degrade el aceite esencial.

### 4.3. Cromatografía de gases

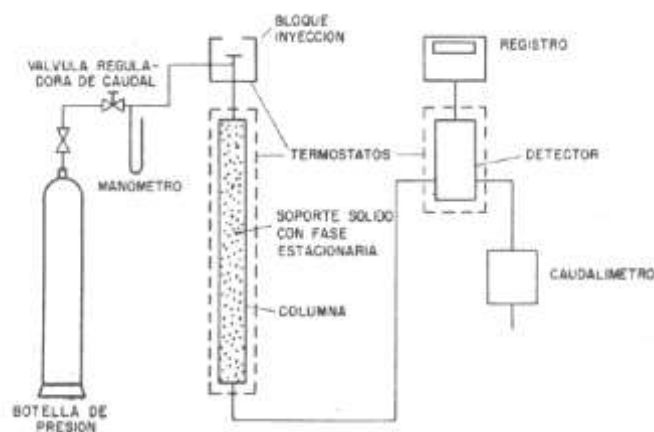


Figura N°1. Diagrama de un cromatógrafo de gases

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos.

Es una técnica cromatográfica en la que la muestra se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

El gas portador es un gas inerte, generalmente helio, nitrógeno o argón, de elevado grado de pureza.

Las columnas pueden ser con relleno, en las que la fase estacionaria líquida está retenida sobre un sólido inerte (soporte) y capilares ó semicapilares, en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar. El detector tiene por objeto medir la variación de alguna propiedad física del gas portador originada por la elución de los compuestos.

La separación de los compuestos de una mezcla se realiza en las siguientes etapas,

1.-Una vez elegida la columna y fase estacionaria, se ajustan las temperaturas de la cámara de inyección, columna y detector, así como el caudal de gas portador. Cuando la señal del detector es constante (sin ruidos la línea base) se hace la inyección de la muestra.

2.-Las muestras se inyectan en cantidades inferiores a 1  $\mu$ l cuando son líquidas y sobre 1 ml si son gaseosas; se introducen en la cámara de inyección, donde se vaporizan, y son arrastradas hasta cabeza de columna.

3.-Los componentes se fijan en una pequeña zona de la columna; por equilibrios sucesivos entre fase móvil y estacionaria cada componente se desplaza por la columna a velocidades diferentes.

4.-Finalmente, los solutos que salen de la columna, pasan al detector y se obtiene el cromatograma.

## **5. IDENTIFICACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL ACEITES ESENCIAL**

### **5.1 Espectrometría de masa**

#### **1. Aspectos Generales**

La espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Los espectros de masa se obtienen rutinariamente a una energía de haz de electrones equivalentes a 70 electrón-volts. El fenómeno más sencillo que se presenta es la remoción de un electrón simple de la molécula en fase gaseosa por parte de un electrón del haz de electrones para formar un ion molecular (padre). Este representa el radical catión  $M^+$ .

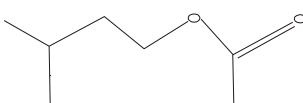

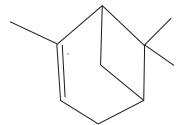
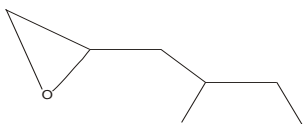
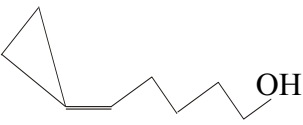
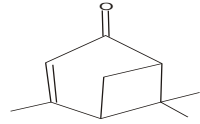
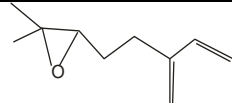
El espectro de masas es una representación de las masas de los fragmentos cargados positivamente (incluyendo el ion molecular) en función de su concentración relativa. El pico más intenso de espectro, denominado pico base, tiene asignado un valor de 100%, y las intensidades (altura, \*factor de sensibilidad) de los otros picos, incluyendo el ion molecular, se indican como porcentajes del pico base.

La espectrometría de masas tiene dos aplicaciones importantes en estudio de compuestos orgánicos:

- i. La determinación de la masa molecular
- ii. La deducción de la estructura del compuesto

## 2. Principales constituyentes del aceite esencial

**Tabla I. Estructuras de los compuestos del Aceite Esencial**

Descripción			Estructura y reacciones de fragmentación
PM	Nombre	Formula	
130	1-Butanol-3-metil- acetato	$C_7H_{14}O_2$	 $M/Z = 87 C_5H_{11}O$ $M/Z = 70 C_5H_{10}$ $M/Z = 43 C_3H_7$
136	Beta-myrceno	$C_{10}H_{16}$	 $M/Z = 121 C_9H_{13}$ $M/Z = 69 C_5H_9$ $M/Z = 53 C_4H_5$ $M/Z = 93 C_7H_9$ $M/Z = 93 C_3H_5$
136	1R-alfa- pineno	$C_{10}H_{16}$	 $M/Z = 41 C_3H_5$ $M/Z = 121 C_9H_{13}$ $M/Z = 93 C_7H_9$ $M/Z = 91 C_7H_7$
114	Oxirano (2 metil butilo)	$C_7H_{14}O$	 $M/Z = 99 C_6H_{11}O$ $M/Z = 85 C_5H_{19}O$ $M/Z = 57 C_3H_5O$ $M/Z = 41 C_2HO$
126	1-pentanol-5-cyclopropylideno	$C_8H_{14}O$	 $M/Z = 107 C_8H_{11}O$ $M/Z = 79 C_6H_7$
150	BICYCLO[3.1.1] HEPT-3-EN-2-ONA,4,6,6-trimetil	$C_{10}H_{14}O$	 $M/Z = 135 C_8H_{11}$ $M/Z = 55 C_4H_7$ $M/Z = 55 C_3H_3O$ $M/Z = 91 C_2HO$ $M/Z = 41 C_5H_5$
152	2,2-dimetil-3-(metileno pent-4 enil) oxirano	$C_{10}H_{16}O$	 $M/Z = 79 C_6H_7$ $M/Z = 41 C_3H_5$

### 3. Espectro de Masa del Oxido de Myrceno

El espectro de masa del Oxido de myrceno, aislado de las hojas y tallos del chinche (*Tagetes elliptica Smith*)

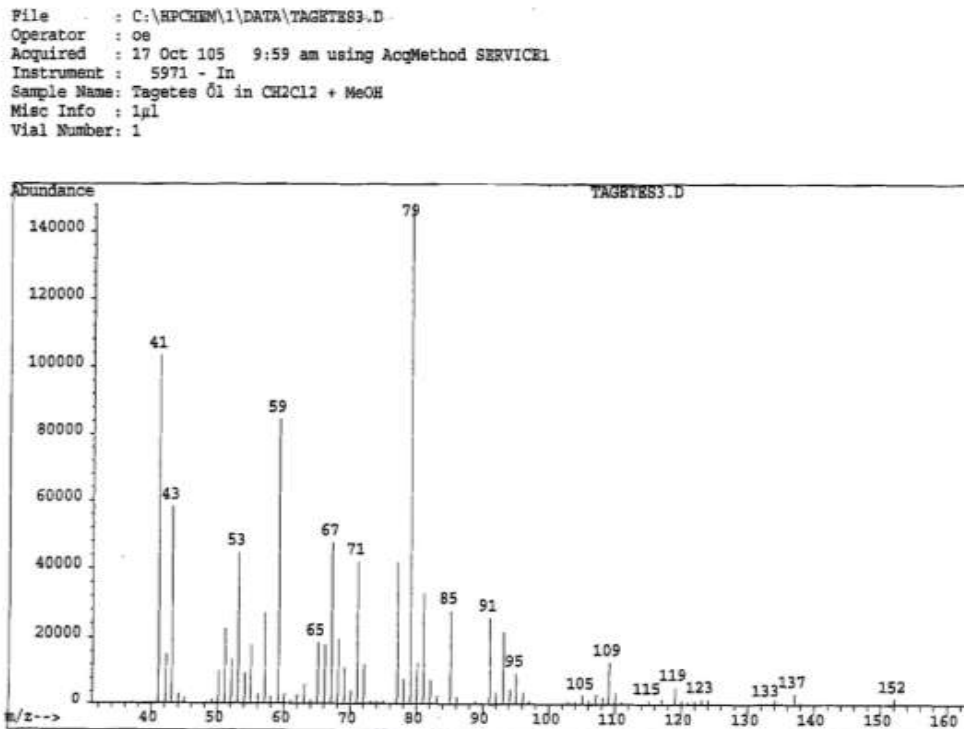


Figura N°2.- Espectro de masas del Oxido de myrceno

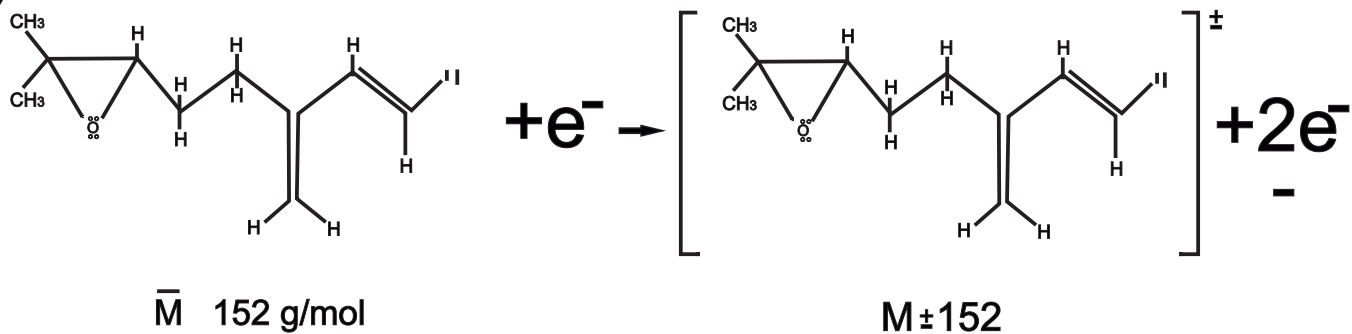
La identificación de los 3 fragmentos iónicos correspondiente a los picos m/z 152, 79,41.

M/z 152 (ión molecular) ,79 (pico base 100%).

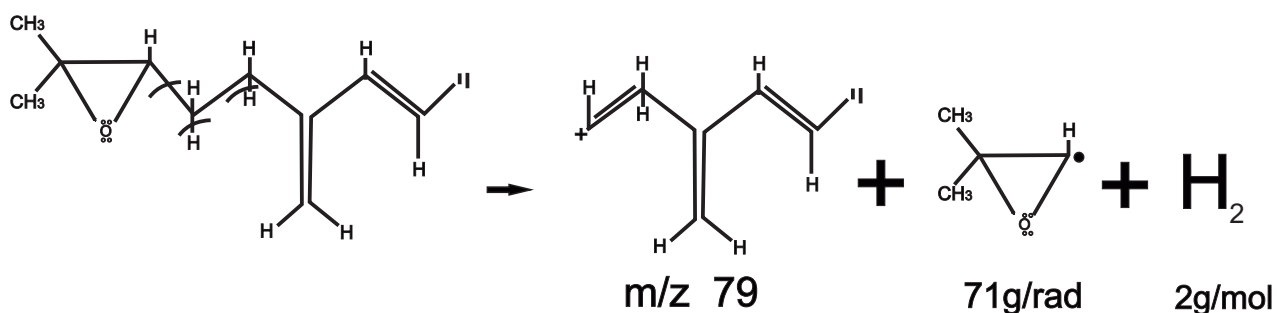
Presentamos las ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masa de Oxido de myrceno siendo este el principal compuesto.

Presentamos las ecuaciones de fragmentación de los principales picos del espectro de masa de Oxido de myrceno siendo este el principal compuesto.

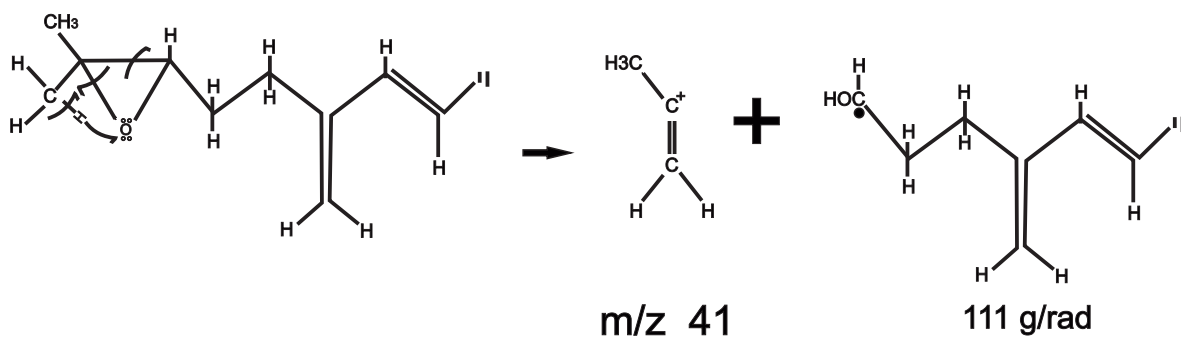
i)  $M \pm 152$



II)  $m/z \quad 79 \quad (M \pm (\text{C}_3\text{H}_6\text{O}) + \text{H}_2)$



III)  $m/z \quad 41 \quad (152 - \text{C}_7 \text{H}_{11} \text{O})$





## 5.2. El acoplamiento de la espectrometría de masas con la cromatografía de gases

La asociación de las dos técnicas, CG (Cromatografía de gases) y EM (Espectrometría de masas) da lugar a una técnica combinada GC-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

El único obstáculo en el momento de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current).

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.

En términos generales, el proceso analítico para la cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas comprende las siguientes fases:

1. Obtención de un pico con la resolución adecuada.
2. Selección del pico cromatográfico de interés.

3. Obtención del espectro de masas del compuesto correspondiente al pico seleccionado, y su identificación.

La técnica acoplada CG-EM permite obtener el espectro de masas de cada componente eluído, con lo cual se obtiene información de su peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo cual el Índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas son criterios para la identificación química de muchos de los componentes de un aceite esencial, sean monoterpenos u otros tipos de sustancias características de dichos aceites.<sup>54,52</sup>

### **5.3. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H<sup>52</sup>**

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno.

A continuación presentamos el análisis de dicho espectro, teniendo presente que la interpretación de un espectro de RMN<sup>1</sup>H involucra principalmente la asignación de los desplazamientos químicos de cada átomo de hidrogeno de la molécula.

Desplazamientos químicos (d, ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro RMN<sup>1</sup>H del oxido de myrceno CDCl<sub>3</sub> teóricos se presenta en la siguiente tabla.

**Tabla II .Desplazamientos químicos (δ, ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro**

**RMN<sup>1</sup>H del Oxido de myrceno en CDCl<sub>3</sub>. (Teórico)**

Nº Señales	Nº Hidrogeno	Desplazamiento (ppm) **	Integración (unidades)	Grupo Funcional
1	H-1	1.20	3H	CH <sub>3</sub>
1	H-2	1.24	3H	CH <sub>3</sub>
4	H-4	1.65/1.67	2H	CH <sub>2</sub>
3	H-5	2.25/2.37	2H	CH <sub>2</sub>
3	H-3	2.70	1H	CH
2	H-6a/ H-6b	4.96	2H	CH <sub>2</sub>
4	H-8a/ H-8b	5.18/5.02	2H	CH <sub>2</sub>
4	H-7	6.32	1H	CH

\*\*Datos teóricos del Instituto de Leipzig-Alemania. Email de contacto

**[henning@organi.uni-leipzig.de](mailto:henning@organi.uni-leipzig.de)**

#### 5.4. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono, RMN<sup>13</sup>C<sup>52</sup>

El <sup>13</sup>C tiene un spin nuclear de ½ y puede observarse por RMN a la frecuencia de 10.705 MHz en un campo de 10kilogauss.

El número de spin del <sup>13</sup>C es igual que para el <sup>1</sup>H, se aplican las mismas reglas para la predicción de la multiplicidad de estas absorciones.

Desplazamientos químicos (δ, ppm) de los átomos de carbono de Oxido de myrceno en CDCl<sub>3</sub> teórico se presenta en la siguiente tabla.

**Tabla III. Desplazamientos químicos (δ, ppm) de los átomos de carbono del Oxido de myrceno en CDCl<sub>3</sub>. (Teórico)**

Nº Carbono	Desplazamiento (ppm) ***	Asignación
C-4	18.94	CH <sub>3</sub>
C-3	25.02	CH <sub>3</sub>
C-5	27.76	CH <sub>2</sub>
C-6	28.31	CH <sub>2</sub>
C-1	58.63	C
C-2	64.24	CH
C-9	113.57	CH <sub>2</sub>
C-10	116.29	CH
C-8	138.76	CH
C-7	145.61	C

\*\*\* Datos teóricos del Instituto de Leipzig-Alemania. Email de contacto

**[henning@organi.uni-leipzig.de](mailto:henning@organi.uni-leipzig.de)**

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

**A. COLECCIÓN DE LA MUESTRA** (Anexo N° 7)

La planta de chinche se colectó en el distrito de Huaros, provincia de Canta, departamento Lima – Perú (3587msnm), el 04 de octubre 2005 (11:30am - 13horas), durante el viaje que realizamos, bajo la dirección de Mg. Otilia Acha de la Cruz.

La planta de chinche crece en los valles de Huaros, tiene un clima templado, seco y caluroso durante el día y con algo de frío durante la noche, la temperatura oscila entre 11°C y 15°C en invierno, y de 12°C a 20°C durante el resto de año.

**B. DETERMINACION SISTEMATICA (IDENTIFICACION BOTANICA)**

La planta de chinche fue identificada por la Mg. Joaquina Albán Castillo, investigadora de Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ver constancia expedida en el Anexo N° 8).

- División : Magnoliophyta
- Clase : Magnoliopsida
- Orden : Asterales
- Familia : Asteraceae
- Especie : *Tagetes Elliptica Smith*
- Genero : Tagetes
- Nombre vulgar : “Chinche”

## C. ANALISIS CUALITATIVO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

### 1. Tratamiento Preliminar

Las hojas de la planta de chinche se secaron en una estufa “Labor” (Hungria) a 40°C durante 2 dias.

Esta muestra seca se pulverizó a grano fino en un molino domestico “Moulinex” (750W).

### 2. Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquimica)

**a. Muestra:** 5g de muestra seca.

**b. Procedimiento:** De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo N° 2)

#### c. Resultados

Se detallan en el Anexo N°3 y se resume a continuación:

**c.1 Contiene:** Aminogrupos primarios o secundarios, grupos fenólicos libres, flavonoides, catequinas triterpenos y/o esteroides, saponinas, leucoantocianidinas y catequinas.

**c.2 No contiene:** Taninos, quinonas, antranas o antranoles, alcaloides

## D.EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA DE CHINCHE

### D.1 Procedimiento de extracción

a. EL aceite esencial de chinche, *Tagetes elliptica Smith*, se extrajo de tallos y hojas mediante el método de extracción por arrastre de vapor de agua empleando el equipo extractor ilustrado en el Anexo N° 9.

b. Se colocó 10 litros de agua en la cámara generadora de vapor.

c. En la cámara de extracción se colocó aproximadamente 4 kg. de la planta.

d. En el extremo inferior del refrigerante colocó un vaso florentino llenado con agua destilada Anexo N° 9, en ella se colectó el aceite esencial. Debajo del vástago del vaso florentino se pone un vaso de precipitados para colectar los residuos de destilación (agua).

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

- e. Las condiciones de trabajo fueron a presión atmosférica normal y temperatura de 100°C.
- f. La mezcla de agua y aceite esencial se separaron por diferencia de densidades después de un tiempo de reposo.
- g. El aceite esencial obtenido es un líquido ligeramente amarillento, que despidió un olor fuerte.

### D.2 Resultados

Las cantidades de planta utilizada y el volumen de aceite esencial obtenido se presentan en la tabla IV.

**TABLA IV. Rendimiento del aceite esencial a presión atmosférica**

Peso de la planta de chinche (g)	Tiempo de Destilación (minutos)	Volumen del aceite esencial (mL)	Porcentaje del aceite (%)
3250	90	10	0.30
4500	85	9.5	0.21
3500	75	7.5	0.21
4500	85	9	0.20

En el Anexo N° 5. Se observa que hasta los 25 minutos se incrementa el volumen del aceite esencial, luego el volumen permanece constante. Después de los 75 minutos no hay variación en el porcentaje del aceite esencial.

### D.3. CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL

#### 1. Constantes Físico químicas del Aceite Esencial

- i. Índice de Refracción: 1.4690
- ii. Densidad: 0.8631 g/mL



## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

- iii. Índice de Acidez mg NaOH/1g de aceite esencial: 4.9
- iv. Índice de Ester mg NaOH/1g de aceite esencial: 3.61
- v. Índice de saponificación mg NaOH/1g de aceite esencial: 29.75
- vi. Punto de ebullición: 165-197 °C
- vii. Punto de congelación :<-5 °C
- viii. Humedad: 24.5 %
- ix. Cenizas: 0%

### 2. Características organolépticas

Las principales características organolépticas del aceite esencial obtenidas son las siguientes:<sup>25</sup>

- i. Aspecto: Líquido. límpido. oleoso
- ii. Aspecto: Ligeramente amarillo y transparente
- iii. Olor: Fuerte
- iv. Sabor: Agradable

### 3. Reacciones de coloración de grupos funcionales (Anexo N °6)<sup>43,46</sup>

Los grupos funcionales en la reacción de coloración son los siguientes.

**TABLA V. Reacción de coloración**<sup>43,46</sup>

Reacción	Ensayo	Características	Resultado
Reactivo de Yodo	Doble enlace conjugado	Color marrón	(+)
Reactivo 2,4dinitrodenilhidrazina	Cetonas alifáticas	Precipitado amarillo	(+)
Reacción del yodoformo	Metil cetonas	Precipitado amarillo	(+)
Acetilacion	No hay esteroides		(-)
Xantatos	Alcoholes	Ligero precipitado amarillo	(+)
Tollens	Aldehído aromáticos , alifáticos y aminas aromáticas	Espejo de plata	(+)
Formaldehído-Acido Sulfúrico	Anillos aromáticos	Color rojo sangre	(+)

## **E. ANALISIS CROMATOGRAFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA**

### ***Tagetes elliptica Smith* (chinche) \***

**1. CROMATOGRAFIA DE GASES** El objetivo de este procedimiento es la separación de los componentes del aceite esencial de chinche.

- a) Muestra: Aceite esencial de chinche
- b) Características del equipo: cromatógrafo de gases marca SHIMADZU MODELO GC-17A, con detector FID y una columna capilar no polar de metilsilicona DB-1 de 60m por 0,25 mm y 0,25um de espesor de film. Se uso el siguiente programa de temperatura: 60°C (5min), 60-220°C (22min), como gas portador se utilizo nitrógeno (0,9 ml/min); temperatura de inyector: 230°C; temperatura del detector: 250°C.
- c) Operador :Dr. Lothar Hennig
- d) Fecha : 17 de Oct.05
- e) Cantidad de muestra : 1uL
- f) Resultados

El cromatograma se muestra en la Figura 3.

La identificación de la mayoría de los componentes del aceite esencial se logro a través de la base de datos y con los tiempos de retención, cuyos resultados se reportan en la Tabla VI.

\*Realizado por Dr. Lothar Hennig en el laboratorio de orgánica del Instituto de Leipzig-Alemania

Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica* Smith (chinche)

File : C:\HPCHEM\1\DATA\TAGETES3.D  
Operator : oe  
Acquired : 17 Oct 105 9:59 am using AcqMethod SERVICE1  
Instrument : 5971 - In  
Sample Name: Tagetes Ól in CH2Cl2 + MeOH  
Misc Info : 1µl  
Vial Number: 1

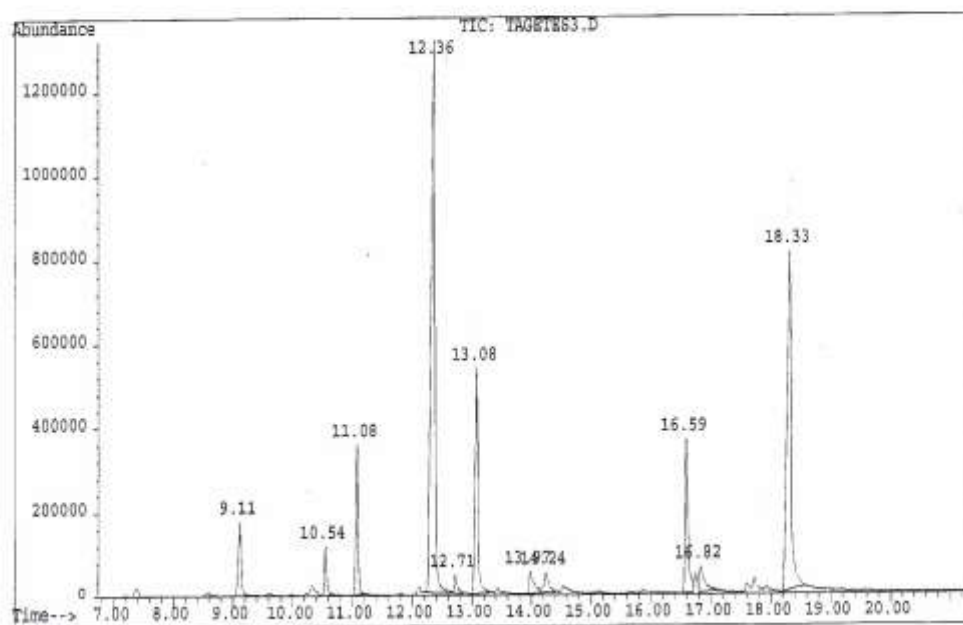
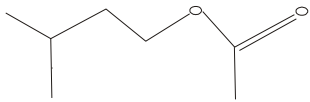

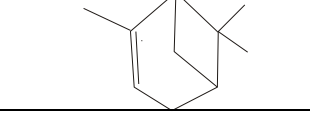
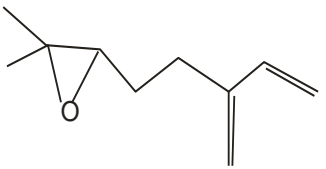
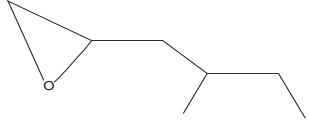
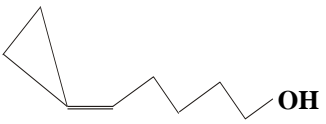
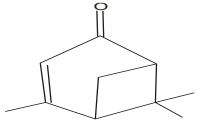


Figura 3. Cromatograma de gases del aceite esencial extraído de la planta *Tagetes elliptica* Smith (chinche)

**Tabla VI. Principales constituyentes del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* purificados mediante cromatografía de gases (ver Figura 3)**

N°	DESCRIPCION		ESTRUCTURAS
	Nombre	Tiempo de retención	
1	1-Butanol, 3-metil- acetato	9.11	
2	Beta-mirceno	10.54	
3	1R-.alfa.-pineno	11.08	
4	2,2-dimetil -3-(metileno pent 4-enil) oxirano	12.36	
5	Oxirano,(2-metil butilo)-	13.08	
6	1-pentanol,5-cyclopropilideno-	16.59	
7	Biciclo[3.1.1] hept-3-en-2-ona,4,6,6-trimetil	18.33	

## **2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM) \***

El objetivo de este procedimiento es la separación e identificación de los componentes del aceite esencial de la planta de chinche.

- a) Muestra: aceite esencial de chinche
- b) Características del equipo: Pekín Elmer - Turbo Mass Spectro/Autosystem XL CG equipado por un inyector a 250°C, y una columna de 30 metros de largo y 0.25mm de diámetro. Se utilizo 1µl de muestra de aceite, la fase estacionaria Silphenylene polysiloxane, fase móvil Helium .Se empleo un programa de temperatura en el equipo, iniciándose el proceso a 40°C luego se incremento la temperatura 260°C a velocidad 5°C/min. El inyector se mantuvo a 250°C, la relación de reparto es 1:50, la presión en la cabeza de la columna es 20 psi y finalmente el tiempo del proceso es de 45minutos.
- c) Operador : Dr. Lothar Hennig
- d) Fecha : 17 Octubre 2005
- e) Cantidad de Muestra: 1uL
- f) Los espectros se muestran en el ( Anexo 12)

\*Realizado por Dr. Lothar Hennig en el laboratorio de orgánica del Instituto de Lepzig-Alemania

## **F. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL ACEITE ESENCIAL**

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación del aceite esencial fueron los siguientes:

- i Análisis preliminar por cromatografía de capa fina –CCF
- ii Cromatografía de columna-CC

Los procedimientos de CCF y CC se realizaron tanto en nuestro laboratorio en la UNI (Lima, Perú), como en el instituto Leipzig-Alemania.

### **1. Análisis preliminar por cromatografía de capa fina –CCF**

El objetivo de este procedimiento cromatográfico es seleccionar el eluyente más eficiente para realizar la posterior purificación del Aceite esencial por cromatografía en columna (CC).

- a) Muestra: Aceite esencial extraído de las hoja y tallo de la planta de chinche.
- b) Placa: Placa de silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck) de 20cmx20cm; 0,2mm.
- c) Eluyente: n-Hexano de grado cromatográfico.
- d) Procedimiento: (Anexo N°10)

La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

- e) Revelador: Lámparas ultravioleta – modelo UVGL-58.
- f) Observaciones: Los resultados indicaron la presencia de 2 manchas, entre las cuales resalta como componente mayoritario

( $R_f = 0,88$ ) lo cual nos ayudó para la realización de la columna cromatografía.

## 2. Cromatografía en columna – CC (Perú)

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, fue obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, del aceite esencial que se quiere purificar.

- a) Muestra: Aceite esencial (10mL)
- b) Características de la columna: diámetro= 5cm, altura total=90cm; altura de alumina = 80cm.
- c) Adsorbente: Oxido de aluminio activo neutro (Alúmina)
- d) Procedimiento : (Anexo N°11)
  - i. En la columna se colocó la alumina (180gr) en forma de lluvia sobre el eluyente de n-Hexano.
  - ii. Luego en la parte inferior de la columna se colocó una capa de algodón, para proteger la muestra.
  - iii. Finalmente el aceite esencial fue sembrado en la parte superior de la columna. Se procedió al proceso de elución utilizando n-Hexano, obteniéndose 40 fracciones, todas las cuales tenían color amarillo.
  - iv. El análisis por CCF de las fracciones obtenidas recogidas dio por resultado que la f13 presenta una sola mancha ( $R_f=0.88$ )

### 3. Cromatografía en columna – CC (Alemania) \*

El objetivo de este procedimiento cromatografico es obtener el óxido de myrceno.

- a) Muestra: f13 obtenida de la Sec.F.2.d) (iv).
- b) Características de la columna: Diámetro =30mm; h=15cm; altura de la alúmina =5cm.
- c) Adsorbente : Óxido de aluminio ( Alúmina )
- d) Procedimiento
  - i. En la columna se agregó la alúmina (40g) en polvo mezclada con exometileno hasta cubrir el empaque.
  - ii. La papilla se trasvasó sobre la parte superior del empaque de alúmina que contiene un poco de exometileno .Finalmente se colocó una capa de algodón, para proteger la muestra.
  - iii. Se agregó cuidadosamente exometileno sobre el empaque y se eluyó la columna hasta recibir la fracción de 1mL.
  - iv. La fracción presentaba un color amarillo.
  - v. La fracción obtenida (fn) se guardo en refrigeración a 4°C.

#### e) Conclusión

Se concluye que la Purificación de CC en el instituto de Lepzing-Alemania se utilizo para la identificación espectroscópica del Oxido de Myrceno

\*Realizado por Dr. Lothar Hennig en el laboratorio de orgánica del Instituto de Lepzig-Alemania



## **G. IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA DEL OXIDO DE MYRCENO (F<sub>n</sub>)**

La determinación estructural del oxido de myrceno obtenidas de las hojas y tallos del chinche (*Tagetes elliptica Smith*) se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, de RMN<sup>1</sup>H, de RMN<sup>13</sup>C.

La muestra purificada (F<sub>n</sub>) de la sección F.3. (iv)

### **1. Espectro de Masas (Espectro N° 1)**

#### **a. Condiciones de trabajo**

- I. Equipo: Cromatógrafo de gas acoplado a masas (CG-EM) Pekín Elmer ; Columna : 30 metros de largo y 0.25mm de diámetro; Gas: Helio
- II. Laboratorio : Instituto de Leipzig –Alemania
- III. Operador : Dr. Lothar Hennig
- IV. Fecha : 17 Octubre 2005
- V. Cantidad de Muestra: 1uL
- VI. Muestra F<sub>n</sub>

#### **b. Características del espectro**

m/z 152 (ión molecular), 79 (pico base 100%).

#### **c. Análisis del espectro**

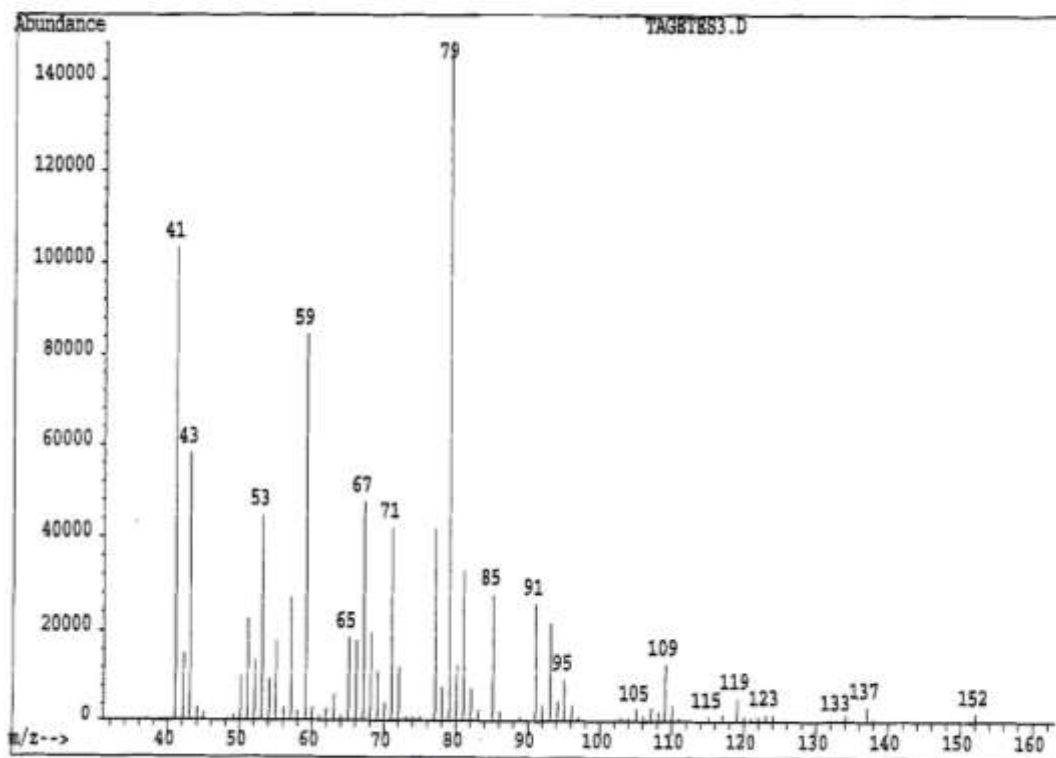
La identificación de los tres fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 152, 79,41, y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Pág. 24).

#### **d. Conclusiones**

El espectro de masas obtenido corresponde al Oxido de myrceno.

Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica* Smith (chinche)

File : C:\HPCHEN\1\DATA\TAGTES3.D  
Operator : oe  
Acquired : 17 Oct 105 9:59 am using AcqMethod SERVICE1  
Instrument : 5971 - In  
Sample Name: Tagetes Oil in CH2Cl2 + MeOH  
Misc Info : 1µl  
Vial Number: 1



Espectro 1. Espectro de masas del Oxido de myrceno

## 2. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del Oxido de myrceno (Espectro 2)

### a. Condiciones de trabajo

- i. Equipo: Espectrometría de RMN (Bruker-600 MHz)
- ii. Solvente: CDCl<sub>3</sub>
- iii. Volumen de muestra: 1 µg
- iv. Tiempo de proceso: 11.51 min.
- v. Fecha: 17-10-2005
- vi. Laboratorio: Instituto de Leipzig - Alemania
- vii. Operador: Dr. Lothar Hennig
- viii. Muestra: F<sub>n</sub>

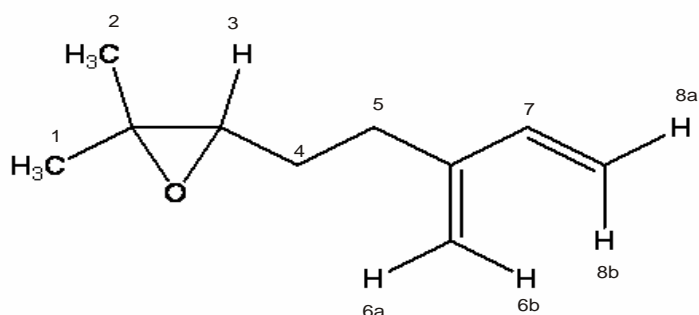
### b. Características del espectro

1.18 ppm (s, H-1 – CH<sup>3</sup>); 1.23 ppm (s, H-2 – CH<sub>3</sub>); 1.65/1.66 ppm (q, H4 – CH<sub>2</sub>);  
2.10/2.18 ppm (t, H-5 – CH<sub>2</sub>); 2.66/2.69 ppm (t, H-3 – CH); 4.95/4.97 ppm (d, H-6a/ H-  
6b – CH<sub>2</sub>); 4.99/5.01/5.15/5.18 ppm (q, H-8a/H-8b – CH<sub>2</sub>); 6.28/6.29/6.31/6.32 ppm  
(q, H-7 – CH).

### c. Análisis del espectro (Desplazamiento químicos)

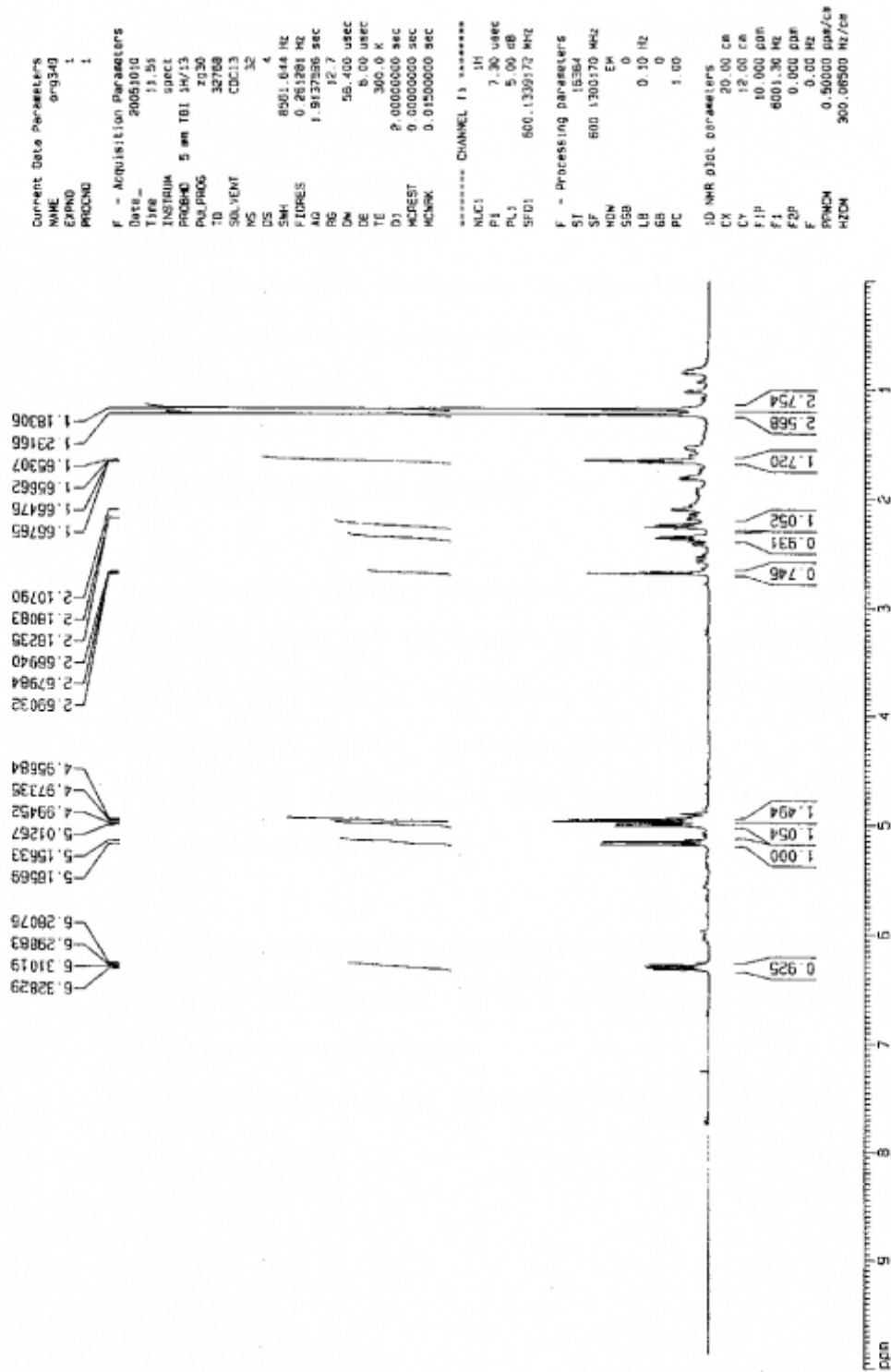
La identificación de los diferentes tipos de hidrogeno se resume a continuación.

**Tabla VII. Desplazamientos químicos (d, ppm) de los átomos de hidrógeno en el espectro RMN<sup>1</sup>H del Oxido de myrceno en CDCl<sub>3</sub>. Espectro 2 (Experimental)**



Nº Señales	Desplazamiento (ppm)	Nº Hidrogeno	Integración (unidades)	Grupo Funcional
1	1.18306 (s)	H-1	3H	CH <sub>3</sub>
1	1.23166 (s)	H-2	3H	CH <sub>3</sub>
4	1.65307/1.65682 1.66476/1.66765(q)	H-4	2H	CH <sub>2</sub>
3	2.10790/2.18083/ 2.18235 (t)	H-5	2H	CH <sub>2</sub>
3	2.66940/2.6984/ 2.69032 (t)	H-3	1H	CH
2	4.95684/4.97335 (d)	H-6a/ H-6b	2H	CH <sub>2</sub>
4	4.99452/5.01267/ 5.15633/5.18569 (q)	H-8a/ H-8b	2H	CH <sub>2</sub>
4	6.28076/6.29883/ 6.31019/6.32829 (q)	H-7	1H	CH

**d. Conclusión.-** El espectro RMN<sup>1</sup>H obtenido del Oxido del myrceno.



Espectro 2. RMN <sup>1</sup> H (a 600 MHz, en CDCl<sub>3</sub>) del oxido de Myrceno

### 3. Espectros RMN $^{13}\text{C}$ del Oxido de myrceno (Espectro N° 3)

#### a. Condiciones de trabajo

- i. Equipo: Espectrometría de RMN (Bruker-600MHZ)
- ii. Solvente:  $\text{CDCl}_3$
- iii. Volumen de muestra: 1ug
- iv. Tiempo de proceso: 11:58 min
- v. Fecha: 17-10-2005
- vi. Laboratorio: Instituto de Leipzig - Alemania
- vii. Operador: Dr. Lothar Hennig
- viii. Muestra:  $\text{F}_n$

#### b. Características del espectro

Ver espectros RMN $^1\text{H}$  18.74ppm (C-4,CH<sub>3</sub>); 24.81ppm (C-3,CH<sub>3</sub>); 58.37ppm (C-1, C); 64.24ppm (C-2, CH); 27.59ppm (C-5, CH<sub>2</sub>); 28.14ppm (C-6, CH<sub>2</sub>); 145.44ppm (C-7, C); 116.05ppm (C-10, CH<sub>2</sub>), 138.57ppm (C-8,CH); 113.35ppm (C-7,CH<sub>2</sub>).

Presenta 10 carbonos, lo que indica que el compuesto es de naturaleza monoterpenicos.

#### c. Análisis del espectro (Desplazamiento químicos)

Presenta 10 carbonos, lo que indica que el compuesto es de naturaleza monoterpenicos.

La identificación de los diferentes tipos de carbono se resume a continuación.

**Tabla VIII. Desplazamientos químicos (d, ppm) de los átomos de carbono del Oxido de myrceno en CDCl<sub>3</sub>.Espectro 3. (Experimental)**

Desplazamiento Experimental (ppm)	Nº Carbono	Asignación
18.742(q)	C-4	CH <sub>3</sub>
24.812(q)	C-3	CH <sub>3</sub>
27.592(t)	C-5	CH <sub>2</sub>
28.149(t)	C-6	CH <sub>2</sub>
58.372(s)	C-1	C
64.24(d)	C-2	CH
113.351(t)	C-9	CH <sub>2</sub>
116.048(t)	C-10	CH
138.573(d)	C-8	CH
145.442(s)	C-7	C

**c. Conclusión.-** El espectro RMN<sup>13</sup>C obtenido corresponde al Oxido de myrceno

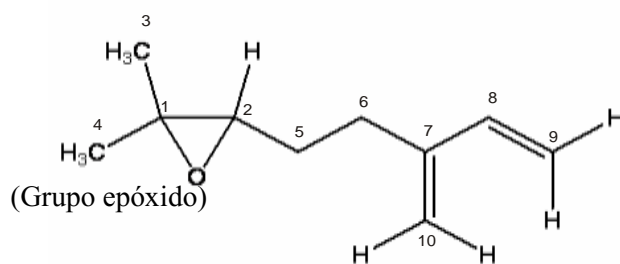
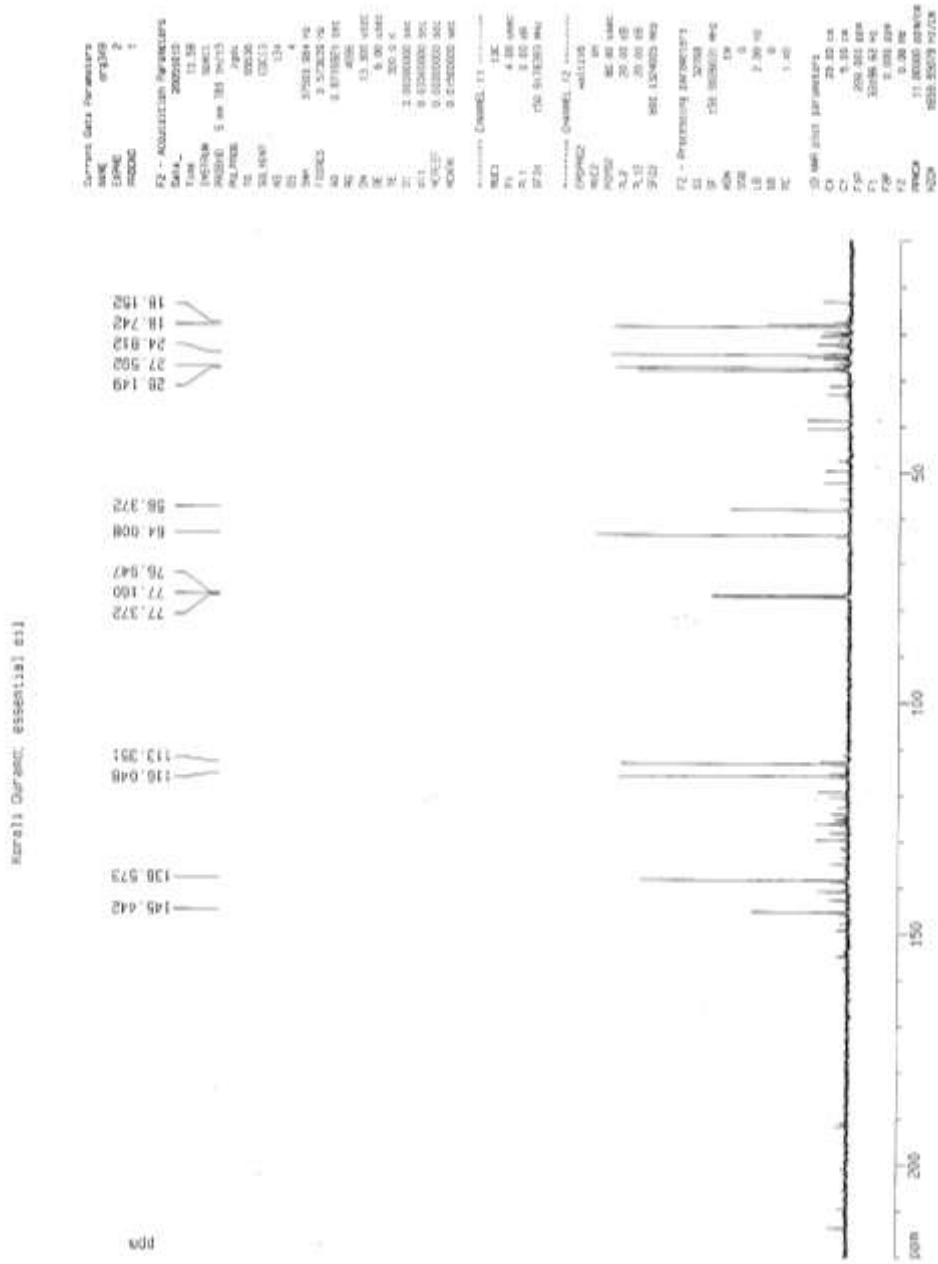


Figura 4. Átomos de carbono del Oxido de myrceno y grupo funcional presente.



Spectro 3. RMN<sup>13</sup>C (a 600 MHz, en CDCl<sub>3</sub>) del Oxido de myrceno



## **IV. RESULTADOS**

## RESULTADOS

1. Se ha logrado aislar el Óxido de myrceno, el cual se ha identificado mediante sus espectros de masas, RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (600MHz).
2. El aceite esencial contiene 7 componentes, siendo el Óxido de myrceno el constituyente principal (Figura 3, pág.35 y Tabla VI, pág. 36).
3. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) presentes en la hojas y tallos de la planta de chinche (*Tagetes elliptica Smith*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), nos indica que contiene: Aminogrupos primarios o secundarios(++), grupos fenólicos libres(++), flavonoides(++), catequinas(++), triterpenos y/o esteroides(++), saponinas(+), leucoantocianidinas y catequinas(++).

## **V. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas y tallos de la planta de chinche (*Tagetes elliptica Smith*) se aisló el Óxido de myrceno la cual ha sido identificada mediante sus espectros de Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C.
2. Además, mediante CG y CG-EM se logra identificar otros 6 constituyentes del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*: 1-Butanol-3-metil-acetato, Beta-myrceno, 1R-.alfa.-pineno, Oxirano(2-metil butilo), 1-Pentanol-5-Cyclopropylideno, BICYCLO [3.1.1] HEPT-3-EN-2ONA, 4, 6,6-trimetil.
3. El presente estudio constituye un primer aporte al estudio químico de los constituyentes presentes en *Tagetes elliptica Smith*.
4. El análisis cualitativo de los metabolitos secundario (marcha fitoquímica) presentes en la hojas de chinche (*Tagetes elliptica Smith*), según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), nos indica que contiene Aminogrupos primarios y/o secundario (++) , grupos fenolicos libres (++) , Flavonoides (++) , Triterpenos y/o esteroides (++) , Saponinas (+) y Leucoantocianidinas y Catequinas.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Agapito, T. et.al. Fito Medicina. 1100 Plantas Medicinales. Tomo I. Editorial Isabel I.R.L. 2004.
2. Bicchi, C. et.al. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. spp. *Lucida* essential oil. Pág. 47-52. *Flavour and Fragrance Journal* 1997. Galambosi, B. et.al. Phytochemical characteristics of an agreeably smelling marigold species (*Tagetes lucida* Cav.). Pág. 164-172. *Journal written in Hungarian* 2004.
3. Bolilla 4. Disponible en: <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/Farmacognosia PE80/bolilla4.pdf>
4. Bolilla 4. Disponible en: <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/Farmacognosia PE80/bolilla4.pdf>
5. Brack, Antonio. 2003. Perú: Diez mil años de domesticación. Editorial Bruño. Lima, Perú. Pág.43.
6. Cambar, P. Algunos Estudios Farmacológicos de las plantas medicinales en Honduras. Primera Jornada Científica de Facultades de Ciencias Químicas y Farmacia de Centroamérica y Panamá Agosto 1983. Disponible en *populations*. Pág 1061-1062. 1984.
7. Cerdá Virgínea, Composición Química de los Aceites Esenciales, 2002. Disponible en [http://www.geocities.com/aceites\\_esenciales/quimica.htm](http://www.geocities.com/aceites_esenciales/quimica.htm)
8. Chang, Raymond. et.al. Química ;6<sup>ta</sup> ed. McGraw-Hill. México· septiembre 1998.
9. D'Agostino, M. et.al. Flavonol Glycosides from *Tagetes elliptica*. *Fitoquímica*, Vol.31, N° 12, Pág.4387-4388, 1992.
10. Domínguez, Xorge. “Métodos de Investigación Fitoquímica”, Ed. Limusa. Pág.232. México, 1973.
11. Domínguez, Xorge.”Cromatografía en Papel y en Capa Delgada”, 1<sup>era</sup> ed. Pág. 14.1975- 2<sup>da</sup> ed.1982, México.
12. “Diagnóstico situacional sobre producción, industrialización y Comercialización de plantas medicinales y otras especies útiles”. Instituto interamericano de cooperación para la

- agricultura (IICA). Centro para el Desarrollo de la Medicina Tradicional (CEDEMETRA) 2005. Disponible en: [http://www.iica.int.ni/Estudios\\_PDF/Plant\\_Medic.pdf](http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Plant_Medic.pdf)
13. Fernández, Gilma. et.al. Tesis. Estudio del Proceso Optimo de Extracción del Aceite Esencial y Pectina de Limón (*Citrus Aurantifolia*) para la implementación de una Planta Piloto. Pág. 31.1990.
  14. Garg, S.N. et.al. Acyclic monoterpenes from the essential oil of *Tagetes minuta* flowers. Pág. 395-396 Mayo 1998.
  15. Galambosi, B.et.al. Phytochemical characteristics of an agreeably smelling marigold species (*Tagetes lucida* Cav.). Pág. 164-172. Journal written in Hungarian 2004.
  16. Gibaja, Oviedo. Guía para Análisis de los Compuestos del Carbono. Pág.171. Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú 1977.
  17. Gibaja, Oviedo. Guía para Análisis de los Compuestos del Carbono. Pág. 17-38-57-64-70. Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú 1977.
  18. Gil, A. et.al. Essential oil yierd and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Pág. 261-274. Marzo 2000.
  19. Gobierno de Chile, Fundación para la Innovación Agraria. Boletín trimestral de plantas medicinales y aromáticas. ISSN0718-0357, N° 8, correspondiente a junio de 2003. Disponible en: <http://www.fia.gob.cl/difus/boletin/bpm/bpmjunio2003.pdf>
  20. Gupta, Y.C.; Y. D. Sharma and N.S. Pathania (2002-09-09). Let the flower of gods bless you. The Tribune, Chandigarh, India (web site). Retrieved on 2007-09-01. Disponible en: [http://zipcodezoo.com/Key/Tagetes\\_Genus.asp](http://zipcodezoo.com/Key/Tagetes_Genus.asp)
  21. Gutiérrez, R. et.al. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. Pág. 883-886. Journal of the Chilean Chemical Society 2006.
  22. Hesse, Manfred. et.al. Métodos Espectroscópicos en Química Organica; 5ta Edicion, editorial Síntesis, New York, 1995.

23. Horwitz, William. et.al. Oficial Methods of Analysis of AOAC Internacional ;Edition 18<sup>th</sup> . AOAC 926.08 y 925.09, 1990.
24. Horwitz, William. et.al. Oficial Methods of Analysis of AOAC Internacional; Edition 18<sup>th</sup> . AOAC 923.083, 1990.
25. <http://www.unheval.edu.pe/investigacion/revista/Revista%20Virtual.pdf>
26. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de formas técnicas (ITINTEC 319.094), Aceites Esenciales, 1972.
27. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Formas Técnicas (ITINTEC 319.075), Aceites Esenciales, Diciembre 1974.
28. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Formas Técnicas (ITINTEC 319.081), Aceites Esenciales, Diciembre 1974.
29. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Formas Técnicas (ITINTEC 319.085), Aceites Esenciales, Diciembre 1974.
30. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Formas Técnicas (ITINTEC 319.088), Aceites Esenciales, Diciembre 1974.
31. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Formas Técnicas (ITINTEC 209.058), Aceites Esenciales, Febrero 1980.
32. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de formas técnicas (ITINTEC 209.004), Aceites Esenciales, Enero 1968.
33. Indecopi, Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de formas técnicas (ITINTEC 209.082), Aceites Esenciales, Diciembre 1974.
34. Lock de Ugaz, Olga. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales; 1era Edición, fondo editorial de la PUCP. Lima, 1988.
35. M.J.P. Ferreira. et. Al.<sup>13</sup>C NMR spectroscopy of monoterpenoids, Instituto de Quimica,Universidad de Sao Paulo, 1998



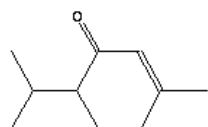
36. Martínez M, Alejandro, Aceites Esenciales, Universidad de Antioquia, Facultad Química Farmacéutica, Medellín, Febrero 2003.
37. Masada, Yoshiro. Analysis of Essential oils by gas chromatography and Mass Spectrometry. New York, 1919.
38. Ogunwande, Isiaka A. et.al. The essential oil from the leaves and flowers of "African Marigold," *Tagetes erecta* L. Pág. 366-368. Journal of Essential Oil Research 2006.
39. Parodi, F. et.al. Benzofuran and Bithiophenes from Root Cultures of *Tagetes patula*. Journal of Natural Products Vol.51, N° 3, Pág.594-595, May-Jun 1988.
40. Pavia, Donald. et.al. Introduction to Spectroscopy; second edition. Saunders College Publishing, United States of America, 1996.
41. Pineda, C. Actividad Antimicrobiana del extracto de Hojas de Chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra *Salmonella typhimurium* en Cobayos (*Cavia porcellus* L.) 2007. Disponible en:
42. Quiored - Tutorial de Espectroscopía\_ Elucidación estructural espectroscopía de infrarrojo.htm
43. Quiored - Tutorial de Espectroscopía\_ Elucidación estructural espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis).htm
44. Quiored - Tutorial de Espectroscopía\_ Elucidación estructural Resonancia Magnética Nuclear (<sup>13</sup>C RMN).htm
45. Ramírez, Nuria. Destilación, Teoría y Tipos, Copyright 2002-2005. Disponible en : <http://www.alambiques.com/destilaciones.htm>
46. Romagnoli, C. et.al. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. Journal Protoplasma (2005), 225(1-2), 57-65.
47. Rondina, R. and Coussio, J., Revista de Investigaciones Agropecuarias – INTA (Buenos Aire-Argentina), serie 2, Vol. VI, N° 22,351-366 (1969). Estudio Fitoquímico de Plantas medicinales.

48. Rondon, M. et.al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Revista Latinoamericana de Quimica* (2006), 34(1-3), 32-36.
49. Sagar, D. et.al. Composition of essential oils of *Tagetes patula* L. growing in Northern India. *Journal of Essential Oil Research* (2005), 17(4), 446-448.
50. Szarka, Sz. Et.al. GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Journal Chromatographia* 2006.
51. Sefidkon, F. et.al. The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. Pág. 579-581. *Flavour and Fragrance Journal* 2004. Gil, E. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de Cardamomo, bajo la filosofía “Cero Emisiones” 2005.
52. Silverstein, Robert. et.al. Identificación Espectrometría de Compuestos Orgánicos; 1<sup>era</sup> Edición, editorial Diana, Mexico 1980.
53. Singh, Gurdip. et.al. Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. Pág. 62-65. *Flavour and Fragrance Journal* 2003.
54. Skoog, Douglas. et.al. Principio de Análisis Instrumental; 5<sup>ta</sup> ed. Mc Graw Hill, Madrid 2001.
55. Soule, J.A. *Tagetes minuta*: A potential new herb from South America. P. 649-654. In: J. Janick and J.E. Simon (eds), *New crops*. Wiley, New York 1993.
56. Szarka, Sz. et.al. GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Journal Chromatographia* 2006.
57. Wagner, Hildebert. et.al. *Plant Drug Analysis*; second edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

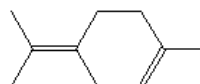
## **VII. ANEXOS**

ANEXO N° 1

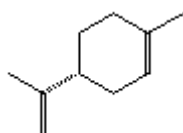
Estructuras aisladas del Género *tagetes*



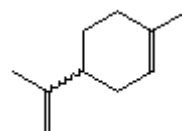
Piperitona



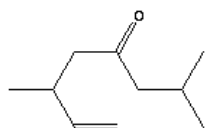
Terpinoleno



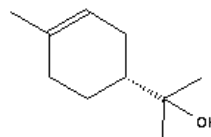
(+)- Limoneno



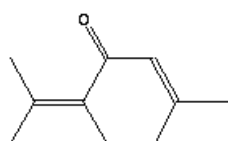
Limoneno



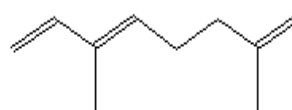
Dihydrotagetona



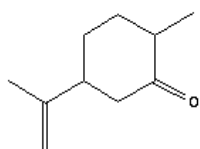
Terpineol



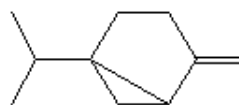
Piperitenona



ocimeno

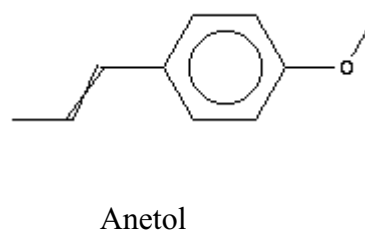
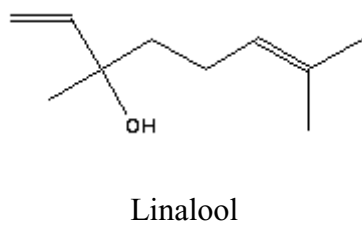
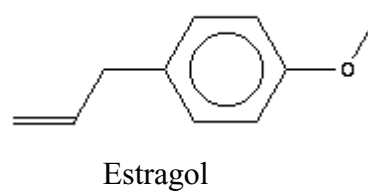
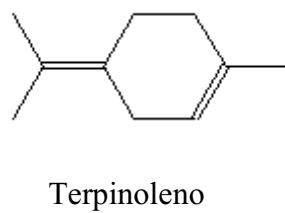
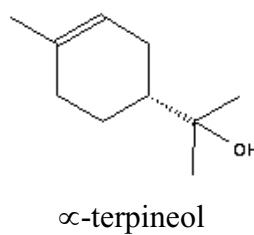
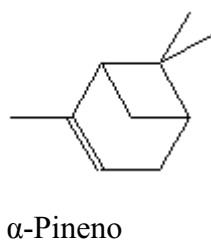
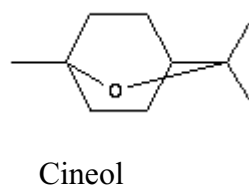
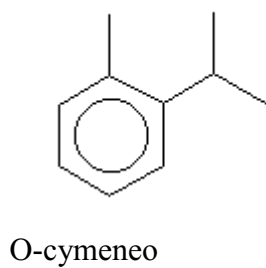
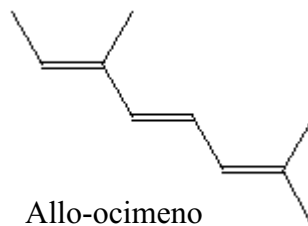
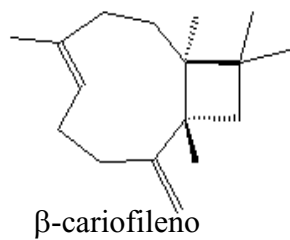


Dihydrocarvona

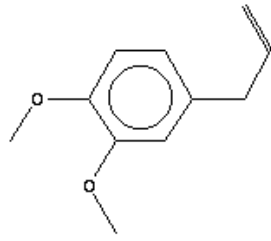


Sabineno

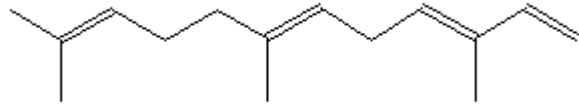
Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica* Smith (chinche)



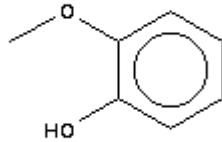
Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica* Smith (chinche)



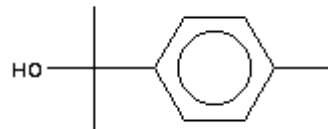
Eugenol metil eter



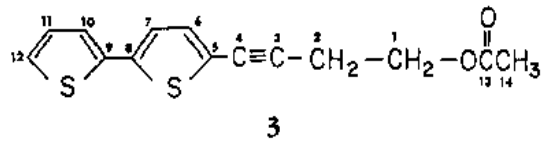
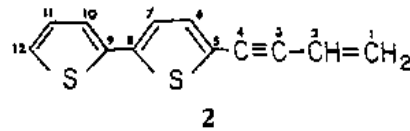
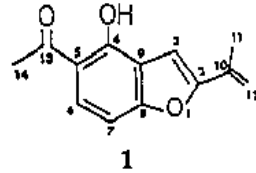
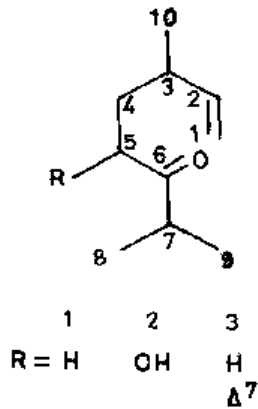
Farneseno



Guajol



P-cymen-8-ol

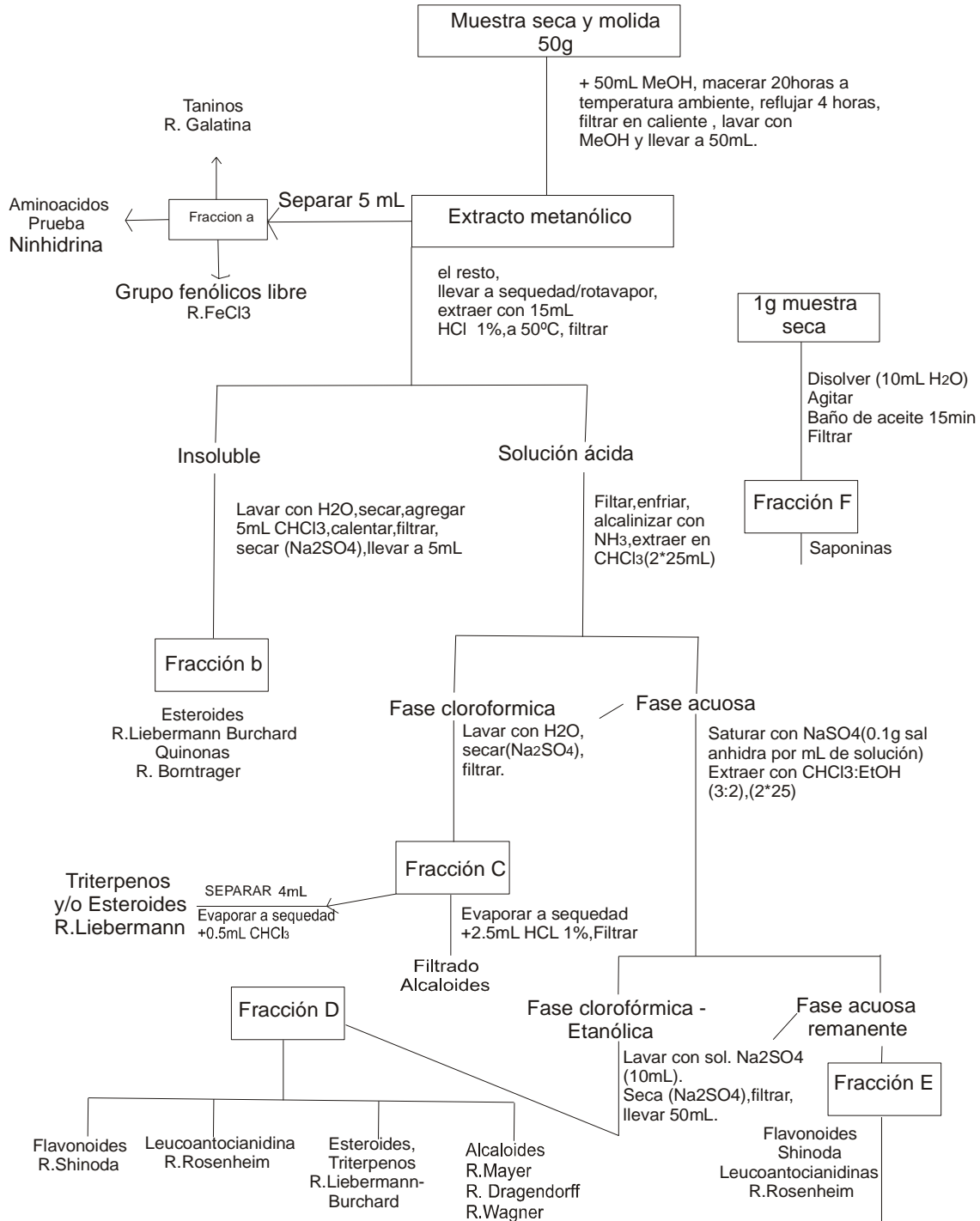


- 3, 7-dimetiloct-1-en-6-ona (1) (5-acetyl-4-hydroxy-2Isopropenylbenzofurano  
 (2) 5-(4-acetoxy- 1-butinilo)-2,2 '-bitiofeno  
 (3) 5-(buten- 1-nyl)-2,2 '-bitiofeno

ANEXO N°2

MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR (RONDINA & COUSSIO, 1969)

1. Diagrama de Proceso Químico (Obtención de fracciones)



## 2. Prueba de identificación de principios activos.

### a. Prueba de Ninhidrina

Detección de amino grupos primarios o secundario

Los aminogrupos primarios o secundarios pueden ser aminoácidos libres, amins, alcaloides primarios o secundarios, etc. Para detectar la presencia de aminogrupos se usa la prueba de ninhidrina.

Las amins primarias reaccionan con el ácido nitroso formando sales de diazonio. Las sales de diazonio de las amins alifáticas primarias, se descomponen, dando iones de carbonio con eliminación de nitrógeno.

Las amins secundarias reaccionan con ácido nitroso, dando nitroso derivados oleosos, que generalmente son de color amarillo o rojo. Estos nitrosos derivados se pueden reconocer mediante la reacción de Liebermann.

Prueba de Ninhidrina

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de amins en general. Los  $\alpha$ -aminoácidos en solución acuosa calentados en presencia de ninhidrina producen color azul-violeta. Aún se desconoce el mecanismo de esta reacción Este ensayo se considera positivo si se desarrolla un color violeta.

Detección de aminogrupos primarios o secundarios

Se realiza sobre las fracciones (a) y (f)

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de amins en general. Los  $\alpha$ -aminoácidos en solución acuosa calentados en presencia de ninhidrina producen color azul-violeta.



## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

- Sobre la parte central de tres papeles de filtro lento 2 x 3 cm., se agregó, con ayuda de una pipeta pasteur, dos gotas de la fracción (a), de la fracción (f) y de agua destilada, esta última servirá como referencia. Los papeles se dejaron secar a temperatura ambiente.
- Luego sobre la parte central de cada uno de los papeles se agregaron dos gotas de solución de ninhidrina al 0.2% en etanol.
- Todos los papeles se colocaron en una estufa a 120°C durante 30 minutos.

Observaciones: Tanto para la fracción “a”, como para la fracción “f” presenta una mancha color violeta claro en el papel, para ambas fracciones indica que la prueba es positiva.

### **b. Pruebas con el reactivo Ferríco**

Detección de grupos fenólicos libres

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se le agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro ferrico. Dada la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo

Su estructura química les permite ser potentes antioxidantes.

Entre los compuestos fenólicos de mayor importancia tenemos: Taninos, Flavonoides, Quinonas, Antocianinas y Catequinas

Identificación

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

Debido a lo sencillo de la oxidación de fenoles a quinonas, el cloruro férrico,  $\text{FeCl}_3$ , puede identificar su presencia. La mayoría de los fenoles y enoles reaccionan con cloruro férrico para dar lugar a productos de oxidación y complejos de color. Si el extracto de la planta se realiza en alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. Si el extracto es acuoso el ensayo determina fundamentalmente taninos.

Coloración rojo-vino: Compuestos fenólicos en general.

Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.

Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánico.

Todavía se desconoce la naturaleza de tales complejos, y la prueba del cloruro férrico también es sensible al disolvente. Aun cuando la producción de color es típica de los fenoles y enoles muchos de ellos no producen colores, de modo que una prueba negativa de cloruro férrico no puede excluir un compuesto fenólico.

Detección de grupos fenólicos libres

Se realiza sobre la solución acuosa (a)

- El resto de la fracción (a) se llevo a sequedad en baño maría.
- El residuo fue disuelto en 0,5 mL de agua destilada y se filtró a través de papel de filtro lento hacia un tubo de ensayo de 13x100 mm (solución acuosa (a)).
- Finalmente coloque dos gotas de la solución acuosa (a), en una luna de reloj y a continuación se agrego una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1%.

Observaciones: La solución acuosa de la muestra presentó un cambio de coloración de amarillo a verde oscuro la prueba es positiva.

### **c. Detección de los Taninos**

#### **Definición y Propiedades**

Los taninos son compuestos polifenólicos de estructura variada, de sabor astringente, tienen pesos moleculares entre 500 y 3000, se oxidan al contacto con el aire, son inodoros y de sabor agrio, solubles en agua, alcohol y acetona; reacciona con el cloruro férrico y otras sales; es combustible con un punto de inflamación de 199°C, poco tóxico por ingestión o inhalación, precipitan con los alcaloides, gelatina y otras proteínas. Los taninos se producen en diversas partes de las plantas: corteza, frutos, hojas, raíces y semillas; a pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas le da a los taninos diferencias en color, calidad y concentración. Desde el punto de vista biológico los taninos son sustancias complejas que cumplen funciones antisépticas o de conservación.

#### **Clasificación**

La clasificación de los taninos se hace en base a dos criterios:

Productos resultantes de la destilación seca: taninos hidrolizables y taninos condensados

Origen: taninos fisiológicos y taninos patológicos.

##### a) Taninos Hidrolizables,

Son poliésteres de glúcidos (o de compuestos semejantes) y ácidos fenóles. Pueden ser hidrolizados en medio ácido o alcalino, o por vía enzimática desdoblándolo en ácido fenol y en osas.

Según la naturaleza del ácido fenol se les divide en:

a.1) Taninos Gálicos, constituida por ácido gálico o ácido hexahidroxidifénico, los taninos gálicos, están constituidos por un núcleo central -poliéster de un azúcar y por una cadena lateral de ácidos gálicos unidos por enlaces depsídicos. El desdoblamiento de enlaces

bifenílicos origina moléculas globulosas, más rígidas, cuya solubilidad y capacidad curtiende se modifican.

a.2) Taninos Elágicos o Elagitaninos, su componente principal es el ácido elágico, los taninos elágicos provienen de los derivados del ácido hexahidroxidifénico.

Los taninos son característicos de las dicotiledóneas, especialmente en las anacardiáceas.

b) Taninos Condensados, Son polímeros de unidades flavánicas; están constituidos por unidades flavonoides, No poseen azúcar.

c) Taninos fisiológicos, son el resultado de las funciones metabólicas de la planta.

d) Taninos Patológicos, son una respuesta al ataque de insectos, ya sea por ovóposición o por picadura.

### **Propiedades Fisiológicas de los Taninos**

Las aplicaciones de las drogas con taninos son limitadas y derivan de sus propiedades astringentes: por vía interna ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico, por vía externa impermeabilizan las capas externas de la piel y mucosas, protegiendo así las capas subyacentes; a esto hay que añadir un efecto vasoconstrictor sobre los pequeños vasos superficiales. Al precipitar las proteínas, los taninos originan un efecto antimicrobiano y antifúngico. Además los taninos son hemostáticos, también precipitan alcaloides, esto le permite ser usados como antídoto en caso de intoxicación.

### **Identificación**

Para determinar la existencia de taninos, se utiliza la prueba de la gelatina. En ésta reacción ocurre la hidrólisis del tanino dando un compuesto fenólico y un azúcar. Un precipitado negro indica prueba positiva).

### **Detección de Taninos**

Se realiza sobre la solución acuosa (a)

Ocurre la hidrólisis del tanino dando un compuesto fenólico y un azúcar. La formación de precipitado nos indica prueba positiva.

- I. Se colocaron 4 gotas de la solución acuosa (a) sobre una luna de reloj y a continuación se adicionaron dos gotas de solución de gelatina al 0,5%. Se repitió la misma metodología con una muestra de agua destilada.

Observaciones: Se puede notar que no hay presencia de precipitado la prueba es negativa.

#### d. Reacción de Shinoda

Detección de Flavonoides, excepto chalconas, dehidrochalconas, auroras, Catequinas e isoflavonas

#### Definición

Todos los flavonoides son compuestos fenólicos que forman pigmentos difenilpropanos y pertenecen a uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antoxantinas.

Los Flavonoides se caracterizan por tener un esqueleto de 15 carbonos que provienen biogénicamente de tres unidades de acetato ( $C_6-C_3-C_6$ ) y una unidad de fenilpropano ( $C_6-C_3$ ), por ello su esqueleto se representa por  $C_6-C_3-C_6$  en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden formar o no un tercer anillo, en caso de existir es llamado anillo C.

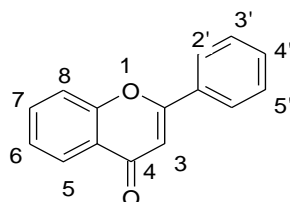


Figura A. Núcleo Básico de un flavonoide. La modificación de B y C producen conjuntos adicionales de flavonoides

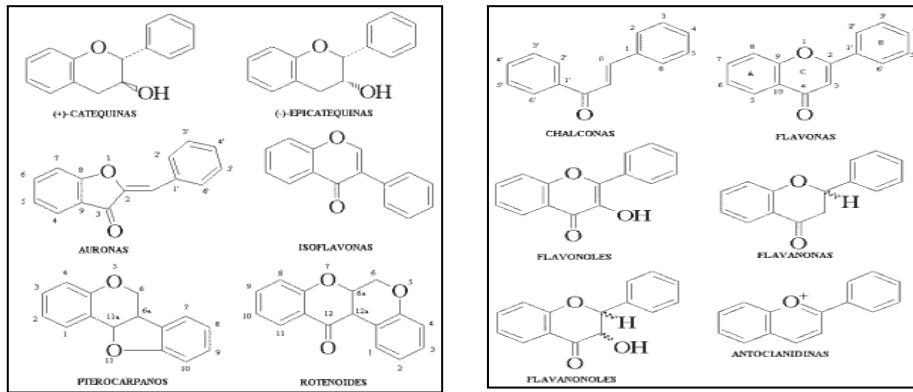


Figura B. Estructuras Base de los Principales Tipos de Flavonoides

### Características

- Solubilidad en agua y en etanol.
- Carácter fenólico y su intensa absorción en la región UV y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.
- Los flavonoides pueden ser coloreados o incoloros, como las antocianinas que son colorantes naturales (azules, violetas y rojos), las chalconas tienen color anaranjado, los flavonoles y las flavonas son amarillos (flavas = amarillo), las leucoantocianidinas y las catequinas son incoloras.
- Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona.
- Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes.

### Propiedades Físicas

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y de la forma como se presenta (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido

al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C-2 presentan rotación óptica.

Así mismo la solubilidad depende de la forma como se presenta, del número y clase de sustituyentes presentes.

### **Ensayo de Shinoda**

Es el ensayo más usual para la detección de flavonoides, en el extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se coloca un trozo de cinta de magnesio y unas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de color indica la presencia de:

- ♦ Flavonas y flavonoles: amarillo a rojo.
- ♦ Flavanoles: rojo a magenta.
- ♦ Flavanonas: rojo, magenta, violeta, azul.
- ♦ Isoflavonas: amarillo.
- ♦ Isoflavanonas, chalconas, auronas no dan coloración.

Al añadir un poco de alcohol amílico y agitar, el color pasa a la fase amílica.

### **Acción fisiológica**

Usados como tónicos venosos y protectores capilares, algunos son diuréticos, antiinflamatorios, antiespasmódicos, etc.

Detección de flavonoides, excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavonas.

Se realiza sobre la solución etanólica (d) y la fracción (e)

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

Los flavonoides al ser tratados con HCl y Mg dan complejos coloreados (de color rojo pálido a oscuro). Al añadir un poco de alcohol amílico y agitar, el color pasa a la fase amílica. La prueba se considera positiva si se desarrolla un color naranja, carmelita, rojo o violeta.

- I. La fracción (d) se colocó en un balón de 100 mL y llevo a sequedad en baño maría.
- II. El residuo se disuelve con 2,5 mL de etanol, dentro de un “baño maría”. Luego se filtro hacia un tubo de ensayo de 13x100 mm (solución etanólica (d)).
- III. En un tubo de ensayo se colocaron 3 gotas de la solución etanólica (d) y en otro 2 mL de la fracción (e), junto con 2 mL de agua destilada. Enseguida se adicionó a cada tubo 1 mL de HCl 12 N y unas limaduras de magnesio, se agitó y se dejó en reposo durante 5 minutos.
- IV. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron unas 10 gotas de alcohol amílico y se dejó en reposo.

Observaciones: En el caso de la fracción (d) de la muestra de las hojas, la fase amílica es de color amarillo tenue y la fase acuosa es incolora, la prueba es negativa. Por otro lado para la fracción (e) de la muestra de las hojas, las fases acuosa es de color marrón y la fase amílica es de color rojo, la prueba es positiva.

### **e. Reacción de Liebermann – Burchard**

#### **Detección de Triterpenoides y Esteroides**

Los Triterpenos son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos,



Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

pudiendo contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides.

Los Esteroides, biogenéticamente muy relacionados a los Triterpenos, y con un esqueleto cíclico base al igual que los Triterpenos tetracíclicos, de ciclopentanoperhidrofenantreno, pueden ser clasificados como esteroides ( $C_{27}$  o mas), saponinas esteroidales (o sus agliconas sapogeninas), glucósidos cardiacos, esteroalcaloides y las llamadas hormonas esteroidales que hasta la década del 60 eran consideradas exclusivamente de origen animal, pero que a partir de 1966 han ido aislándose de tejidos de plantas aunque en concentraciones muy pequeñas, y en algunos como trazas.

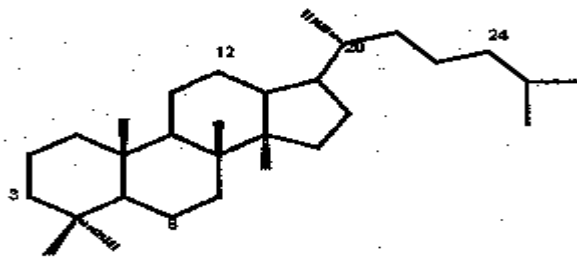


Figura C. Danmarano

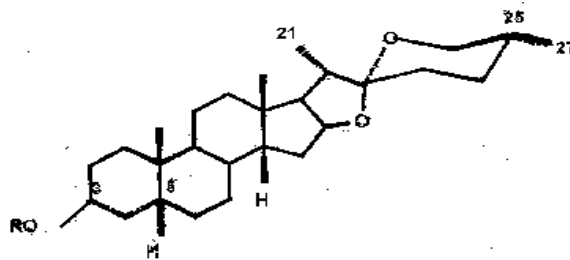


Figura D: Diosgenina

(R=H)

### **Identificación**

La reacción de Lieberman-Burchard permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y esteroides, ocurre una deshidratación con formación de un doble enlace conjugado a un segundo doble enlace, lo que da un producto coloreado (5, 20)

La prueba positiva da un cambio rápido de coloración:

- ♦ Rosado azul muy rápido
- ♦ Verde intenso-visible rápido
- ♦ Verde oscuro negro final de la reacción

A veces el ensayo queda en dos fases, formando anillos de color naranja, azul. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

La reacción de Lieberman-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Para realizar este ensayo no debe haber agua en el medio, ya que puede reaccionar violentamente con el  $H_2SO_4$ .

Se realiza sobre la fracción b, la solución clorofórmica (c) y la solución clorofórmica (d)

La formación de anillos de color naranja, azul o verde nos indica una prueba positiva.

Nota: El color y la intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

- I. Se separó 4mL de la fracción (c) en un tubo de 16x180 mm, se llevo a sequedad y se disolvió con 0,2 mL de cloroformo. A esta solución se le denomino solución clorofórmica (c).
- II. En un tubo de 13x100 mm se colocaron 5 gotas de la solución etanólica (d), se llevo a sequedad y el residuo se disolvió con 2 gotas de cloroformo.
- III. En una placa de toque y en posiciones diferentes se colocaron, dos gotas de la fracción (b), la solución clorofórmica (c) y la solución clorofórmica (d). Luego se adiciono 2 gotas de anhídrido acético y se mezclo bien. Finalmente se adicionó con cuidado y sin agitar 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Observaciones: Las fracciones (b) y (c) de la muestra de las hojas presentaron anillos de color verde y naranja respectivamente. La solución (d) presento anillos de color naranja. La prueba es positiva.

### **f. Reacción de Borntrager**

Detección de Naftaquinonas y Antraquinonas, Antronas o Antranoles

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales y son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. Son compuestos aromáticos polihidroxilados más o menos metilados y cuando hay sustituyentes en la posición C-2 ó en C-3, el estado de oxidación del átomo de carbono puede variar y ser -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -CHO, -COOH o formar grupos más complejos.

Las antraquinonas naturales se encuentran libres y al estado de combinaciones glicosídicas. Pueden hallarse en la corteza y la raíz de los diversos géneros y especies de las familias: Rubiáceas, Rhamnáceas, Poligonáceas, Leguminosas, Escrofulariáceas, Liliáceas y Verbenáceas; en los líquenes, hongos, y en los insectos tintóreos de la familia de los Cócidos

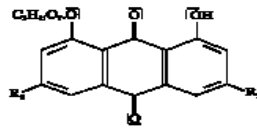


Figura E. 8—Monoglicósidos antraquinónicos en *Cassia* spp

(I) R1= CH<sub>2</sub>OH R2= H Aloe-emodin-8-glicósido

(II) R1= CH<sub>3</sub> R2= H Crisofanol-8-glicósido

(III) R1= CH<sub>3</sub> R2= OH Emodin-8-glicósido

(IV) R1= CH<sub>3</sub> R2= OCH<sub>3</sub> Fiscion-8-glicósido

Se realiza sobre la fracción (b)

- I. El resto de la fracción (b) de colocó en un tubo de ensayo de (13x100 mm), se añadió 5 mL de hidróxido de sodio al 5% y se agitó.

Observaciones e interpretación de resultados: La presencia de un color rosado nos indicara prueba positiva. La fracción (b) de la muestra de las hojas presento color verde con formación de precipitado nos indica que la prueba es negativa.

#### **g. Drangendorff y Mayer**

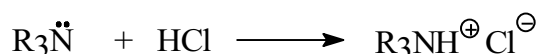
El término alcaloide (análogo a los álcalis) fue aplicado inicialmente a los compuestos de origen vegetal que tienen propiedades alcalinas (básicas) asociadas a la presencia de algún átomo de nitrógeno en la molécula como parte de un anillo heterocíclico o a veces como parte de una cadena alifática lateral, dicho término fue propuesto por el químico farmacéutico (W. Meissner en 1819). Con el transcurrir de los años se comprobaría que los alcaloides no solo son propios del reino de las plantas, sino que también se presentan raramente en animales;

por ejemplo la samandirina, es el alcaloide principal de la glándula venenosa en la piel de la Salamandra maculosa.

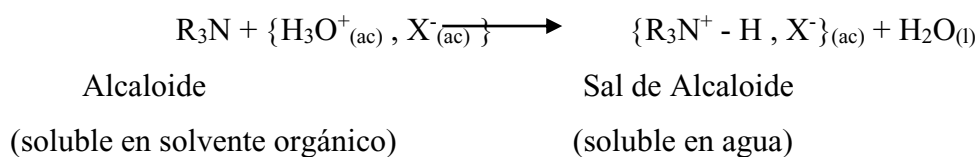
Los alcaloides generalmente tienen una pronunciada acción fisiológica sobre el organismo viviente; muchos son venenosos. Por lo tanto, ellos son de considerable importancia en farmacología, medicina y toxicología. Es así que 1805 la medicina hace uso por primera vez de un alcaloide extraído de los botones de opio *Papaver somniferun*, su nombre, morfina. Estudios posteriores demostrarían que los alcaloides se presentan en abundancia en ciertas familias de plantas: *Papaveracea*, *Papilionacea*, *Ranunculacea*, *Rubicacea*, *Rutacea* y *Solanacea*.

La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos, en algunas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; algunos alcaloides pueden encontrarse en forma de glicósidos o en forma de ésteres de ácidos orgánicos.

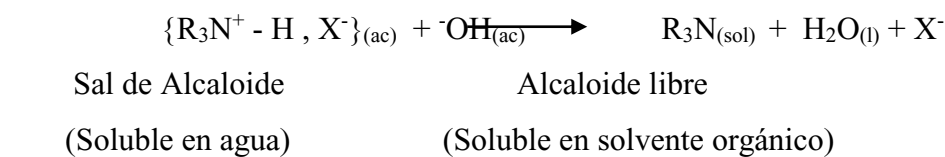
Los alcaloides como compuestos básicos tienen una marcada reactividad frente los ácidos orgánicos o inorgánicos; el átomo de nitrógeno acepta protones del ácido y forma compuestos aditivos conocidos como sales:



Reacción de alcaloides en medio ácido:



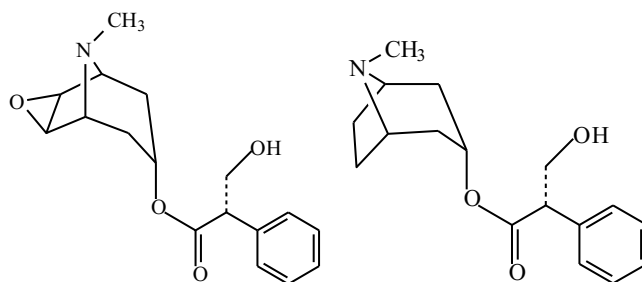
Reacción de sales de Alcaloides en medio básico:



donde:  $X^- = Cl^-$ ,  $OSO_2OH$

Generalmente los alcaloides son insolubles en agua y más o menos solubles en solventes orgánicos, mientras que sus sales tienen características de solubilidad opuesta. Esta combinación de propiedades se emplea para separar los alcaloides de otros tipos de compuestos: Si una mezcla de un alcaloide con otro compuesto se trata con solución de ácido diluido y se agita con un solvente orgánico adecuado, el otro compuesto se extrae en el solvente orgánico, mientras que el alcaloide permanece en la capa ácida. Luego la adición de hidróxido de sodio a la fase ácida liberará los alcaloides, el cual puede ser extraído en un solvente orgánico. Esta secuencia de operaciones es la base del aislamiento y purificación de los alcaloides.

Por razones históricas y debido a la complejidad estructural que presentan los alcaloides, su nomenclatura no ha sido sistematizada. Los alcaloides suelen ser designados según el género de la planta que los contienen y de la cual fueron aislados inicialmente. Son clasificados de acuerdo a la similitud de las estructuras moleculares más simples y comunes, así por ejemplo los denominados alcaloides del tipo indólico contienen en su molécula al grupo indol o una modificación del mismo alcaloide; de la misma manera también se presentan alcaloides del tipo: pirrolidínicos, piridínicos, morfínicos, quinolínicos, etc.; sin embargo los alcaloides pueden clasificarse de acuerdo a la posición del átomo de nitrógeno en: alcaloides heterocíclicos, alcaloides con nitrógeno exocíclico, alcaloides peptídicos, alcaloides de espermina y espermidina, alcaloides diterpénicos y alcaloides esteroidales.



escopolamina

hiosciamina

Figura F. Escopolamina y Hiosciamina

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

La gran mayoría de los alcaloides pueden ser detectados por reacciones de precipitación con diversos reactivos característicos, debido a la gran heterogeneidad de los alcaloides existen numerosas pruebas de color o de precipitación que solo son positivos con cierto tipo de alcaloides, entre los de uso más común están el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Mayer, y el reactivo de Wagner. Existen alcaloides que contienen grupos funcionales que pueden ser determinados mediante reactivos especiales; así, los alcaloides con hidróxidos fenólicos pueden dar coloraciones con el cloruro férrico o las sales de arildiazonio. Los de tropano dan coloración con el reactivo de Vitali.

### Detección de alcaloides

Se realiza sobre la solución ácida (c) y la solución ácida (d)

- I. El resto de la fracción (c) se llevó a sequedad y el residuo se disolvió con 2,5 mL de  $\text{HCl}_{(ac)}$  al 1%, calentando ligeramente ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Se filtra si es necesario.
- II. De la solución ácida obtenida, se dispone 3 gotas por separado, en tres lunas de reloj ( $\Phi = 75\text{mm}$ ) y se adiciona en cada caso 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.
- III. Se dispone 5 gotas de la “solución d” en un tubo de ensayo  $7*60\text{mm}$ ) y se lleva a sequedad. El residuo se disuelve en 4 gotas de ácido clorhídrico  $\text{HCl}_{(ac)}$  al 1%.
- IV. Se filtra a través de papel de filtro lento; se reparte el filtrado en tres lunas de reloj y se adiciona los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

Observaciones e interpretación de resultados: La formación de un precipitado naranja, crema y marrón, respectivamente nos indicara prueba positiva.

La solución ácida (c) y la solución ácida (d) luego de adicionar los reactivos Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente se observó soluciones incoloras y naranja respectivamente, que indica que la prueba es negativa.

## h. Reacción de Rosenbeim

Detección de Laucoantocianidinas (rojo ) y Catequinas (marron)

### Leucoantocianidinas

Son compuestos incoloros, que al hidrolizarlos con HCl hirviente producen antocianidinas (antocianinas libres de azúcares, es decir son agliconas). La base de las leucoantocianidinas es el flavon 3,4-diol. Las leucoantocianidinas reciben el nombre de la antocianidina a la que dan origen, Ej. leucoantocianidina, leucodelfinina

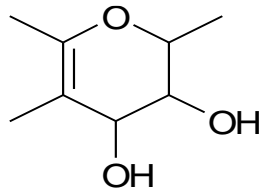


Fig. 3. Estructura Base de las Leucoantocianidina

### Catequinas

Las catequinas es una clase de flavonoides, se caracteriza por tener un solo grupo hidroxilo en la porción de tres carbonos, en la posición 3, siendo polihidroxi flavan-3-oles.

#### Identificación

La prueba de Rosembeim se utiliza para detectar catequinas y leucoantocianidinas. La presencia de color rojo o marrón en la fase amílca indicará prueba positiva

Se realiza sobre la fracción (e) y la solución etanólica (d)

- I. En un tubo de ensayo de 13 x100 mm se coloca 3 gotas de la solución etanólica (d) junto con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo 2 mL de la fracción (e).



## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

- II. Luego a ambos tubos se agregó 1 mL de HCl<sub>(ac)</sub> 12N, se agitó y se colocaron en “baño maría” durante 10 minutos.
- III. Se dejó enfriar la mezcla, luego se adicionaron 6 gotas de alcohol, se agito, y se dejo reposar.

Observaciones e interpretación de resultados: La presencia de color rojo

(Leucoantocianidinas) o marrón (catequinas) en la fase amilica nos indicara prueba positiva.

La fase amilica de la solución etanólica (d) es incoloro la prueba es negativa.

### **i. Prueba de Espuma**

#### **Detección de saponina**

#### **Saponinas**

Las saponinas son glicósidos vegetales que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, formando espuma y soluciones acuosas jabonosas. Por hidrólisis de las saponinas se obtiene carbohidratos y una aglicona denominada sapogenina la cual puede tener un esqueleto esteroideal o triterpénico

#### **Clasificación**

Se las divide en dos grupos, según la naturaleza de la aglicona:

a) Saponinas Triterpenoides, se encuentran extensamente distribuidas y constituyen la mayoría de las saponinas encontradas en la naturaleza, una gran variedad de ellas difieren únicamente en el número y tipo de unidades de azúcar unidas a las sapogeninas, Ej.

glicirricina

b) Saponinas esteroides, son materia inicial para la preparación de varios productos muy potentes y ampliamente usados como productos farmacéuticos, entre ellos: cortisona, antioceptivos, etc. Ej. Digitoxigenina .

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

Las saponinas no son fáciles de aislar, pero se puede aislar su correspondiente sapogenina libre de azúcar. Con pocas excepciones el azúcar está unida a la aglicona a través del grupo OH del C3. Causan hemólisis (destrucción de glóbulos rojos).

### Identificación

Para detectar la presencia de saponinas en un extracto se utiliza la prueba de la espuma. Esta prueba sirve para identificar ambos tipos de saponinas.

Observaciones: Tanto para la fracción “a”, como para la fracción “f” presenta una mancha color violeta claro en el papel, para ambas fracciones indica que la prueba es positiva

Se realiza sobre la fracción (f)

Las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas producen espuma de manera similar al jabón

- I. Se colocó 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se agitó durante 15 segundos. Luego se dejó en reposo durante 15 minutos, al cabo de lo cual se midió la altura de la espuma.

Observaciones e interpretación de resultados: Si después de los 15 minutos de reposo la altura de la espuma es mayor o igual a 5mm, nos indicara prueba positiva.

La altura de la espuma formada en la fracción (f) al cabo del tiempo mencionado fue de 5.2mm. La prueba es positiva.

**ANEXO N°3**

**3. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR**

**Resultados de la Marcha Fitoquímica Preliminar (De acuerdo al procedimiento de Rondina δ Cussio 1969)**

Prueba N°	Clase de producto Natural	Pruebas de Coloración o precipitación	Fracción	Resultados (**)	Observaciones
1	Aminogrupos primarios o secundarios	Ninhidrina	a	++	Mancha de color violeta
			f	++	Mancha de color violeta
2	Grupos fenólicos Libres	Cloruro Férrico	a	++	Coloración verde oscuro
3	Taninos	Gelatina	a	-	Aparición de pequeñas partículas verdes
4	Flavonoides *	Reacción de Shinoda	d	-	Fase amílca roja y acuosa incolora
			e	++	Fase amílca roja y acuosa ligeramente amarilla
5	Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	++	Anillos verde y azul
			c	++	Anillos naranja y marrón
			d	++	Anillos naranja y marrón
6	Quinonas, antranas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	-	Solución de color verde, formación de precipitado
7	Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	c	-	No hay Precipitado rojo
			d	-	No hay Precipitado rojo
		Reactivo de Mayer	c	-	No hay Precipitado blanco
			d	-	No hay Precipitado blanco
8	Leucoantocianidinas (rojo), Catequinas (marrón)	Reacción de Rosenbein	d	-	La fase amílca es marrón
			e	++	La fase amílca es rojo
9	Saponinas	Prueba de espuma	f	+	Altura de la espuma: 5.2mm

\*\* Convención (+++) abundante; (++) regular; (+) poco

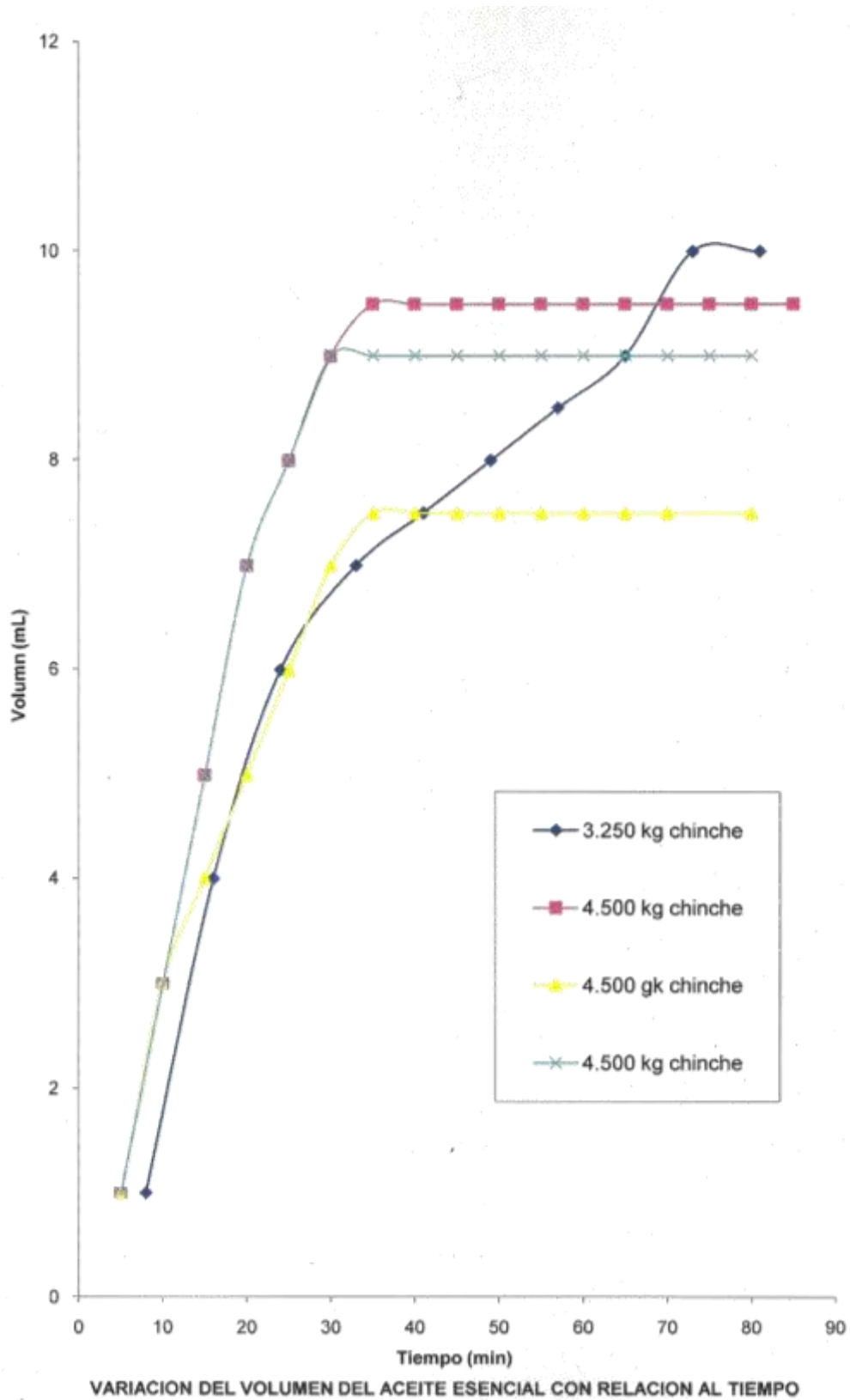
**ANEXO N°4**

**CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO DE EXTRACCION POR  
ARRASTRE DE VAPOR**

El equipo de extracción por arrastre de vapor esta constituido con acero inoxidable y consta de tres cuerpos:

- a) Cámara generadora de vapor de agua:  
Capacidad total: 33.5 litros  
Capacidad de operación: 10litros de agua  
Diámetro: 25cm  
Altura: 69cm
  
- b) Cámara de extracción :  
Capacidad: 15 litros  
Capacidad de carga: Según material orgánico  
Diámetros interno: 20cm  
Altura: 48cm
  
- c) Refrigerante:  
De forma recta, 5 cm de diámetro externo por 60cm de longitud, 1.5cm de diámetro interno.
  
- d) Accesorios:  
Tapa con empaquetadura de jebe y tornillos  
Parrilla  
Soporte del refrigerante  
Altura: 48cm  
Probeta florentino de 100mL

**ANEXO 5**  
**VARIACION DE VOLUMEN DEL ACEITE ESENCIAL CON RELACION AL TIEMPO**



## ANEXO N°6

### CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL Y SUS COMPONENTES

#### 1.- Determinación de las Constantes del Aceite Esencial

##### 1.1 Índice de Refracción (IR)

Se hace circular a través del prisma una corriente de agua de temperatura constantes dejan pasar unos cuantos minutos antes de hacer la lectura para que el instrumento y la muestra puedan llegar a tener la misma temperaturas. Se eliminan los colores del campo visible girando la cabeza del tornillo del compensador hasta obtener una línea clara de separación. Se ajusta la línea divisoria sobre el punto de intersección de lo haces cruzados. Se lee el índice de refracción directamente sobre la escala del sector.

$$IR_{(T=20^{\circ}C)} = 1.4690$$

##### 1.2 Densidad (D)

- Se pesa un picnómetro vacío y seco de 10mL
- Se coloca el Aceite Esencial a una temperatura de 20°C.
- Finalmente se seca la parte exterior del picnómetro y se pesa inmediatamente.

$$D = \frac{W_{\text{picnómetro + muestra}} - W_{\text{picnómetro}}}{W_{\text{picnómetro + agua}} - W_{\text{picnómetro}}}$$

**TABLA XVI.DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE LA DENSIDAD**

Peso (picnómetro + muestra)	Peso ( picnómetro +agua)	Peso ( picnómetro )	Densidad (g/mL)
29.7773	31.1603	21.1603	0.8617
29.7983	31.1611	21.1610	0.8637
29.8009	31.1603	21.1600	0.8640
Promedio de la densidad: 0.8631g/mL			

### 1.3 Índice de Acidez (IA)

Colocar 1mL de la muestra, agregar 5mL de etanol y 5 gotas de fenolftaleina y titular con KOH etanólico 0.1N hasta la aparición de una coloración persistente por 30seg. Paralelamente hacer una prueba en blanco.

La normalidad estandarizada de KOH fue de 0.8388N

**TABLA XVII .DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ**

Muestra	Volumen de KOH (mL)	Peso de muestra (g)	índice de acidez (mg KOH/1g )
M1	0.10	0.8632	4.9
M2	0.10	0.8632	4.9
BK	0.01	0.0000	-

$$IA = 4.9$$

### 1.4 Índice de Ester

Colocar 1mL de la muestra, agregar 25mL de KOH etanólico 1N y reflujar 45min. Enfriar. Agregar 20mL de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleina. Titular con HCL 0.5N. Paralelamente hacer una prueba en blanco. La normalidad estandarizada de HCL fue de 0.4367N.

**TABLA XVIII .DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ESTER**

Muestra	Volumen de HCL (mL)	Peso de muestra (g)	Índice de Ester (mg KOH/1g )
M1	44.4	0.8632	3.61
M2	44.4	0.8632	3.61
BK	44.7	0.0000	-

$$IE = 3.61$$

### 1.5 Índice de saponificación

Colocar 1mL de muestra, agregar 25mL de alcohol isopropílico y 25mL de una solución alcohólica KOH 1N. Se somete a reflujo la mezcla por 2 horas .Se enfría y luego se añaden 2

## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

gotas de una solución de fenolftaleína .El exceso de base se titula con una solución de HCL 0.5N. Paralelamente hacer una prueba en blanco.

La normalidad estandarizada de HCL es de 0.4696N.

**TABLA XIX. DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SAPONIFICACION**

Muestra	Volumen de HCL (mL)	Peso de muestra (g)	Índice de Saponificacion (mg KOH/1g)
M1	41.80	0.8632	30.51
M2	41.85	0.8632	28.99
BK	42.80	0.0000	-

$$IS = 29.7$$

### 1.6 Punto de ebullición

Se llena el recipiente con aceite, dentro del recipiente se introduce un tubo con 3 mL de aceite esencial, luego se coloca el termómetro y se observa la variación de la temperatura.

$$T = 165^{\circ}\text{C} - 197^{\circ}\text{C}$$

### 1.7 Punto de congelación

Se llena el recipiente con agua, hielo fundente, de manera de bajar la temperatura, dentro del recipiente se introduce un tubo con 3 mL de aceite esencial a analizar, luego se coloca el termómetro y se observa la variación de la temperatura.

$$T = < -5^{\circ}\text{C}$$

### 1.8 Humedad

Se peso 0.5504g de aceite esencial y se coloco en un crisol tarado que ha sido previamente secado en la estufa y enfriado en el desecador.



## Estudio de Aceites Esenciales en la Especie *Tagetes elliptica Smith* (chinche)

Se calienta la muestra sobre la plancha, rotando suavemente con la mano para evitar salpicaduras debidas a una ebullición rápida del agua. Se enfría a la temperatura ambiente, en desecador, y se pesa.

$$\text{Humedad (\%)} = 24.5$$

Se peso 1g de hoja y tallo, y se seco en un horno al vacío a 100°C a un peso constante (aproximadamente 5 horas)

$$\text{Humedad (\%)} = 17.37$$

### **1.9 Cenizas**

Se peso 1g de aceite esencial y se eliminó al incinerar la muestra a 550°C en un horno eléctrico Se enfría a la temperatura ambiente, en desecador, y se pesa.

$$\text{Cenizas (\%)} = \text{cero}$$

## **2. Características organolépticas**

Aspecto : Liquido, límpido, oleoso

Color : Ligeramente amarillo y transparente

Olor : Fuerte

Sabor : Agradable

## **3. Reacciones características de coloración del aceite esencial de la planta *Tagetes elliptica Smith***

### **3.1 Reactivo de Yodo**

- Colocar 2g de yodo en un vaso de 50mL y colocar dentro el cromatófolio.
- Observamos una coloración marrón, que resulta un compuesto de doble enlace conjugado

### 3.2 Cetonas alifáticas (Reactivo 2,4dinitrodenilhidrazina)

- R: 3g 2,4-DNHF/15mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Agregar 20 mL de H<sub>2</sub>O y 70 mL etanol 95%, filtrar.
- Se coloca 20mg de muestra, agrega 1 mL de etanol al 95% y 2mL de R. Calentar si es necesario.
- Se formo un precipitado amarillo o naranja-rojizo indicando que hay presencia de cetonas alifáticas.

### 3.3 Metil cetonas (Reacción del yodoformo)

- Se coloca 20mg de la muestra de aceite, agregar 2mL de agua.
- Luego se añade 3 gotas de la solución de hidróxido de sodio al 10% y gota a gota una solución yodo-yodurada y unas gotas de la solución de hidróxido de sodio hasta que el color desaparezca.
- Se agrega 10mL de agua y se deja en reposo 15 minutos. Si hay exceso de yodo, se elimina añadiendo unas gotas de solución de hidróxido de sodio.
- Se formo un precipitado de color amarillo indica resultado positivo.

### 3.4. Acetilación

- Acetilacion de la muestra: Disolver 20mg de muestra de aceite esencial en piridina (0.5mL) y agregar acido acético (0.5mL)
- Se coloca en una placa cromatofolia la muestra de aceite esencial y la muestra acetilada.
- Ambas muestra se seca a temperatura ambiente y se le coloca en el eluyente (hexano).
- Si el desplazamiento es mayor en la muestra acetilada entonces hay presencia de esteroides.
- La prueba resulto negativa.

### 3.5 Alcoholes (xantatos)

- Se coloca 20mg de muestra de aceite esencial en una luna de reloj, luego se le agrega 1 lenteja de KOH y 0.5 mL de metanol .Calentar.
- Se deja enfriar la mezcla; luego se adiciona 1mL de etanol y gota a gota el CS<sub>2</sub> hasta la formación de un precipitado de color amarillo. La prueba resulto positiva.

### 3.6 Aldehído aromático, alifático y aminas aromáticas (Tollens)

- Se prepara una solución fresca R: 2 mL AgNO<sub>3</sub> 5% +1 gota NaOH 10% + NH<sub>4</sub> OH 2% hasta aclarar.
- Se coloca 20mg de muestra de aceite esencial en una luna de reloj, luego se le adiciona la solución fresca R. Calentar. Se formo un precipitado negro o espejo de plata.
- La prueba resulto positiva.

### 3.7 Anillos aromáticos (Formaldehído- Acido Sulfúrico)

- Se prepara una solución R: 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (CC) + 10gotas de HCHO al 37%.
- Ms: 1mg de muestra de aceite esencial con 8.5mL CCl<sub>4</sub>.
- Se coloca 2 gotas de Ms, se agrega 1mL de R. Observándose en la solución un anillo de color rojo. La prueba resulto positiva.

## 4. REACCIÓN DE COLORACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA

### *Tagetes elliptica Smith*

#### a. Reactivo de Yodo

Detección de compuestos con doble enlace conjugado

**b. Cetonas alifáticas (Reactivo 2,4dinitrodenilhidrazina)**

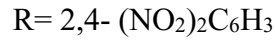
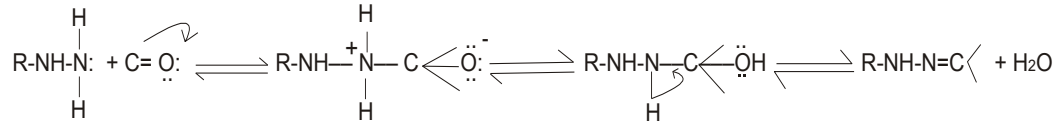


Figura H. Reacción de Cetonas alifáticas

**c. Metil cetonas (Reacción del yodoformo)**<sup>47</sup>

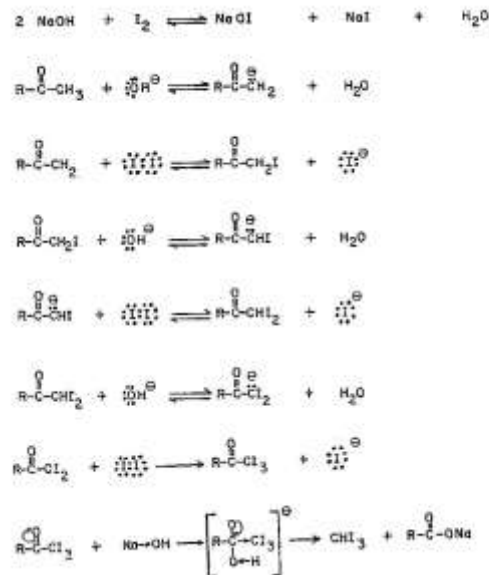


Figura I. Reacción de Metil cetona

**d. Acetilacion**

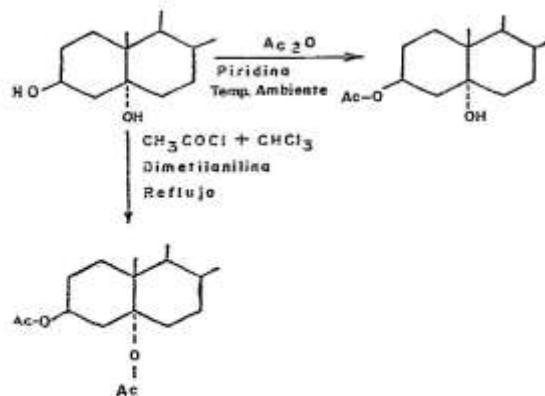


Figura J. Reacción de Acetilación

e. Alcoholes (xantatos)



Figura K. Reacción de Xantatos

f. Aldehído aromático, alifático y aminas aromáticas (Tollens) <sup>47</sup>

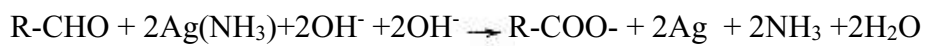


Figura 24. Reacción Aldehídos aromáticos

g. Anillos aromáticos (Formaldehído-Acido Sulfúrico)

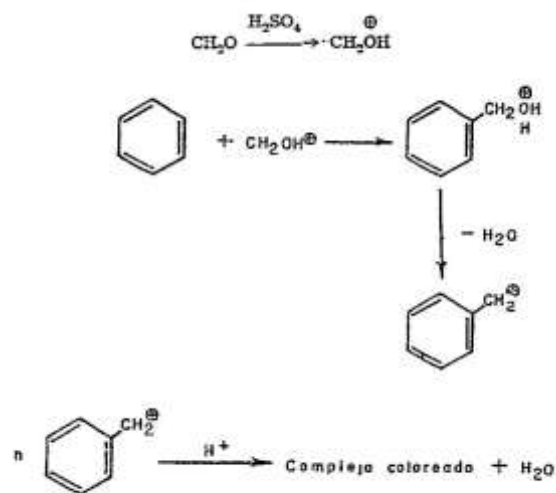


Figura L. Reacción Anillos aromáticos

**ANEXO N° 7**

**RECOLECCION DE LA MUESTRA**

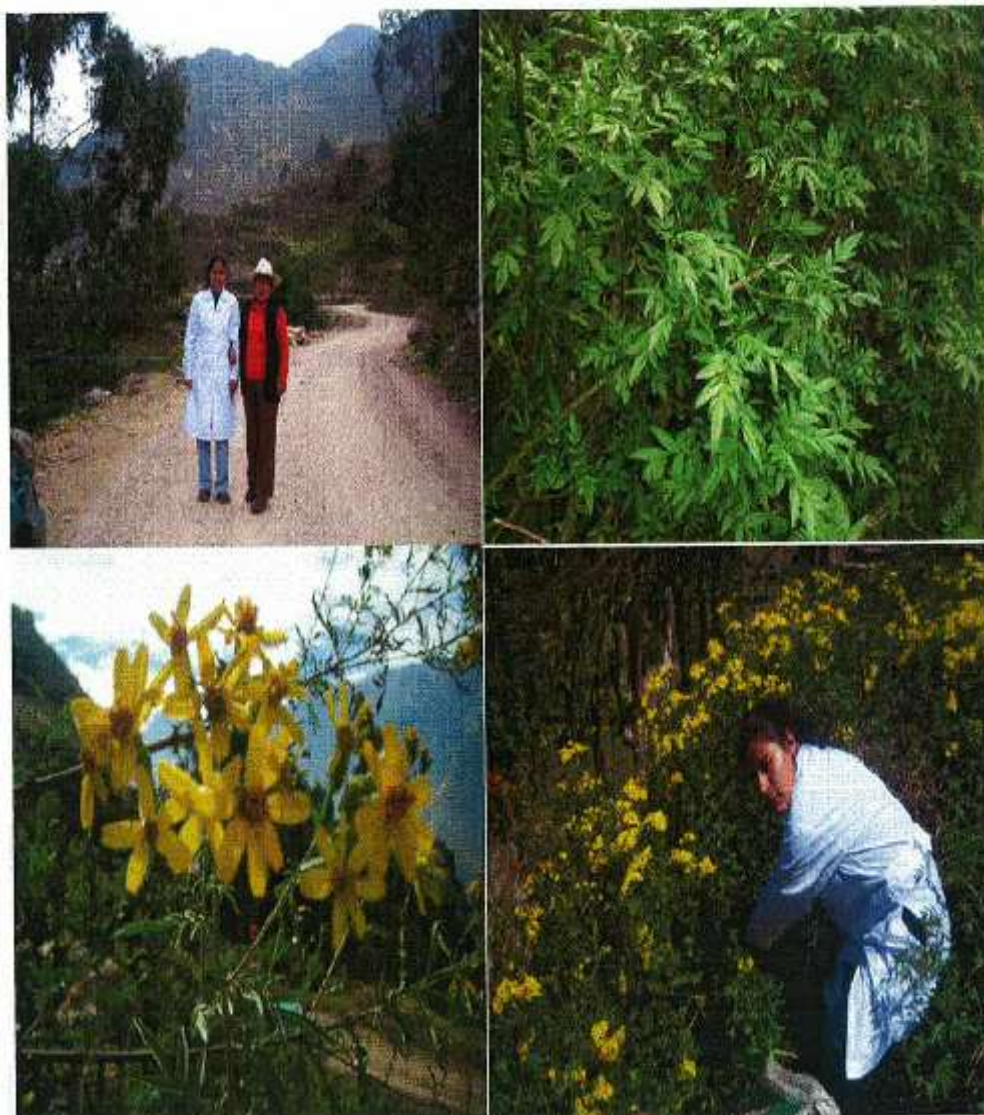




Imagen 1: Recolección de la muestra

**ANEXO N° 8**  
**CONSTANCIA DE IDENTIFICACION BOTANICA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



---

**CONSTANCIA N° 140-USM-2007**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

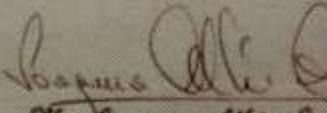
La muestra vegetal (planta completa) recibida de la Srta. ERIKA BEATRIZ LOPEZ AGRILAR, bachiller de Universidad Nacional de Ingeniería- Facultad de Ciencias, ha sido estudiada y clasificada como: *Tagetes elliptica* Smith., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MACROLOPHYTA  
CLASE: MACROLOPSEIDA  
ORDEN: ASTERALES  
FAMILIA: ASTERACEAE  
GENERO: *Tagetes*  
ESPECIE: *Tagetes elliptica* Smith.

Nombre vulgar: "Chinche"  
Determinada por: Mg. Hamilton Beltrán S.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 10 de Julio de 2007.

  
Mg. Jacquelin Albornoz  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS



---

Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú  
Teléfono: (511) 471-8117, 470-4471,  
470-791X, 619-7000 anexo 5703  
Fax: (511) 265-6819  
e-mail: [museohn@unmsm.edu.pe](mailto:museohn@unmsm.edu.pe)  
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

**ANEXO N° 9**

**SEPARACION DEL ACEITE ESENCIAL EN EL VASO FRORENTINO**



Imagen 3. Equipo de destilación de arrastre de vapor

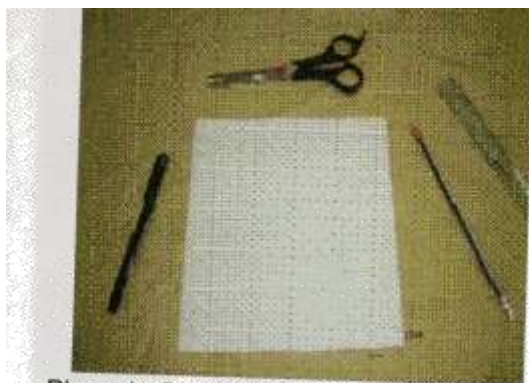


Imagen 4. Separación del aceite esencial en el vaso florentino



ANEXO N° 10

CROMATOLOGIA DE CAPA FINA



Placa de Cromatófolio



Placa de Cromatófolio colocado la muestra



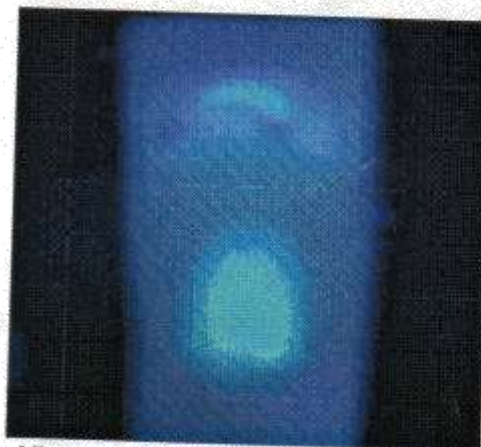
Placa de Cromatófolio con el eluyente



Líquido asciende por el capilar



Reveladas las placas



Visto con la lámpara ultravioleta

ANEXO N° 11

CROMATOLOGIA DE COLUMNA



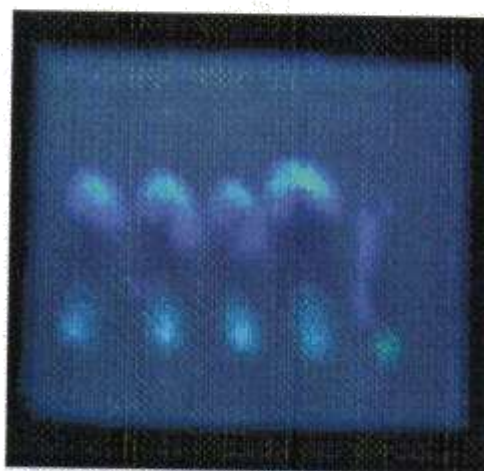
Columna con alumina-Hexano



columna con alumina-Hexano-Aceite



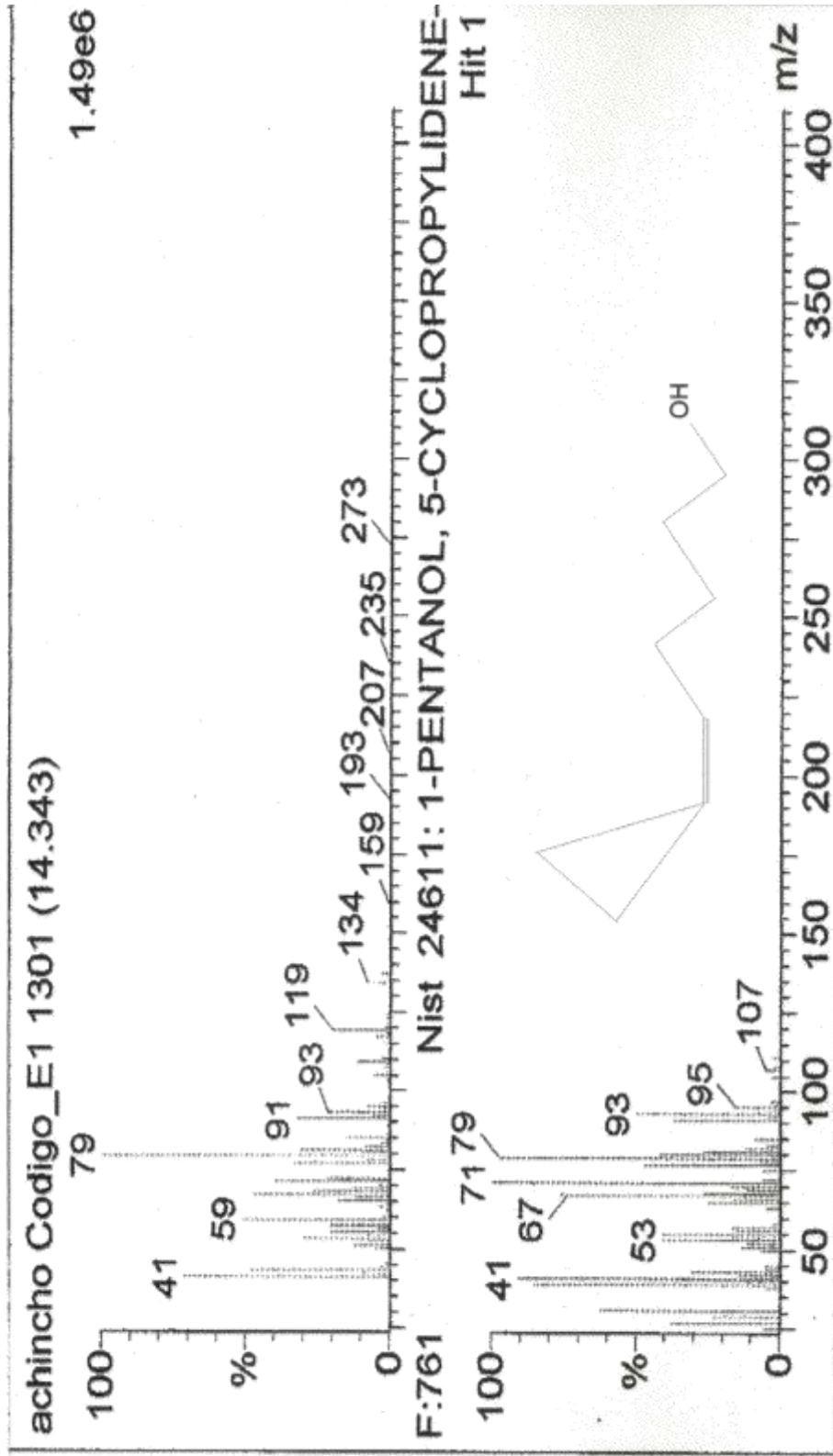
Fracción N° "X"



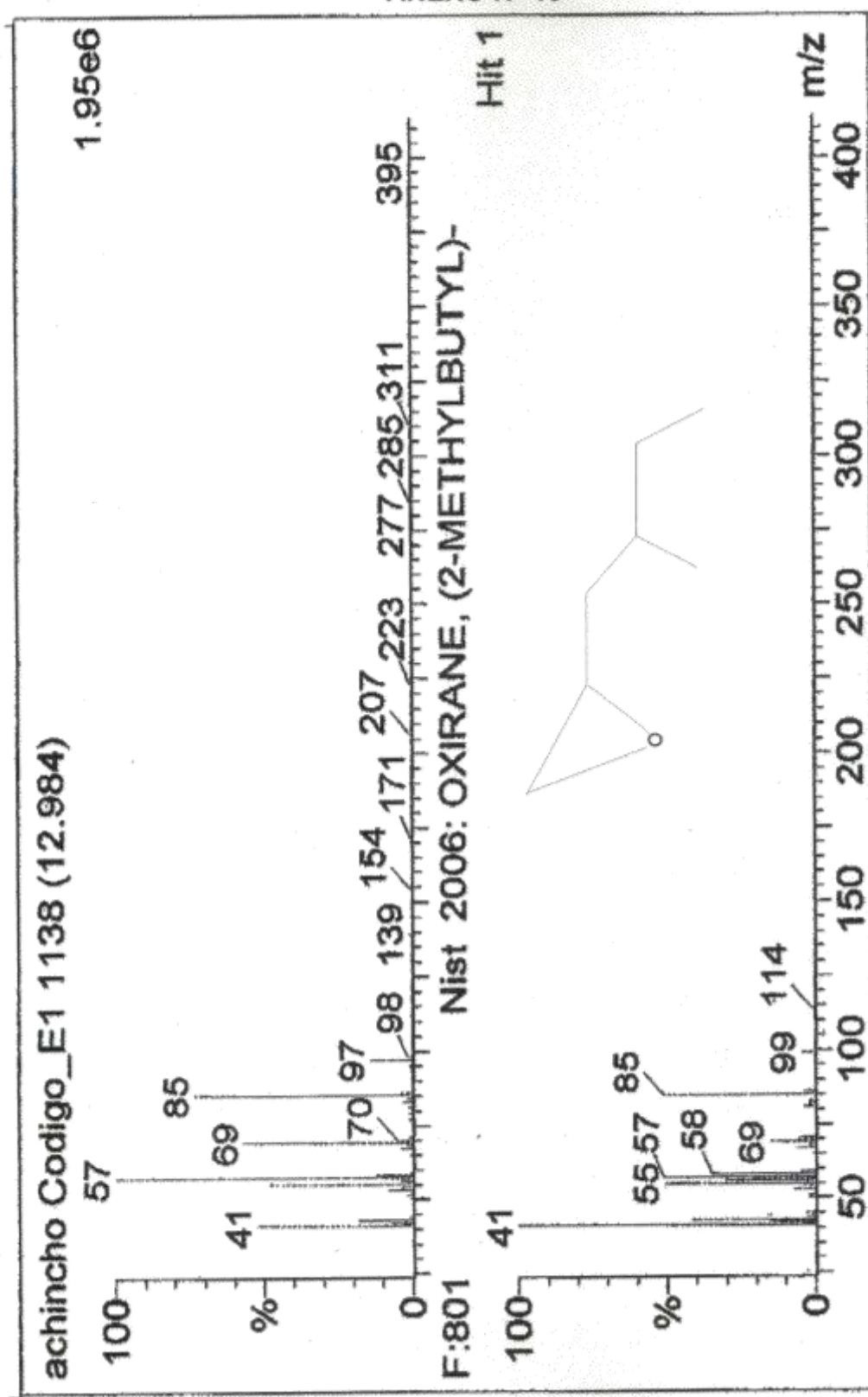
Visto con la lámpara ultravioleta

ANEXO N° 12

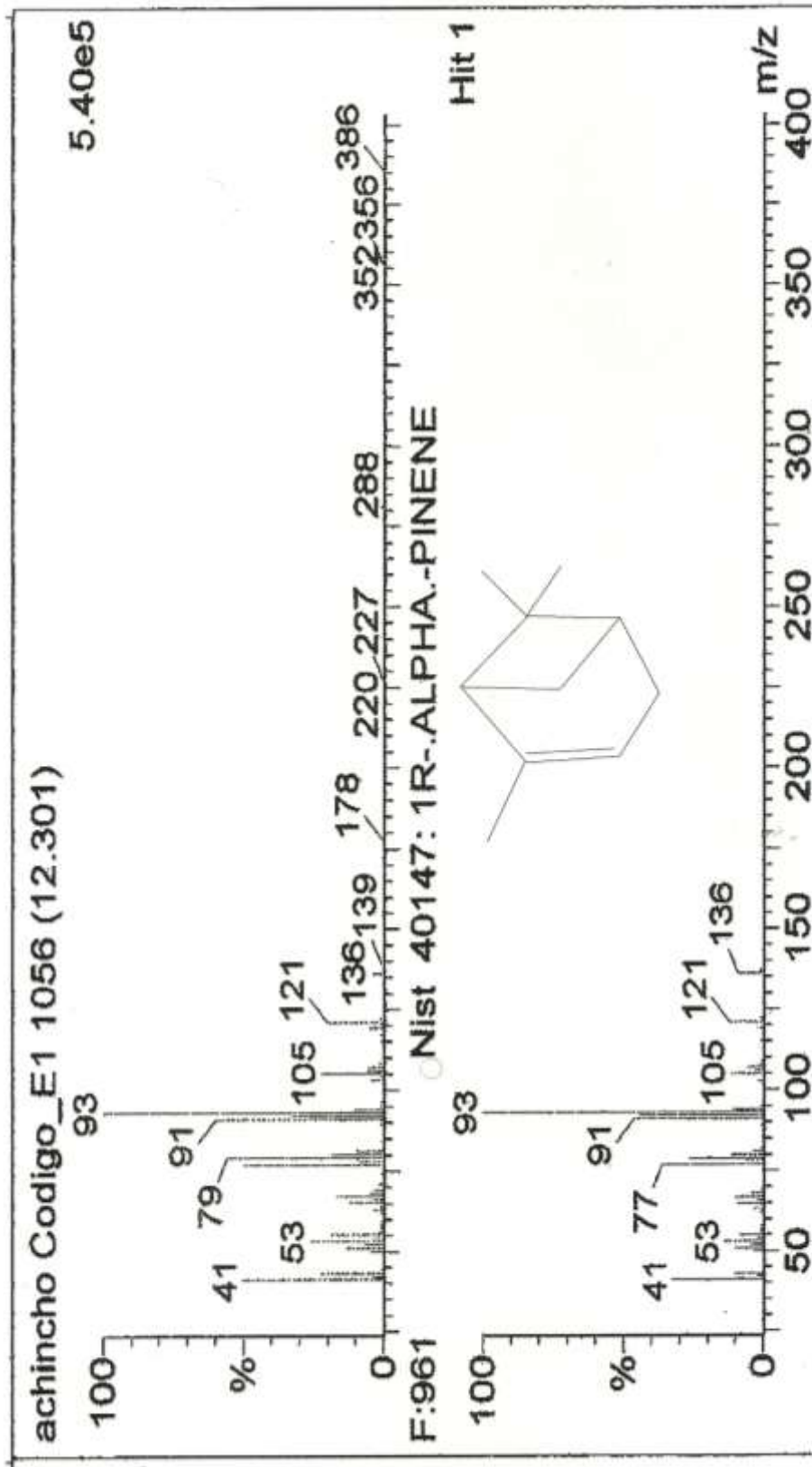
ESPECTRO 4. MS DE 1 - PENTANOL, 5-CYCLOPROPYLIDENE



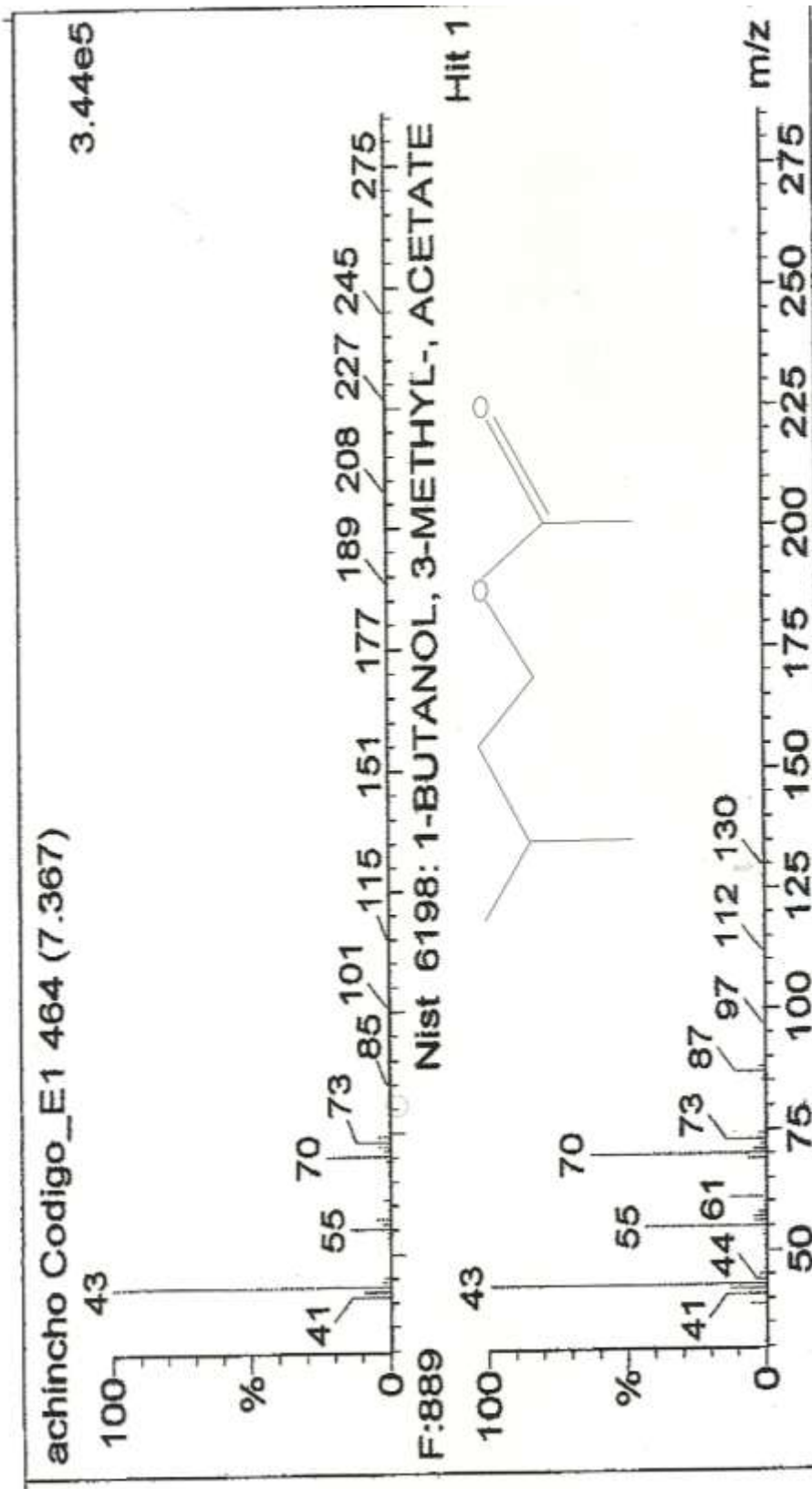
Espectro 4. MS de 1-PENTANOL., 5-CYCLOPROPYLIDENE



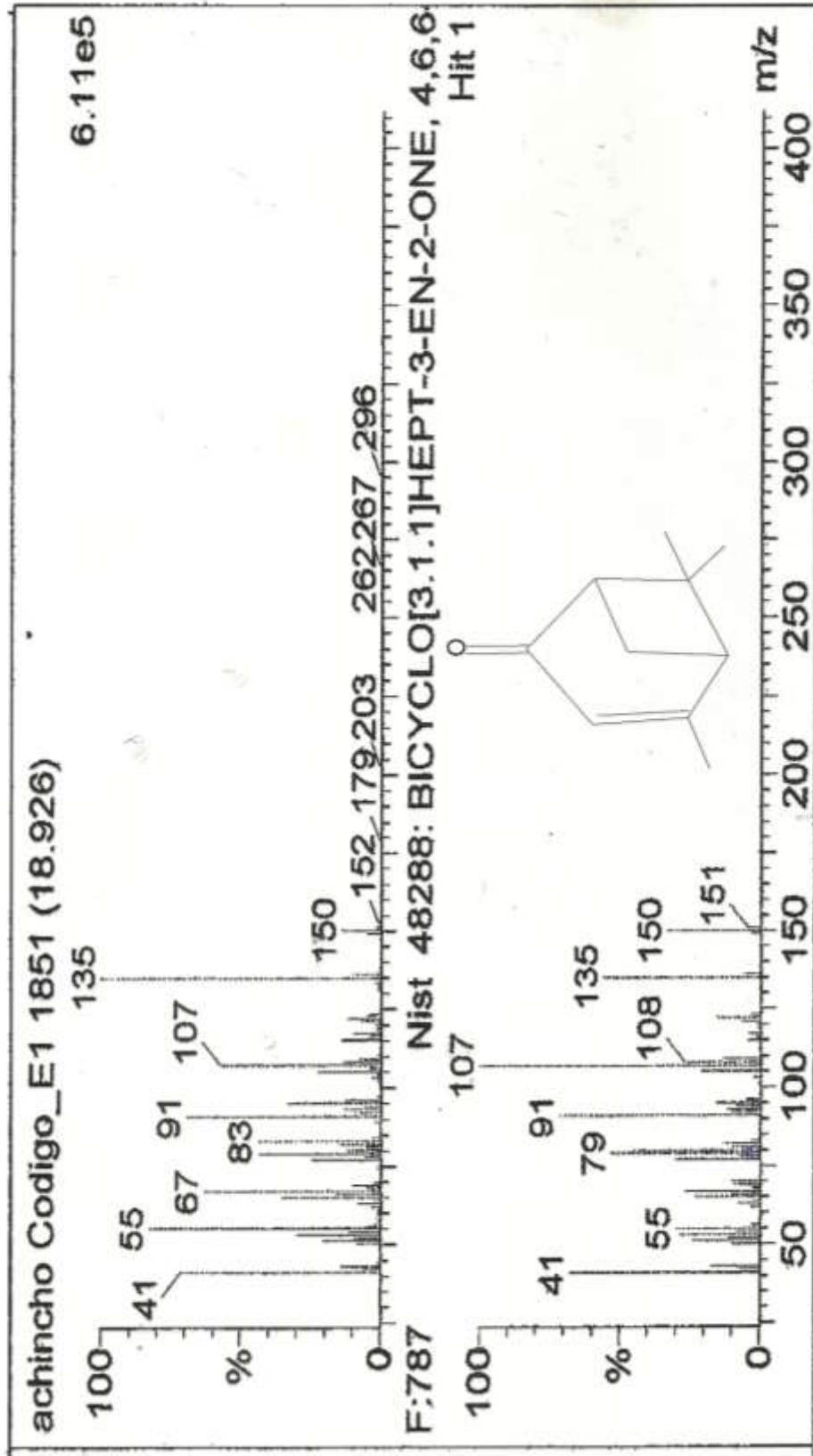
Espectro 5. MS de OXIRANE, (-2-METHYLBUTYL)-



Espectro 6. MS de 1R-,ALPHA.-PINENE



Espectro 8. MS de 1-BUTANOL,3-METHYL-,ACETATE



Espectro 9. MS de BICYCLO [3.1.1]HEPT-3-EN,4,6,6-TRIMETHYL