

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO – BIOQUÍMICAS
(I.I.F.B.)



**ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE
METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LAS
ESPECIES VEGETALES**
Bertholletia excelsa (Nuez de Brasil) Y *Galipea longiflora* (Evanta)

“Tesina de grado para optar al grado de licenciatura en bioquímica”

ELABORADO POR:

Ivan Limachi Valdez

La Paz – Bolivia
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO – BIOQUIMICAS
(I.I.F.B.)



**ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES DE
METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LAS
ESPECIES VEGETALES**
Bertholletia excelsa (Nuez de Brasil) Y *Galipea longiflora* (Evanta)

“Tesina de grado para optar al grado de licenciatura en bioquímica”

ELABORADO POR:

Ivan Limachi Valdez

ASESOR:

Alberto Giménez Turba Ph.D.

La Paz – Bolivia
2009

Dedicado: “A Dios por su amor, a mi madre Julieta y mi hermano David por el esfuerzo dedicado durante mi formación”

RESUMEN

La cromatografía de gases (CG) presenta alto grado de resolución y sensibilidad, por lo que es una buena herramienta para el análisis de aceites y metabolitos secundarios de origen vegetal. Se analizó el aceite proveniente de la Nuez de Brasil (*Betholetia excelsa*), principalmente para identificar los ácidos grasos que la componen y tomar a esta técnica como punto para el control de calidad de este aceite. Para esto se realizó la transesterificación ácida – básica del aceite, los metilesteres de ácidos grasos obtenidos fueron analizados por CG. Los análisis realizados muestran que hay un porcentaje de 23.18% de ácidos grasos saturados y 76.82% de ácidos grasos insaturados, siendo el ácido linoleico el mayoritario con 44.11% y el ácido oleico con 32.71%, también se encontró 13.49% de ácido palmítico y 9.69% de ácido esteárico.

Se analizó una muestra contaminada con fluorescencia naranja para comprobar su calidad, mostrando una disminución en el porcentaje de ácidos grasos insaturados y la aparición de nuevos componentes producto de la oxidación, que disminuyen la calidad del aceite.

Se realizó una comparación entre el aceite esencial de Evanta y los alcaloides totales de hojas de Evanta (HAT). El aceite esencial de Evanta fue obtenido por arrastre de vapor de hojas recolectadas de la región de San José en el Norte de La Paz en el mes de Junio del 2009 obteniendo un rendimiento de 0.36% de aceite esencial, el HAT fue obtenido por maceración con solventes orgánicos obteniendo 0.57% de rendimiento en relación al peso. El análisis de la actividad antiparasitaria del aceite esencial frente a promastigotes de *Leishmania* muestra una $IC_{50}=16.0\pm 2.3$ para *L.braziliensis* y 35.5 ± 3.1 para *L. amazonensis* y el HAT muestra una $IC_{50}=6.8\pm 1.83$ para *L.braziliensis* y 11.5 ± 3.1 para *L. amazonensis*. En los análisis por cromatografía de gases se identificaron 7 alcaloides quinolinicos en el aceite esencial y HAT: 2n-propil-quinolina; 2n-propenil-quinolina; Chimanina D; 2n-pentil-Quinolina; 2-(1,2trans-epoxipropil)-4MeO-Quinolina; 2-fenil-Quinolina; 2-fenil-4MeO-Quinolina. Mostrando una distribución diferente.

Se analizaron las fracciones FQ2 y FQ3 de CAT de Evanta por CG de 4 regiones diferentes, Santa Rosa (SR), Vencedores (VE), Covendo (CO), Yavanico (YA) y se las comparó con los estudios realizados en la Universidad de La Laguna, Islas Canarias, España. Se identificaron 12 alcaloides: 2n-propil-quinolina; 2n-pentil-Quinolina; 2n-propenil-quinolina; Chimanina D; 2n-pentil-Quinolina; 2-(1,2trans-epoxipropil)-4MeO-Quinolina; 2-fenil-Quinolina; 2-fenil-4MeO-Quinolina; Shiquimianina; metilen-dioxi-Quinolina; dimetoxi-Quinolina; Cusparina; 2n-nonil-Quinolina, mostrando ligeras variaciones en el porcentaje de alcaloides.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
PRIMERA PARTE: Aceite de Nuez de Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>)	4
ANTECEDENTES	5
<i>Bertholletia excelsa</i>	5
BOTANICA	6
TRANSESTERIFICACION DE ACIDOS GRASOS.....	8
Procesos catalizados por ácidos.....	9
Procesos catalizados por bases	9
ANALISIS DE ACEITES POR CROMATOGRAFIA DE GASES	10
DISEÑO EXPERIMENTAL	11
ANALISIS DEL ACEITE DE CASTAÑA.....	11
Obtención del aceite crudo	11
Resonancia magnética nuclear del aceite de castaña	12
Obtención de los metil ester de ácidos grasos del aceite de castaña (FAME)	12
Análisis de los metil ester de ácidos grasos del aceite de castaña por cromatografía de gases	12
RESULTADOS Y DISCUSIONES	13
Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	13
Obtención de los metil ester de ácidos grasos (FAMEs) del aceite de Nuez de Brasil	13
Análisis de los FAMEs del aceite de Nuez de Brasil Por Cromatografía de gases (CG).....	14
SEGUNDA PARTE: Aceites esenciales de Evanta (<i>Galipea longiflora</i>)	20
ANTECEDENTES	21
<i>Galipea longiflora</i>	21
BOTÁNICA	22
Clasificación taxonómica	22
ALCALOIDES	22
ENFERMEDADES PARASITARIAS	24
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFIA DE GASES	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	26
ANALISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE EVANTA	26
Obtención del aceite esencial de Evanta.....	26
Determinación del índice de refracción del aceite esencial de Evanta.....	26
Determinación de la actividad Leishmanicida del aceite esencial y los alcaloides totales de hojas (HAT).....	26
Análisis de los alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta	

por cromatografía de gases (CG)	27
Fraccionamiento del HAT por diferenciales de pH, para la obtención de HQ2	27
Análisis del aceite esencial de Evanta por cromatografía de gases	28
ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES FQ2 Y FQ3 DE EVANTA.....	28
Análisis de las Fracciones FQ2 y FQ3 por cromatografía de gases	28
RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
Obtención del aceite esencial de Evanta (<i>Galipea longiflora</i>).....	29
Determinación de la actividad Leishmanicida del aceite esencial y los alcaloides totales de hojas (HAT).....	30
Análisis de los alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta por CG.....	31
Análisis del aceite esencial de Evanta por CG.....	33
Comparación de los resultados de los análisis por cromatografía de gases (CG) realizadas en España con las realizadas en el IIFB de las fracciones FQ2.....	35
Comparación de los resultados de los análisis por cromatografía de gases (CG) realizadas en España con las realizadas en el IIFB de las fracciones FQ3	42
CONCLUSIONES.....	50

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Tiempos de retención y áreas de los ácidos grasos encontrados en los metil-esteres de ácidos grasos (FAME's) del aceite de Nuez de Brasil control (CC) por cromatografía de gases.....	15
Tabla 2. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en aceites vegetales.....	16
Tabla 3. Tiempos de retención y áreas de los metil esterres de ácidos grasos presentes en la muestra CF analizados por CG.....	18
Tabla 4. Rendimientos y actividad leishmanicida <i>in vitro</i> de alcaloides quinolónicos aislados de la corteza del tronco, hojas y corteza de raíz de <i>Galipea longiflora</i>	23
Tabla 5. Incidencia y mortalidad anual de las principales enfermedades parasitarias.....	24
Tabla 6. Peso de las fracciones FQ2 y FQ3 de 4 regiones del norte de La Paz....	29
Tabla 7. Peso de las hojas secas molidas por canasta del destilador por arrastre de vapor.....	29
Tabla 8. Rendimiento de la extracción de aceites esenciales de Evanta.....	29
Tabla 9. Rendimiento en la obtención de aceites esenciales y HAT a partir de hojas de <i>Galipea Longiflora</i>	30
Tabla 10. Índices de refracción de los aceites esenciales de Evanta.....	30
Tabla 11. Valores del IC50 en ug/mL sobre promastigotes de leishmania de aceites esenciales y HAT de Evanta evaluados por el método colorimétrico (XTT).....	31
Tabla 12. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides presentes en el HAT de Evanta obtenido por CG en la Universidad La Laguna, España.....	31
Tabla 13. Tiempos de retención y áreas de los componentes encontrados en el aceite esencial de evanta por CG.....	33
Tabla 14. Perfil de los alcaloides, tiempos de retención y áreas encontrados en el aceite esencial evanta por CG.....	34
Tabla 15. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 SR por CG.....	36
Tabla 16. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 VE por CG.....	37
Tabla 17. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 CO por CG.....	39
Tabla 18. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 YA por CG.....	41
Tabla 19. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 SR por CG.....	43
Tabla 20. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 VE por CG.....	44
Tabla 21. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 CO por CG.....	46
Tabla 22. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 YA por CG.....	47

. INDICE DE GRAFICAS

	Pag.
Gráfica 1. Espectro de RMN ¹ H del aceite de Nuez de Brasil.....	13
Grafica 2. Espectro GC-MS de los FAME's del aceite de Nuez de Brasil obtenido en Lund University.....	14
Grafica 3. Distribución de los componentes presentes en la muestra CC analizados por CG.....	15
Grafica 4. Distribución de los metil esterés de ácidos grasos presentes en la muestra CC analizados por CG.....	16
Grafica 5. Distribución de los componentes presentes en la muestra CF analizados por CG.....	18
Grafica 6. Distribución de los metil esterés de ácidos grasos presentes en la muestra CF analizados por CG.....	19
Grafica 7. Comparación de la distribución de los alcaloides totales de hojas (HAT) analizados por CG en la universidad La Laguna, España con los resultados obtenidos en el IIFB.....	32
Grafica 8. Perfil de alcaloides presentes en el HQ2 de Evanta analizados por CG.....	33
Grafica 9. Perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta por CG.....	34
Grafica 10. Comparación de los alcaloides presentes en el HQ2 y el aceite esencial de Evanta por CG.....	35
Grafica 11. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 SR analizados por CG.....	36
Grafica 12. Comparación de los resultados de FQ2 SR analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	37
Grafica 13. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 VE analizados por CG.....	38
Grafica 14. Comparación de los resultados de FQ2 VE analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	39
Grafica 15. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 CO analizados por CG.....	40
Grafica 16. Comparación de los resultados de FQ2 CO analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	40
Grafica 17. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 YA analizados por CG.....	41
Grafica 18. Comparación de los resultados de FQ2 YA analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	42
Grafica 19. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 SR analizados por CG.....	43
Grafica 20. Comparación de los resultados de FQ3 SR analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	44
Grafica 21. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 VE analizados por CG.....	45
Grafica 22. Comparación de los resultados de FQ3 VE analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	45

Grafica 23. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 CO analizados por CG.....	46
Grafica 24. Comparación de los resultados de FQ3 CO analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	47
Grafica 25. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 YA analizados por CG.....	48
Grafica 26. Comparación de los resultados de FQ3 YA analizados en España con los obtenidos en el IIFB.....	48

ABREVIATURAS

CG:	Cromatografía de gases
CG-MS:	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas
CH ₂ Cl ₂ :	Diclorometano
CH ₃ ONa:	Metanoato de sodio
CL:	Colesterol total
CAT:	Alcaloides Totales de Corteza
FAME:	Metil esterres de acidos grasos
FID:	Detector de ionizacion a llama
FTIR:	Espectroscopia infrarroja por transformaciones de Fourier
HAT:	Alcaloides Totales de Hojas
HPLC:	Cromatografía liquida de alta resolución
IC50:	Concentración que inhibe el 50% de desarrollo
KOH:	Hidroxido de Potasio
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
MeOH:	Metanol
m.s.n.m.:	Metros sobre el nivel del mar
NaOH:	Hidroxido de Sodio
OMG:	Organización mundial de la salud
ppm:	Partes por millon
RMN:	Resonancia magnética nuclear
TG:	Triglicéridos
TDR:	programa de enfermedades tropicales

INTRODUCCION

La cromatografía de gases tiene múltiples aplicaciones, una de ellas es el análisis de aceites de origen vegetal. Muchas investigaciones han empleado a la cromatografía de gases como método de análisis aprovechando la naturaleza volátil de la gran mayoría de los aceites. El alto grado de resolución y sensibilidad alcanzado mediante el uso de columnas capilares ha permitido la detección de estos compuestos aun en bajas concentraciones, lo que representa una importante ventaja sobre las técnicas tradicionales.

La Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), es originaria de la selva húmeda tropical de la amazonía que abarca los países Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú, Guayana y Brasil. En la región norte de Bolivia, constituye uno de los productos forestales no maderables (PFNM) más importantes. *Bertholletia excelsa* es conocida con el nombre común de **nuez de Brasil**, es producida en la región amazónica y tiene un gran mercado en Europa y Norte America¹.

El aceite de Nuez de Brasil es de gran valor nutricional. Por tanto, el análisis de los ácidos grasos presentes en su aceite es de gran interés para la industria por las aplicaciones tecnológicas, nutricionales y regimenes de calidad que derivan de su composición. La forma más extendida de cálculo de la composición de ácidos grasos es la de los porcentajes normalizados. Sin embargo, cada vez es más importante el cálculo de las concentraciones de ácidos grasos, lo que requiere la validación de métodos de modo más complejo, para poder ser utilizado como referencia de la calidad para la verificación de autenticidad o falsificado del aceite.

Por otra parte, siguiendo la línea de investigación del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, cuyos estudios de plantas con actividad biológica frente a enfermedades parasitarias, nos llevan a buscar alternativas eficaces y económicamente sustentables frente a estos problemas. Estudiamos los beneficios del aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*) como antiparasitario, comparándolo con el perfil de alcaloides obtenidos de las hojas de la misma planta.

¹ Augstburger F. Berger J. 1ra ed. Alemania: Asociación Naturland; 2000.

Es así, que se investigan los beneficios de la *Galipea longiflora* como antiparasitario, en Bolivia la especie *Galipea longiflora* (Krause) se distribuye en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos del departamento de Beni y La Paz. En Bolivia en la Etnia Tacana *Galipea longiflora* es conocida como *Evanta o Yuruma huana epuna*, su corteza es empleada para el tratamiento de la leishmaniasis, y afecciones intestinales causadas por parásitos, como amebas, también se la utiliza como fortificante muscular para fortalecer el cuerpo de una persona mayor².

Tres especies, *G. longiflora*, *G. officinalis* y *G. bracteata* fueron estudiadas químicamente y caracterizadas por su alto contenido de alcaloides quinolínicos de corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de *Galipea longiflora* de donde se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alquil quinolínicos, identificándose 13 componentes activos².

El presente trabajo pretende determinar los porcentajes de ácidos grasos presentes en el aceite de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) por cromatografía de gases. Además, comparar los perfiles de alcaloides presentes en los aceites esenciales y extractos ricos en alcaloides quinolínicos (CAT, FQ2, FQ3) de corteza y hojas de Evanta (*Galipea longiflora*) con los obtenidos en otras investigaciones.

² Bourdy, Gimenez A, Quenevo C. TACANA: Ecuánasha aquí, Ecuánasha id'rene cuana, me schanapaque (TACANA: conozca nuestros árboles, nuestras plantas). Bolivia: UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA-EIA; 1999.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Utilizar la cromatografía de gases como método para el análisis del aceite de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), aceites esenciales de hojas y alcaloides de corteza de Evanta (*Galipea longiflora*).

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar el perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) por cromatografía de gases.
- Determinar si la cromatografía de gases es un buen método para el análisis de aceite de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*).
- Determinar el perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*) por cromatografía de gases.
- Comparar el perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*) con perfil de alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta (*Galipea longiflora*).
- Validar el uso de la cromatografía de gases, utilizando fracciones ricas en alcaloides quinolínicos (CAT, FQ2 y FQ3) obtenidas en el IIFB a partir de extractos de Evanta (*Galipea longiflora*).

PRIMERA PARTE

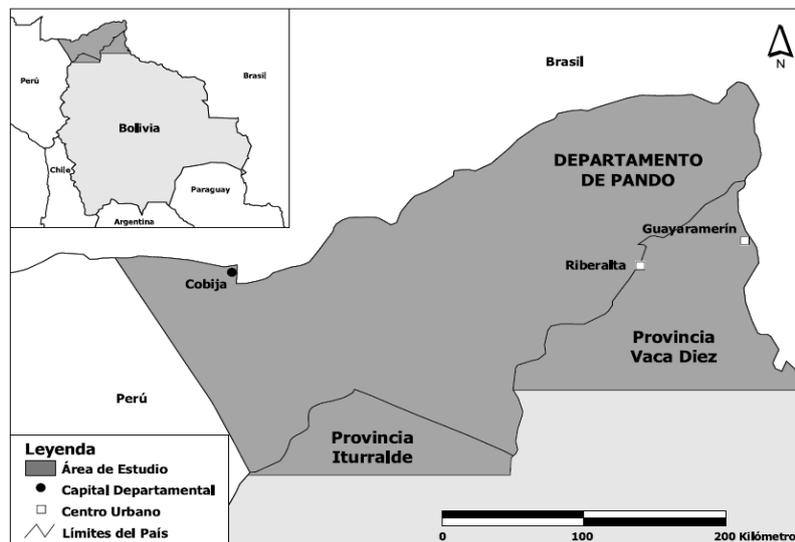
Aceite de Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*)

ANTECEDENTES

Bertholletia excelsa

La castaña *Bertholletia excelsa*, es originaria de la selva húmeda tropical de la amazonía que abarca los países Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú, Guayana y Brasil¹. En la región norte de Bolivia, constituye uno de los productos forestales no maderables (PFNM) más importantes³, como se puede observar en la figura 1. Antes, la producción más grande provenía de Brasil y las exportaciones se realizaban también desde este país. De ahí viene el nombre nuez del Pará [del estado brasileño Pará] o nuez del Brasil. El nombre comercial internacional es "Brazil Nut"¹

Figura 1. Región productora de castaña boliviana



Fuente: ESRI Data and Maps 2002.

Bertholletia excelsa mejor conocida con el nombre común de nuez de Brasil, es producida en la región amazónica y tiene un gran mercado en Europa y Norte América³. Hoy en día, gran parte de la producción de castaña proviene de las regiones selváticas amazónicas de Bolivia y Perú².

³ Dietmar S. [monografía en Internet]*2000 [acceso 15 de julio de 2009]. Disponible en: www.redmunicipalverde.org/cosechando%20lo%20que%20cae%20CASTANA.pdf

Debido a su larga fase de desarrollo (10 -15 años hasta su primer rendimiento) y a la biología de polinización (necesariamente polinización cruzada) y florescencia, la castaña amazónica muy rara vez se planta en cultivos. Su reproducción natural se efectúa con ayuda de diversos roedores que rompiendo la cáscara dura de la fruta "liberan" las semillas, dando lugar así al nacimiento de una nueva planta. Su crecimiento con éxito, sin embargo, se dará sólo si se realiza en espacios abiertos. Por esta razón prácticamente no se encuentran castaños jóvenes en los bosques cerrados de la Amazonía¹.

BOTANICA

El árbol de la castaña pertenece a la familia de las *Lecitidáceas*, alcanza hasta 40mts de altura y mas de 2 mts de diámetro de tronco, en su hábitat natural se asocia generalmente con goma (*Hevea brasiliensis*) así como con una diversidad de otras especies del estrato alto, medio y bajo de los bosques amazónicos⁴.

El fruto del árbol está formado por una cáscara de unos 16cm de diámetro, La temporada de florescencia es de Octubre a Diciembre, el fruto capsular que puede pesar hasta 1,5 kg necesita de 12 – 15 meses para su maduración. La que al madurar libera de 20 a 24 semillas en forma arriñonada de 3 a 4 cm con una cáscara gruesa y leñosa llamada “coco”⁵ Figura 2.



Figura 2. Brazil nut o castaña de para.

Es un fruto conocido por su contenido en proteínas (15-17%) en peso en fresco y alrededor del 50% en peso de su harina desgrasada, los frutos secos son también una buena fuente de aceite (63-70%)³. La castaña se comercializa pelada o con su cáscara (secas), en los

⁴ Pamplona J. El Poder de los alimentos. 1ª ed. Barcelona: Editorial ACES; 2003.

⁵ Chunhieng T, Hafidi A, Pioch D, Brochier J y Montet M. Braz Chem Soc. 2008; 19 (7): 52 – 53.

mercados locales se consumen frescas. La castaña también posee un elevado valor nutricional (rica en proteínas, grasas, vitaminas y selenio), siendo por consiguiente, una fuente importante de alimento⁵. Por éstas razones, es considerada como una prioridad especial para el desarrollo sustentable de la región amazónica de Cobija del departamento de Pando⁶.

Las almendras contienen aproximadamente 56-66% de grasa, 15% de proteínas y 9% de hidratos de carbono. Las almendras que no cumplen con los requisitos de calidad para su exportación, son materia prima para la obtención del aceite de almendras, la cual se transforma en jabón y la cáscara se utiliza, como leña, para calentar los hornos de secado³.

El aceite de castaña colectada en zonas del Brasil, se encuentra en concentraciones que varían de 65,5 a 69,3% y contiene concentraciones apreciables de los ácidos palmítico (12-15%), esteárico (8,7 – 10,4%), oleico (27,2 - 40%) y linoleico (34 – 49%)⁵.

Estudios recientes han reportado que el aceite de nuez de Brasil tiene un buen contenido de ácidos grasos insaturados 75,6% que es comparable con el aceite de oliva 83%, además de un alto contenido de ácido linoleico 39,3% y linolénico 36,1 % que serían los principales indicadores para la discriminación del aceite en cuanto a calidad^{5,6}.

Estudios han precisado que los isómeros posicionales del ácido linoleico *cis-9*, *trans-11* están relacionados con actividad anticarcinogénica⁷. Otros estudios realizados en animales, han demostrado que la adición de ácido linoleico en la dieta, ocasiona modificaciones corporales y disminución de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol total (CL) y triglicéridos (TG)⁸.

⁶ Sotero V, Gioielli LA, Polakiewicz B. Rev. Grasas y aceites 2000; 51:405-411.

⁷ Plourde M, Destailats F, Chouinard PY, Angers P. American Dairy Science Association. 2007; 90:5269 – 5275

⁸ Rodríguez A, Pacheco M, Robles S. [revista en Internet] 2006 Diciembre [acceso 17 de julio de 2009]; 1 (142). Disponible en: <http://www2.uacj.mx/publicaciones/Avances/2006/Avances%20142%20Alejandra%20Rodr%C3%ADguez.pdf>.

TRANSESTERIFICACION DE ACIDOS GRASOS

La trans-esterificación es en general un término que describe a un grupo importante de reacciones orgánicas en la que un ester es transformado en otro por medio del intercambio de un grupo alcoxi⁹. Figura 3.

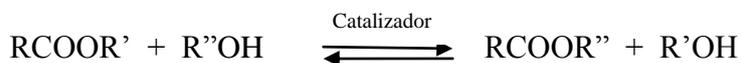


Figura 3. Reacción general de la trans-esterificación

En la transesterificación de aceites vegetales, un triglicérido reacciona con un alcohol en presencia de un ácido o base fuerte, produciendo una mezcla de alquil ésteres de ácidos grasos y glicerol. El proceso general es una secuencia de tres reacciones consecutivas y reversibles, en la que di y mono glicéridos se forman como intermediarios. En la transesterificación de aceites vegetales la reacción requiere 1 mol de triglicéridos y 3 moles del alcohol Figura 4. Sin embargo, un exceso de alcohol se utiliza para aumentar los rendimientos de los ésteres alquílicos y permitir su separación del glicerol formado. Varios factores, como el tipo de catalizador (alcalinos o ácidos), la proporción molar alcohol, tipo de aceite vegetal, la temperatura, pureza de los reactivos (principalmente el contenido de agua)¹⁰ son importantes para la optimización de resultados.

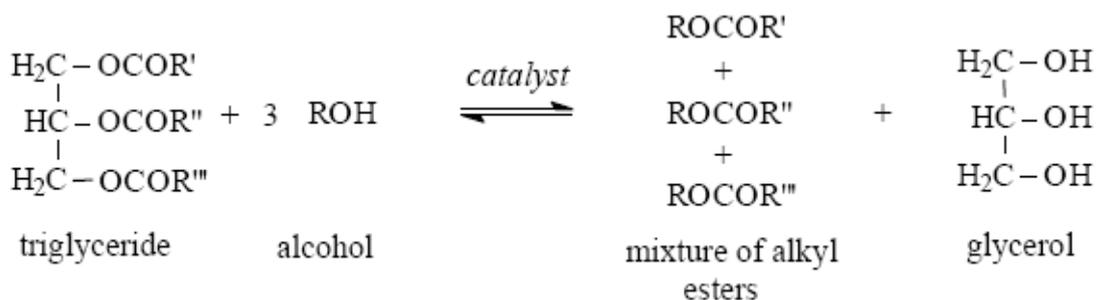


Figura 4. Transesterificación de aceites vegetales

⁹ Schuchardt U, Serchelia R, Vargas RM. Braz. Chem. Soc. 1998; 9(1): 199-210.

¹⁰ Yanevich D., Brachna C., Sánchez D., Okulik C. J. Am. Oil Chem. Soc. 1984, 61, 1638.

Procesos catalizados por ácidos.

Estos catalizadores dan un rendimiento muy alto en alquilo ésteres, pero las reacciones son lentas, que requieren, típicamente, las temperaturas por encima de 100 ° C y más de 3 horas para llegar a completar conversión.

El proporción molar del alcohol / aceite vegetal es uno de los principales factores que influye en la transesterificación. Un exceso del alcohol favorece la formación de los productos. Por otra parte, una cantidad excesiva de alcohol hace que la recuperación de la glicerina sea difícil, por lo que la relación alcohol/aceite ideal tiene que ser establecida empíricamente, teniendo en cuenta cada proceso individual⁹.

Procesos catalizados por bases.

La base de transesterificación catalizada de aceites vegetales el producto más rápido que la reacción catalizada por ácidos. Los alcóxidos de metales alcalinos (como metanoato de Sodio CH_3ONa para la metanólisis) son los catalizadores más activos, ya que dan rendimientos muy elevados (> 98%) en los tiempos de reacción corto (30 min) incluso si se aplican a bajas concentraciones molares (0,5 mol). Sin embargo, requiere la ausencia de agua que los hace inadecuados para procesos en la industria típica.

Los hidróxidos de metal alcalino (KOH y NaOH) son más baratos que los alcóxidos de metal, pero menos activos. No obstante, son una buena alternativa, ya que puede dar la misma alta conversión de los aceites vegetales solo con el aumento del catalizador a concentración de 1 o 2 mol. Sin embargo, la presencia de agua da lugar a la hidrólisis de algunos de los ésteres producidos, con la siguiente formación de jabón. Esta reacción de saponificación indeseable reduce los rendimientos de éster y dificulta considerablemente la recuperación de glicerina, debido a la formación de emulsiones¹⁰.

El carbonato de potasio, utilizado en una concentración de 2 o 3 mol da una alta producción de alquilo ésteres de ácidos grasos y reduce la formación de jabón. Esto puede ser explicado por la formación de bicarbonato en lugar de agua, que no se hidroliza los ésteres¹¹.

¹¹ Schuchardt U., Vargas R. y Gelbard G. J. *Rev. Fr. Corps Gras.* **1992**, 39, 91

ANÁLISIS DE ACEITES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía de gases (CG) se utiliza para separar compuestos orgánicos volátiles. El uso de CG para el análisis directo de aceites intactos, no es posible, debido a su carácter no volátil. Por lo tanto, la mayoría de los métodos se basan en la hidrólisis de los triacilglicéridos, seguido por la transesterificación, con la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) que posteriormente son analizados por CG¹².

La cromatografía de gases (CG) utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil gaseosa. El hidrógeno es preferido como gas portador por que tiene una menor temperatura de elución, que permite tener tiempos mas cortos de análisis y menor riesgo de degradación térmica de las muestras¹³. Las primeras columnas de relleno poseían fases no polares, pero estas han sido completamente reemplazadas por columnas capilares con una amplia gama de polaridad. Las columnas no polares son generalmente utilizadas para el análisis de aceites, por que tienen muy baja estabilidad térmica, lo que permite temperaturas de hasta 240°C, que son necesarias para volatilizar los FAMEs de mayor peso molecular¹³.

Para los ácidos grasos de elevado peso. Son preferidas las columnas con fases estacionarias no polares como la silicona OV-1 o SE30. Las columnas no polares separan a los FAMEs en función a su punto de ebullición, por lo que los FAMEs insaturados eluiran antes que los FAMEs saturados¹³.

Hay dos métodos disponibles para cuantificar los ácidos grasos. La primera es a través de la integración de pico simple. Este método puede dar resultados inexactos si los picos no están totalmente separados, que a menudo es el caso de moléculas con estructuras similares, tales como ácidos grasos que solo pueden variar por un doble enlace. El segundo método es utilizar un detector de ionización a llama (FID).

En un detector FID, la muestra pasa a través de una llama, que combustiona la muestra en fragmentos que ionizados en un electrodo. Los iones con carga fluirán por el sensor del electrodo, produciendo una corriente. Este detector tendrá una relación lineal con el número de átomos de carbono que están presentes en la muestra, a mas muestras que se quema se

¹² Brianna L. Peterson and Brian S. Cummings. *Biomed. Chromatogr.* 2006; 20: 227–243.

¹³ Edda B. Hoving. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Application.* 1995; 671(1):341-362.

producirá una mayor señal. El FID es un detector muy sensible, sin embargo la desventaja de usar FID es que destruye la muestra¹⁴.

Hay una amplia variedad de ácidos grasos comunes de origen animal y vegetal, formando cadenas de 16 a 22 átomos de carbono, con cero a seis dobles enlaces, configuraciones Cis y Trans, en su mayoría los sistemas de doble enlace son los predominantes, sin embargo la naturaleza brinda un sin número de excepciones. Existen más de un millar de diferentes ácidos grasos de origen natural, así como otros producidos artificialmente cuando las grasas se utilizan en el comercio y en la cocina, por ejemplo¹⁵.

Por lo tanto, es esencial disponer de métodos sencillos y rápidos para la determinación de la presencia de los ácidos grasos. En particular, los nuevos métodos de cromatografía de gases (CG), CG acoplado a espectroscopia infrarroja por transformaciones de Fourier (FTIR), la mejor aplicada es la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS), de iones de plata y de fase inversa en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), están disponibles, entre otros¹⁶.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DEL ACEITE DE CASTAÑA

Obtención del aceite crudo.

Se obtuvo el aceite crudo de castaña por extrucción directa de los frutos y donado al IIFB para su análisis por la empresa exportadora de Nuez de Brasil “Tahuamanu” que fue tomado como aceite control. También aceite contaminado del cual se duda su calidad.

Resonancia magnética nuclear del aceite de castaña.

El análisis del aceite crudo por resonancia magnética nuclear se realizó en el laboratorio KemiCentrum a cargo del doctor Olor Sterner en Lund University, Suecia.

¹⁴ Lima A. *Analytica Chimica Acta*. 2002; 465: 81–91.

¹⁵ William C. *Lipids*. 1998; 33: 343–353.

Obtención de los metil esteres de ácidos grasos del aceite de castaña (FAME).

Para la transesterificación del aceite de castaña primero los solventes utilizados fueron sometidos a una doble destilación y secado con sal inorgánica para la minimizar el contenido de agua. A la muestra de aceite crudo (100mg) disuelta en hexano (1mL), se agregó la solución A [0,6mL, NaOH (1g) en MeOH (13mL)], se calentó por 30 min en baño maría, se enfrió y se añadió la solución B [1,6mL, HCl conc. (1mL) en MeOH (11 mL)], después de agitar, se separa la fase superior y se concentra en rota evaporador y al vacío por 12 h. La muestra es una pasta blanca sólida a temperatura ambiente y líquida al calor de la mano.

Análisis de los metil esteres de ácidos grasos del aceite de castaña por cromatografía de gases.

Previo al análisis por CG los FAME's del aceite de castaña fueron procesados para minimizar las impurezas pasándolas por una columna de silicagel disolviendo la muestra en hexano, luego se elimino el solvente y se conservo a 4°C hasta su análisis.

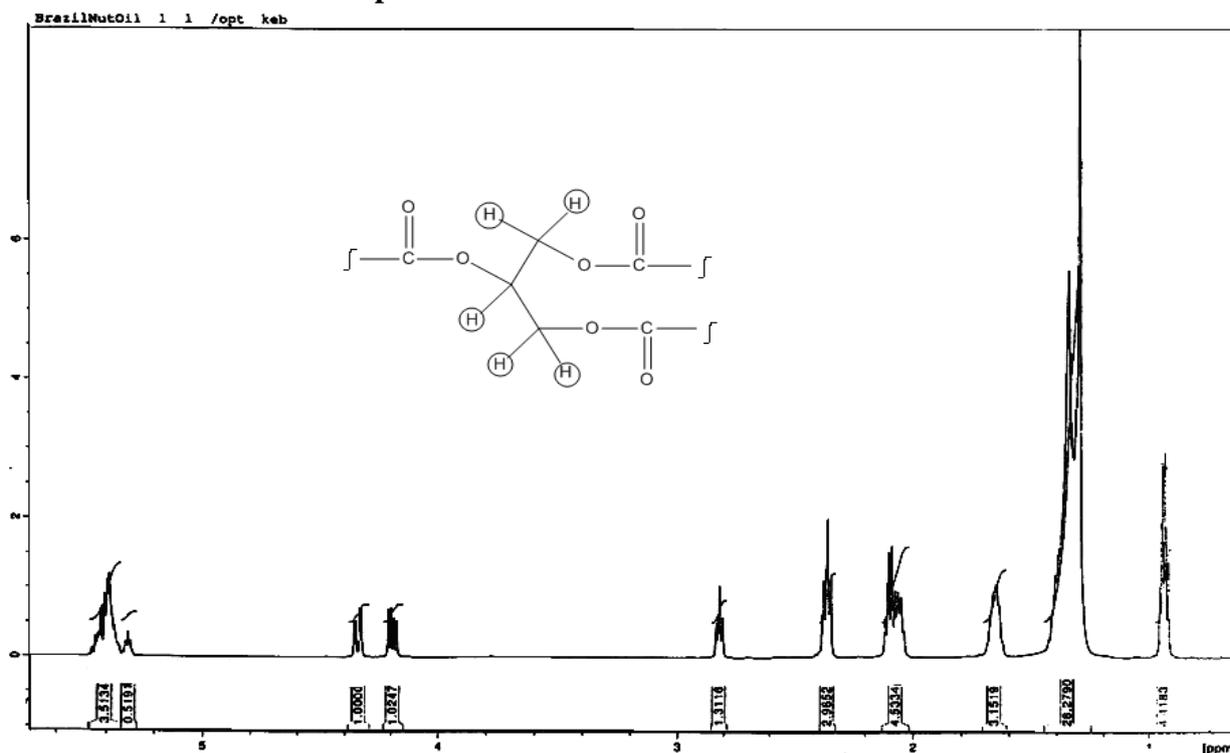
Los FAME's del aceite de castaña fueron analizados en un cromatógrafo de gases CLARUS 500, se realizo sobre una columna SUPELCO SLBTM -5ms Fused silica Capillary Colum (30m x 0,32 mm x 0,25um), el horno empezó con una temperatura inicial de 100°C por 5 min ascendiendo en una razón de 10°C/min hasta alcanzar los 250°C manteniéndose por 10min, el inyector se mantuvo a 250°C utilizando como gas carrier H₂ en un flujo de 0,5 ml/min, se utilizo un detector de ionizacion a flama (FID) a 270°C, inyectando 10uL de FAME's a una concentración de 10mg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En el espectro de RMN ^1H , del aceite crudo se puede evidenciar la presencia fundamentalmente de triglicéridos, por las señales de los sistemas ABX originados por los protones de la glicerina en forma de éster por la señal del grupo metino a δ 5,25 ppm, (m, 1H) y las señales a δ 4,19 ppm (dd, 2H) y δ 4,28 (dd, 2H) que se complementan con señales de protones sobre dobles enlaces a δ 5,40 ppm, y señales de protones en carbonos alfa al carbonilo y protones alílicos ubicados en los ácidos grasos insaturados entre δ 1,65 y 2,80 ppm, una abundante señal centrada en δ 1,24 ppm de los grupos CH_2 y señales de grupos CH_3 a δ 0,90 ppm, confirmando la presencia de triglicéridos. Grafica 1.

Gráfica 1. Espectro de RMN ^1H del aceite de Nuez de Brasil



Obtención de los metil esteres de ácidos grasos (FAMES) del aceite de Nuez de Brasil

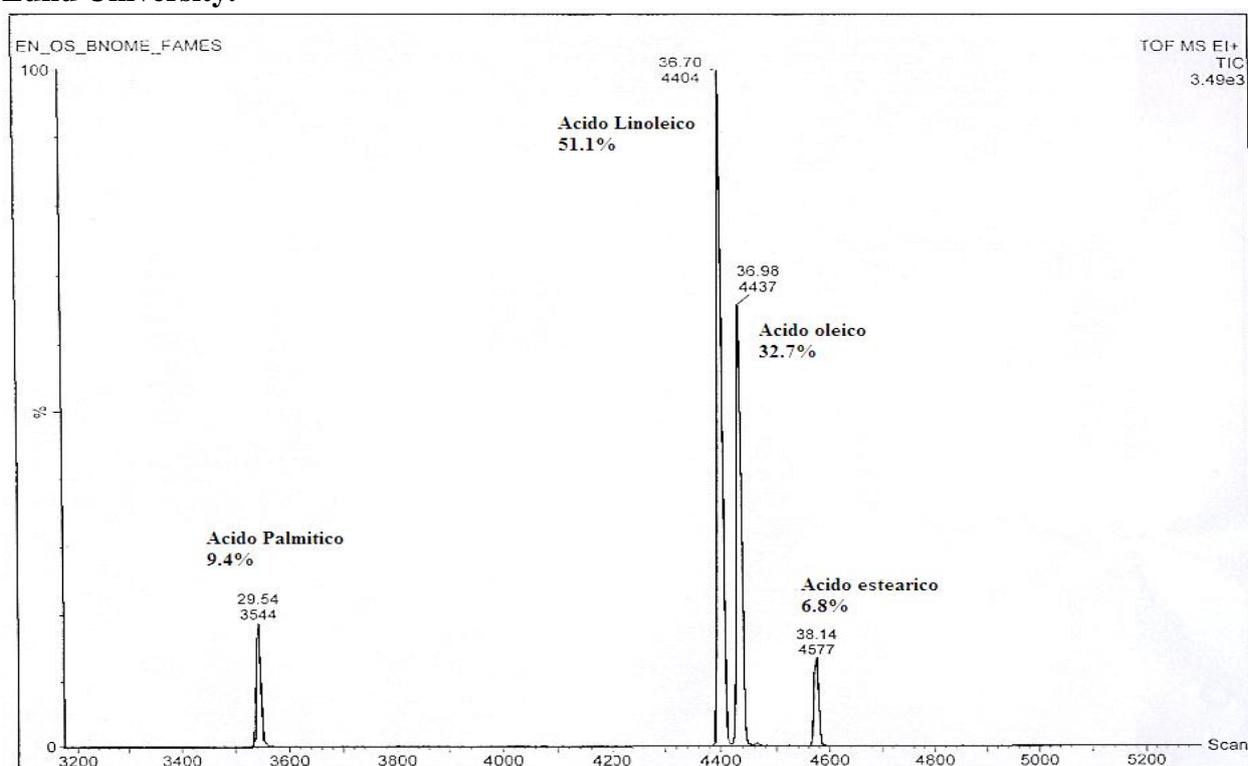
Se realizó la obtención de metil esteres de ácidos grasos por el método Frances con un rendimiento del 46% - 56% en peso. Siendo inferiores a los resultados obtenidos en trabajos realizados con varios tipos de aceites donde los rendimientos son superiores al 90%¹⁰. Este bajo rendimiento se lo puede atribuir a los reactivos que si bien fueron tratados para

minimizar el contenido de agua en ellos, generaron una porción de jabón lo cual bajo el rendimiento.

Análisis de los FAMES del aceite de Nuez de Brasil Por Cromatografía de gases (CG)

Para realizar un análisis comparativo, tomaremos como referencia los espectros de GC-MS obtenidos en Suecia que nos permitirán definir que sustancias son, ya que no tenemos muestras patrón, y solo comparando los perfiles entre los experimentos de Suecia y los realizados en el IIFB podremos discutir sobre las moléculas identificadas. Grafica 2.

Grafica 2. Espectro GC-MS de los FAME's del aceite de Nuez de Brasil obtenido en Lund University.



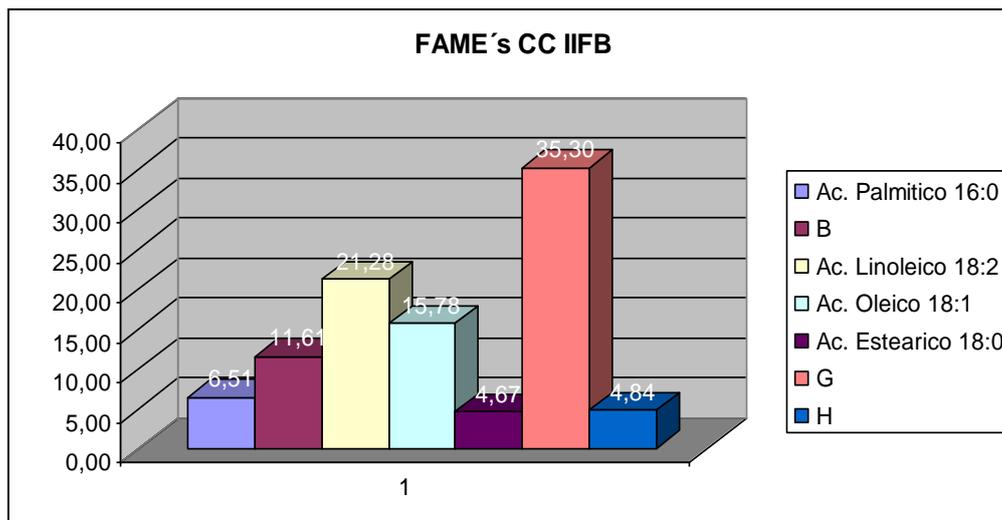
Se analizaron dos muestras de aceite de Nuez de Brasil, primero aceite refinado como control (CC) y después aceite contaminado con fluorescencia naranja del cual se dudaba la calidad (CF). La Tabla 1 muestra los tiempos de retención de todos los picos encontrados en la muestra CC. En la Grafica 3 se muestra la distribución de los FAME's (Anexo1).

Tabla 1. Tiempos de retención y áreas de los ácidos grasos encontrados en los metil-esteres de ácidos grasos (FAME's) del aceite de Nuez de Brasil control (CC) por cromatografía de gases.

CG-FID Compuesto	FAMES CC IIFB		
	T. Ret	A. rel	%

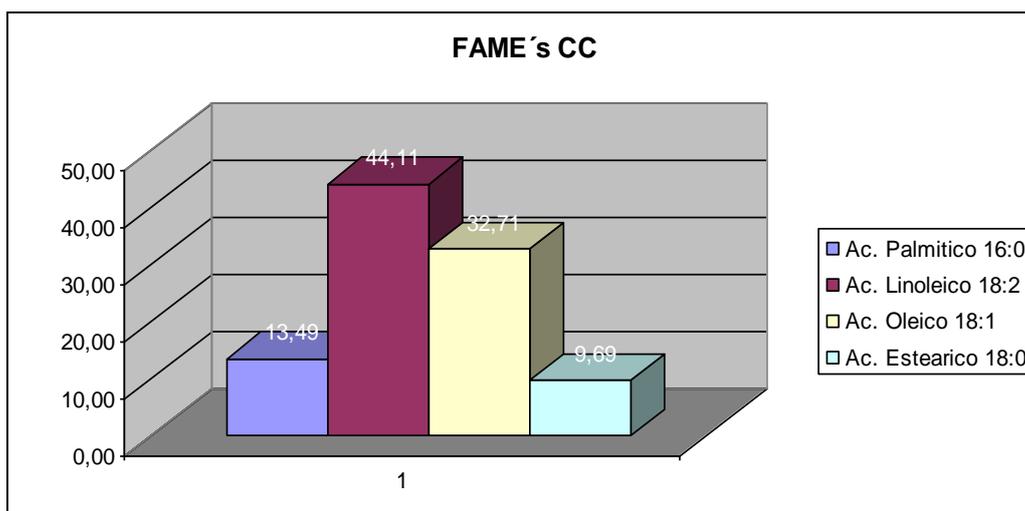
Ac. Palmítico 16:0	16,323	763,88	6,51
B	16,948	1362,81	11,61
Ac. Linoleico 18:2	17,985	2497,24	21,28
Ac. Oleico 18:1	18,046	1851,93	15,78
Ac. Estearico 18:0	18,257	548,51	4,67
G	18,688	4143,25	35,3
H	18,868	568,59	4,84
		11736,21	100

Grafica 3. Distribución de los componentes presentes en la muestra CC analizados por CG.



Se encontraron varios picos que no están identificados, según comparación bibliográfica se puede armar un perfil con los tiempos de retención obtenidos de los ácidos grasos mayoritarios en la muestra. Grafica 4.

Grafica 4. Distribución de los metil ester de ácidos grasos presentes en la muestra CC analizados por CG.



Según este perfil es mayor la cantidad de ácidos grasos insaturados con 76.82% y la cantidad de ácidos grasos saturados es de 23.18%. Los altos niveles de aceites insaturados también son obtenidos por otros autores obteniendo 75.6% en Brasil y 83.8% en Lund University⁵.

Estos altos niveles de ácidos grasos insaturados son comparables con los de otros aceites provenientes de frutos como: Aceite de oliva 83.3%, aceite de almendra 87%, aceite de nuez 83% principalmente. Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en aceites vegetales¹⁶

ACEITES VEGETALES	% saturados	% insaturados
Nuez de Brasil (Brasil)	25,20%	75,00%
Nuez de Brasil (Bolivia)	23,18%	76,82%
Aceite de Girasol	7,70%	87,93%
Aceite de Oliva		78,00%
Aceite de Linaza		56,00%
Aceite de Soya	13,70%	79,00%
Aceite de Canola	5,25%	80,75%
Aceite de Cacahuete	11,40%	82,00%
Aceite de Algodón	21,00%	72,70%
Aceite de Maiz	12,70%	85,80%

¹⁶ Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Editorial Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London – UK. 2006.

Se obtuvo un porcentaje de ácido linoleico de 44.11% y ácido oleico de 32.71% como ácidos grasos mayoritarios, comparables con los resultados obtenidos en estudios realizados en Brasil 36.1% de ácido linoleico y 39.3% de ácido oleico, según el ministerio de agricultura de Brasil el porcentaje de ácido linoleico es de 40 – 44.9% y para el ácido oleico es de 30.5 - 46.2%, otros estudios realizados en Lund University reportan 51.1% para el ácido linoleico y 32.7% para el ácido oleico.

Muchos autores concuerdan, que las variaciones en los resultados cambian de acuerdo a la región de donde fue cosechada la nuez de Brasil, además del tiempo que estuvieron guardados para el procesamiento¹⁷.

Como ácidos grasos minoritarios se reportaron ácido palmítico con 13.49% y ácido esteárico con 9.69%. Otros estudios reportan cantidades de ácido palmítico de 12% y ácido esteárico de 10.4%. El ministerio de agricultura del Brasil establece un rango de 12.0 – 16.6% para el ácido palmítico y de 8.5 – 13% de ácido esteárico. Los estudios realizados en Lund University muestran concentración 9.4% y 6.8% para el ácido palmítico y esteárico respectivamente.

Estos resultados no muestran grandes variaciones, esto se puede deber a la estabilidad de los ácidos grasos saturados, los ácidos insaturados son más susceptibles a la oxidación razón por la cual varía su concentración en el aceite.

En el análisis del aceite de Nuez de Brasil, contaminada con fluorescencia naranja (CF), se dudaba de la calidad de la misma, en la Tabla 3 se muestran todos los picos encontrados (Anexo 2).

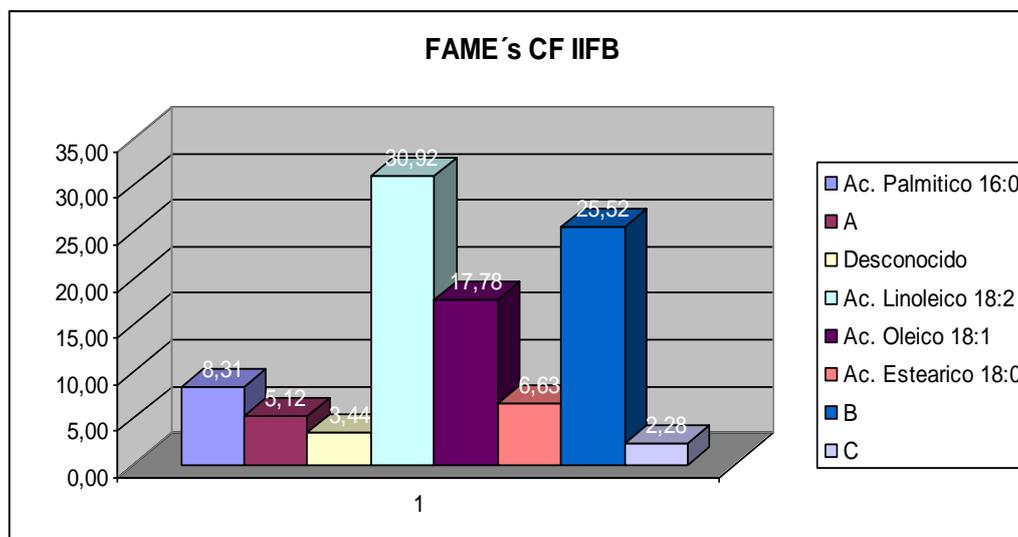
¹⁷ Yanevich D., Brachna C., Sánchez D., Okulik C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1638.

Tabla 3. Tiempos de retención y áreas de los metil esteres de ácidos grasos presentes en la muestra CF analizados por CG.

CG-FID	FAMES CF IIFB		
Compuesto	T. Ret	A. rel	%
Ac. Palmítico 16:0	16,368	3162,65	8,31
B	17,008	1951,44	5,12
C	17,407	1309,72	3,44
Ac. Linoleico 18:2	18,069	11773,09	30,92
Ac. Oleico 18:1	18,13	6771,44	17,78
Ac. Estearico 18:0	18,315	2523,17	6,63
G	18,796	9716,92	25,52
H	18,935	869,39	2,28
		38077,82	100

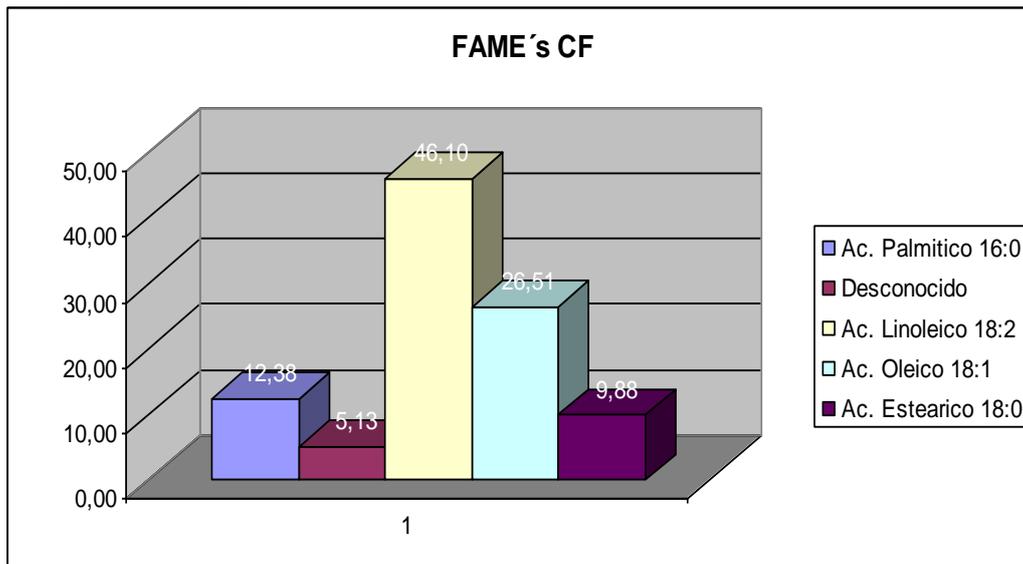
Se encontraron varios picos que no están identificados, se obtuvo un perfil de los ácidos grasos tomando en cuenta su tiempo de retención. La Grafica 5. Muestra la distribución de todos los picos encontrados.

Grafica 5. Distribución de los componentes presentes en la muestra CF analizados por cromatografía de gases.



La Grafica 6. Muestra la distribución de los ácidos grasos en la muestra CF.

Grafica 6. Distribución de los metil ester de ácidos grasos presentes en la muestra CF analizados por cromatografía de gases.



La concentración de ácidos grasos saturados fue de 22.26% y de ácidos grasos insaturados de 72.71%, no habiendo variación significativa con relación al aceite control.

La proporción de ácido linoleico fue de 46.10% y de ácido oleico 26.51%, siendo inferior la proporción de ácido oleico respecto al control. En esta distribución se observa la aparición de un nuevo pico a 17.407 min, que puede ser signo de descomposición de ácidos grasos. Principalmente de ácidos grasos insaturados.

SEGUNDA PARTE

ACEITES ESENCIALES DE EVANTA (*Galipea longiflora*)

ANTECEDENTES

Galipea longiflora

El genero *galipea* cuenta con unas treinta especies aproximadamente distribuidas desde Panamá, Guatemala, Nicaragua, Cuba, Perú, Venezuela y el Su de Brasil¹⁸. En Bolivia la especie *Galipea longiflora* (K. Krause) se distribuye en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos del departamento de Beni y La Paz¹⁹.

La *Galipea longiflora* es un árbol de una altura de hasta 12 metros, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos, zigomorfas mas o menos vistosas en los meses de mayo a junio, los frutos se observan en los meses de junio y julio²⁰.

En Bolivia la etnia Tacana conoce a la *Galipea longiflora* como Evanta o Yuruma huana epuna, la cual tiene muchos usos en la medicina tradicional, su corteza es empleada para el tratamiento diarreas, causadas por parásitos intestinales como amebas, donde un pedazo de corteza molida se sancocha en tres litros de agua hasta que quede medio litro. También sirve como fortificante para adultos. La corteza bien seca se pulveriza, este polvo se aplica como cataplasma en la ulcera, cambiándola dos veces al día hasta que sane la herida².

BOTANICA.

CLASIFICACION TAXONOMICA^{19, 20}.

Dominio:	<i>Eucariota</i>	Familia:	<i>Rutaceae</i>
Reino:	<i>Plantae</i>	Genero:	<i>Galipea</i>
Phylum:	<i>Tracheofita</i>	Especie:	<i>G. Longiflora</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>	Sinonimo:	<i>Angostura longiflora</i> (K. Krause) J. A. Kallunki
Orden:	<i>Rutales</i>		
Suborden:	<i>Rutineae</i>		

ALCALOIDES.

Los alcaloides poseen una diversidad estructural y exhiben una gamma de actividades biológicas como ningún otro grupo de productos naturales. Aunque muchos de los alcaloides clásicos fueron aislados y caracterizados hace muchas décadas, se siguen extrayendo y

¹⁸ [www.Zipcodezoo.com/Plants/G/Galipea longiflora.asp](http://www.Zipcodezoo.com/Plants/G/Galipea%20longiflora.asp). Fecha de acceso julio 2007.

¹⁹ Killen, T.J.; García, E.; Beck, S. *Guía de árboles de Bolivia*. Quipus S.R.L. La Paz-Bolivia, **1993**. 709-710.

²⁰ http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp Fecha de acceso septiembre 2008

aislando continuamente nuevos compuestos de esta naturaleza. Hoy en día se desconocen alrededor de doce mil estructuras y como promedio se describe en la bibliografía un nuevo alcaloide por día. Se encuentran sobre todo en plantas, aunque también se han aislado en menor extensión en microorganismos y animales²¹.

Químicamente los alcaloides son compuestos nitrogenados con uno o más átomos de nitrógeno, que pueden estar presentes como aminas primarias, secundarias o terciarias. Se clasifican de acuerdo a la naturaleza del tipo de nitrógeno presente en el anillo heterocíclico, como por ejemplo los derivados de pirrolidona, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol y estructuras en general.

Algunos de los principios activos aislados de las hojas de *G. longiflora* resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada y la baja toxicidad determinada en modelos *in vivo*, fueron patentados (Chimanina A, B, C y D US4209519/15/04/93)²² estrategia que a la fecha no ha dado ningún resultado tangible.

De la corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de *Galipea longiflora* se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alkil quinolínicos, identificándose 13 componentes activos, Tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos y actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides quinolínicos aislados de la corteza del tronco, hojas y corteza de raíz de *Galipea longiflora*.

Productos	Corteza %	Hojas %	Raíz %	CI ₉₀ (µg/mL)
2-fenilquinolina	47.7	29	66.7	100 ^{a,b,c}
2-fenil-4-metoxi-quinolina	2.8		3.3	50 ^{a,b,c}
2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina	10.2		6.7	100 ^{a,b,c}

²¹ Ticona Juan Carlos. Estudio químico de dos plantas bolivianas de la Etnia Tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgilioides*. tesis maestría 2008.

²² <http://www.patentes.ibm/cgi/viewpat.cmd>. Fecha visitada marzo 2008.

2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina	1.1		100 ^{a,b,c}
2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-4-metoxi-quinolina (cusparina)	3.1	2	100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -pentil-4-metoxi-quinolina	1		100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -pentilquinolina	2.4	17.3	100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -propilquinolina	1.3	12.5	50 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -propil-4-metoxi-quinolina (Chimanina A)	2.4		100 ^{a,b,c}
2-(<i>E</i>)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina B)		16.7	25 ^{a,b,c}
2-(<i>E</i>)-prop-1'-enil-4-metoxi-quinolina (Chimanina C)		0.5	----
2-(1', 2'- <i>trans</i> -epoxipropil)-quinolina (Chimanina D)		1.7	25 ^{a,b,c}
Shiquimianina		1.7	4
			100 ^{a,b,c}

a) *L. braziliensis* (2903); b) *L. amazonensis* (PH8) y (H-142); c) *L. donovani* (2682) y (HS-70).

En evaluaciones *in vivo* se han demostrado que los alcaloides aislados de evanta inhiben el crecimiento de los parásitos, mostrando una reducción en tamaño de las lesiones y número de parásitos cuando los alcaloides purificados son administrados a ratones infectados con *L. amazonensis*²³. Como también se demostró la reducción parasitaria hasta en un 99% en ratones

infectados con *L. donovani*²⁴, En tratamientos de 4-6 semanas con 2-propenilquinolina (chimanina B) post-infección en ratones, redujo el número de parásitos en un 70% - 90%²⁵.

Otros estudios muestran que los alcaloides totales de hojas (HAT) muestran actividad antiparasitaria frente a promatigotes de leishmania.

ENFERMEDADES PARASITARIAS.

Dentro de las enfermedades infecciones las enfermedades parasitarias continúan siendo el principal problema de salud pública, afectando a cientos de millones de personas, particularmente en países tropicales en desarrollo. Estudios recientes han indicado que las enfermedades tropicales corresponden al 10% de las enfermedades globales, así dentro de las 11 enfermedades tropicales consideradas altamente prioritarias por el programa de

²³ Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cave A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37: 859 – 863.

²⁴ Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cave A. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 1994; 33: 537 – 544.

²⁵ Fournet A, Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996; 40: 2447 – 2451.

enfermedades tropicales (TDR) de la Organización mundial de la salud (OMG), siete son parasitarias²⁶.

Tabla 5. Incidencia y mortalidad anual de las principales enfermedades parasitarias.

Enfermedad	Población en riesgo	Muertes 2002	DALYs 2002
(Parasito responsable)	(millones)	(miles)	(millones)
Malaria <i>Plasmodium spp</i>	>2.100	1.272	46.4
Leishmaniasis <i>Leishmania spp</i>	350	51	2.1
Tripanosomiasis africana <i>Tripanosoma brucei</i>	>60	48	1.5
Enfermedad de Chagas <i>Tripanosoma cruzi</i>	120	14	0.7
Esquistosomiasis <i>Shistosoma spp</i>	600	15	1.7
Filariasis linfática <i>Brugia malawi</i>	1.000	0	5.8
Oncocercosis <i>Onchocerca volvulus</i>	120	0	0.5

DALYs: Discapacidad y años de vida perdidos.

El territorio boliviano está constituido por algo más del 70% de regiones tropicales, el que paulatinamente incrementa su población debido al fenómeno de migración de la población de regiones no infectadas. Entre las tres grandes parasitosis que afectan al territorio boliviano están: la leishmaniasis, la malaria y la enfermedad de Chagas, que son causa frecuente de trastornos en la salud de la población llegando a índices preocupantes lo que conlleva a consecuencias sociales diversas²⁶.

ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

Una de las aplicaciones de la CG es el análisis de aceites esenciales, gracias a que se obtienen resultados rápidos, reproducibilidad y repetibilidad en resultados, según estudios de 119 muestras de aceites esenciales de plantas, se muestra un comportamiento similar en función al tipo de aceite²⁷. Estos estudios se utilizaron para la discriminación de aceites y se

²⁶ World Health Organization. World Health Report. 2004

²⁷ T. Cserhádi. Biomed. Chromatogr. [Revista de Internet]. 2009.

llego a la conclusión que este análisis permite formar un perfil para la clasificación de los aceites esenciales.

Otros estudios muestran que es posible determinar variaciones en el aceite en función del tiempo, como los estudios realizados en ginsen²⁸. Por tanto, estos análisis podrían ser utilizados para la discriminación de aceites en control de calidad y estudios de estabilidad molecular en el tiempo.

Las columnas capilares tiene buenos resultados en el análisis de mezclas complejas de alcaloides, con lo concerniente a CG, esperamos la determinación de los alcaloides minoritarios y en general perfeccionar un método para la determinación de alcaloides contenidos en diferentes especies de *Galipea*, en estos estudios se evaluó la posibilidad de analizar los extractos sin necesidad de la derivatización, como los perfiles obtenidos del aceite esencial de *Galipea officinalis*, tomándolo como referencia saber si este instrumento nos provee de la suficiente información en la identificación de las principales quinolinas²⁹.

²⁸ Qiu YQ, Lu X, Pang T, Ma CF, Li X and Xu GW. *Journal of Separation Science* 2008; 31: 3451–3457.

²⁹ Jacquemond I, Bessiere JM, Hannedouche S. *Phytochem. Anal.* 2001; 12: 312 - 319.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ANALISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE EVANTA.

Obtención del aceite esencial de Evanta.

El aceite esencial de Evanta se obtuvo por arrastre de vapor de las hojas, recolectadas del norte de La Paz en la comunidad San José S: 15°24'30.55" O: 67°19.082' Altura 572msnm, en el mes de Junio del 2009. El aceite fue obtenido a partir de las hojas secas molidas, luego fueron pasadas por columnas de sales inorgánicas para minimizar su contenido de agua y conservado a 4°C en un frasco color ámbar hasta su estudio.

Determinación del índice de refracción del aceite de esencial de evanta.

Se analizaron dos muestras de aceites esenciales, la primera obtenida de hojas nuevas recolectadas este año 2009 (AHN), y la segunda obtenida de hojas viejas recolectadas los años 2003, 2004, 2005 (AHV), en un refractómetro A. KRUSS SN 2200211882 y un termostato Ultrathermostat, ambos de industria alemana. El análisis se realizó a una temperatura de 20 °C.

Determinación de la actividad Leishmanicida del aceite esencial y los alcaloides totales de hojas (HAT).

Los alcaloides totales de hojas (HAT), fueron obtenidos en el Instituto de Investigaciones Fármaco – Bioquímicas (IIFB) en trabajos anteriores³⁰.

Las hojas secas y pulverizadas, fueron sometidas a una maceración con CH₂Cl₂ (1:10) durante 72 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido fue filtrado, evaporado, concentrado a 40 °C en el rotavapor y llevado a sequedad, obteniendo de extracto crudo un rendimiento de 3.9%, con relación al material seco.

Para la obtención de los alcaloides, el extracto crudo (50g) fue disuelto en CH₂Cl₂ (100mL) y sometidos a lavados sucesivos con HCl 1N (100mL x 3 veces), se combinaron los lavados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N (150mL). El sólido formado fue extraído con CH₂Cl₂ (100mL x 3 veces). La solución orgánica fue deshidratada con NaSO₄, filtrada y evaporada al vacío.

³⁰ Llanos F. Estudio químico comparativo de alcaloides totales en corteza de *galipea longiflora* (evanta) colectada en cinco regiones del norte de La Paz. Bolivia: IIFB; 2008.

Las evaluaciones antiparasitarias del aceite esencial y alcaloides totales de hojas (HAT), se las realizo en el IIFB, área de Parasitología. Utilizando el método colorimétrico (XTT) sobre promastigotes de Leishmania.

Análisis de los alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta por cromatografía de gases (CG).

El extracto de alcaloides totales de las hojas (HAT) obtenido en trabajos previos, fue analizado en un cromatógrafo de gases CLARUS 500, sobre una columna SUPELCO SLB™ -5ms Fused silica Capillary Column (30m x 0,32 mm x 0,25um), el horno empezó con una temperatura de 50°C por 5min ascendiendo a una razón de 5°C/min hasta los 250°C manteniéndose por 10min, el inyector se mantuvo a 250°C, se utilizo como gas carrier H₂ programado en modo flujo 0,5ml/min, se utilizo un detector de ionizacion a flama (FID) a 270°C, se inyectó 10uL de la muestra a una concentración de 10mg/mL.

Fraccionamiento del HAT por diferenciales de pH, para la obtención de HQ2.

Se realizó el fraccionamiento por diferenciales de pH para la separación de la 2-fenil-Quinolina (componente mayoritario) de los componentes minoritarios del HAT de Evanta.

- Los alcaloides totales obtenidos se disuelven en HCl 1N.
- Se lleva a pH = 3 con NaOH 2N, controlando el pH final con el pHmetro, para producir la precipitación de la 2-fenil-Quinolina.
- El precipitado formado se recupera por filtración en un papel filtro pesado, que corresponde a la fracción HQ1.
- Se lava el precipitado obtenido con HCl 0,001 N (pH > 3,00).
- Se unen el filtrado inicial y la solución acida utilizada para el lavado (HCl 0.001N).
- Se llevan con NaOH 1N a un pH entre 4,8 a 5.
- Se realiza la extracción con CH₂Cl₂ (x 3 veces) con agitación constante por 10 minutos.
- Los extractos orgánicos se juntan, secan con NaCl secado a 105°C, filtran y se evaporan a 40°C con un rotaevaporador, esta fracción corresponde a la fracción HQ2.

Análisis del aceite esencial de Evanta por cromatografía de gases.

El aceite esencial de evanta fue analizado en un cromatógrafo de gases CLARUS 500, sobre una columna SUPELCO SLB™ -5ms Fused silica Capillary Column (30m x 0,32 mm x

0,25um), el horno empezó con una temperatura de 50°C por 5min ascendiendo a una razón de 5°C/min hasta los 250°C manteniéndose por 10min, el inyector se mantuvo a 250°C, se utilizo como gas carrier H₂ programado en modo flujo 0,5ml/min, se utilizo un detector de ionizacion a flama (FID) a 270°C, se inyecto 10uL de la muestra a una concentración de 10mg/mL.

ANALISIS DE LAS FRACCIONES FQ2 Y FQ3 DE EVANTA.

Análisis de las Fracciones FQ2 y FQ3 por cromatografía de gases.

Se analizaron las fracciones FQ2 y FQ3 de 4 regiones del norte de La Paz: Santa Rosa (SR), Vencedores (VE), Covendo (CO) y Yabanico (YA). Las fracciones FQ2 y FQ3 de evanta fueron proporcionados por el IIFB mismos que ya habían sido analizados en la universidad de la Laguna, Islas Canarias, España.

Previo al análisis por cromatografía de gases se pesaron muestras representativas de las fracciones FQ2 y FQ3 de las distintas regiones Tabla 6. Se paso las muestras de FQ2 y FQ3 por columnas de silicagel para minimizar su contenido de impurezas, las fracciones fueron disueltos en diclorometano y eluidas con diclorometano: metanol (5%) y conservadas a 4°C hasta su análisis.

Las fracciones FQ2 y FQ3 de evanta fueron analizadas en un cromatógrafo de gases CLARUS 500, sobre una columna SUPELCO SLBTM -5ms Fused silica Capillary Colum (30m x 0,32 mm x 0,25um), el horno empezó con una temperatura de 50°C por 5min ascendiendo a una razón de 5°C/min hasta los 250°C manteniéndose por 10min, el inyector se mantuvo a 250°C, se utilizo como gas carrier H₂ programado en modo flujo 0,5ml/min, se utilizo un detector de ionizacion a flama (FID) a 270°C, se inyecto 10uL de la muestra a una concentración de 10mg/mL.

Tabla 6. Peso de las fracciones FQ2 y FQ3 de 4 regiones del norte de La Paz.

Fracción	FQ-2	FQ-3
Vencedores (VE)	10mg	10mg
Santa Rosa (SR)	20.4mg	20.5mg
Covendo (CO)	20mg	21mg
Yabanico (YA)	20.7mg	20.5mg

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención del aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*).

Para el procesamiento de las hojas de Evanta se pasaron las canastas del destilador por arrastre de vapor, cada canasta contenía un peso promedio de **153.1g** de hojas molidas por canasta: (Tabla 7).

Tabla 7. Peso de las hojas secas molidas por canasta del destilador por arrastre de vapor

FECHA	Canasta1	Canasta2	Canasta3	Canasta4
21-jul	150.72g	188.14g	161.46g	191.14g
22-jul	164.42g	158.04g	105.06g	158.94g
23-jul	153.72g	143g	156.6g	155.5g
28-jul	166.72g	151.3g	154.8g	154.9g
29-jul	130.7g	137.3g	138.4g	128.7g
30-jul	151.3g	122.4g	160.2g	153.2g
31-jul	155.4g	150.4g	138.2g	141.1g
07-ago	152g	134.4g	128.4g	129.7g
14-ago	178.42g	174.7g	184.8g	166.6g
17-ago	166.4g	176.5g	163.5g	171.1g
Promedio	155.1g	153.2g	150.2g	153.9g

El aceite extraído fue secado pasándolo por columnas de sales inorgánicas (NaCl), el aceite obtenido fue conservado a 4°C.

Tabla 8. Rendimiento de la extracción de aceites esenciales de Evanta.

Peso de hojas procesadas	16.5 K
Peso del aceite	58.6g

$$\begin{array}{l} 16500g - 100\% \\ 58.6g - x \end{array}$$

$$X = 0.36\%$$

Tabla 9. Rendimiento en la obtención de aceites esenciales y HAT a partir de hojas de *Galipea Longiflora*

Rendimiento	
AHF	0.4%
AHV	0.4%
AHNS	0.36%
HAT-VE	0.57%

AHF: Aceite de hojas frescas; **AHV:** Aceite de hojas Viejas; **AHNS:** Aceite de hojas nuevas secas; **HAT-VE:** Alcaloides totales de hojas – Vencedores.

No existe gran diferencia en rendimientos cuando se extrae el aceite esencial por arrastre de vapor (muestras AHF, AHV, AHNS), la obtención del HAT se realizó por maceración en CH₂Cl₂ y se observa mayor rendimiento. Pero esta extracción química de los alcaloides es mucho más laboriosa que la obtención de los aceites esenciales por arrastre de vapor. Por eso es necesario comparar perfiles y saber si presentan igual contenido de alcaloides.

Se analizó la calidad del aceite de esencial comparando los índices de refracción entre el aceite de hojas nuevas (AHN) y el aceite de hojas viejas (AHV) Tabla 10.

Tabla 10. Índices de refracción de los aceites esenciales de Evanta.

Aceite Esencial de Evanta	
Índice de refracción	
a 20 °C	
Agua	0
AHN	15.569
AHV	15.569

AHN: Aceite de hojas nuevas; AHV: Aceite de hojas viejas

Ambos aceites presentan los mismos índices de refracción, indicando que son iguales en calidad.

Determinación de la actividad Leishmanicida del aceite esencial y los alcaloides totales de hojas (HAT).

Las muestras fueron evaluadas reportando valores de IC₅₀ en µg/mL sobre promastigotes de leishmania utilizando el método colorimétrico (XTT) en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dando los siguientes resultados:

Tabla 11. Valores del IC₅₀ en µg/mL sobre promastigotes de leishmania de aceites esenciales y HAT de Evanta evaluados por el método colorimétrico (XTT).

	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.amazonensis</i> clon1
	MHOM/BR/75/M2903	MHOM/BR/76/LTB-012
AHF	19,7+/- 6,8	54,1+/-12,5
AHV	30.9+/-5.8	57.2+/-9.8
AHNS	16.0+/-2.3	35.5+/-3.1
HAT-VE	6.8+/-1.83	11.5+/-3.1

AHF: Aceite de hojas frescas; AHV: Aceite de hojas Viejas; AHNS: Aceite de hojas nuevas secas; HAT-VE: Alcaloides Totales de Hojas - Vencedores

El análisis de la actividad del aceite esencial de Evanta muestra actividad antiparasitaria, mas aun cuando el aceite es extraído de hojas nuevas secas muestra una IC50=16.0+/-2.3 para *L.braziliensis* y 35.5+/-3.1 para *L.amazonensis*, que si bien no se compara con la actividad del HAT que muestra una IC50=6.8+/-1.83 para *L.braziliensis* y 11.5+/-3.1 para *L.amazonensis*, el comparar sus perfiles de alcaloides por CG seria de gran valor considerando que el método de obtención es diferente.

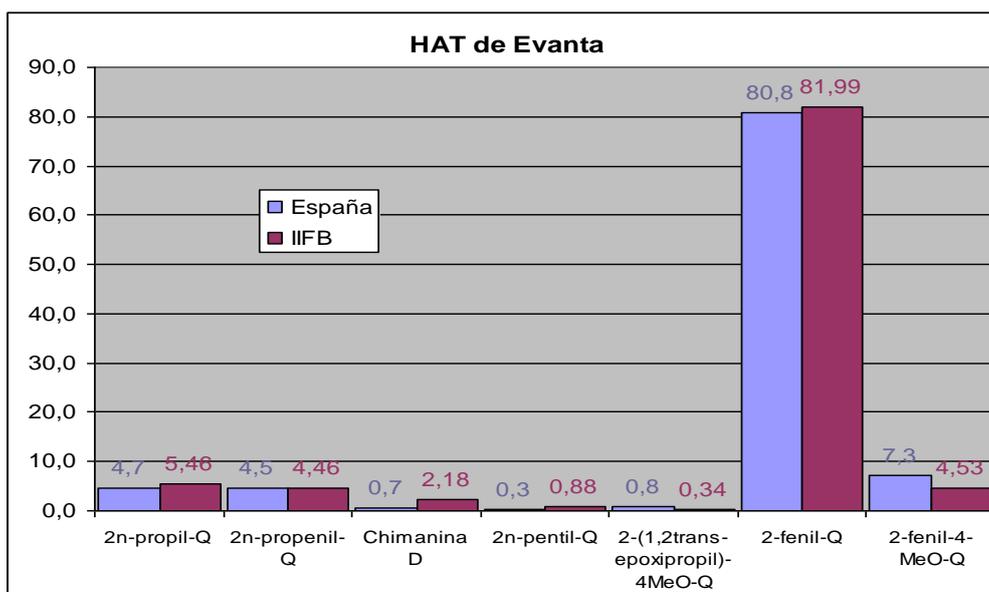
Análisis de los alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta por CG.

Se utilizo como referencia el perfil de alcaloides obtenido en los análisis realizados en la universidad La Laguna, Islas Canarias, España (Anexo 3). Tabla 12. Se analizo el HAT de Evanta por CG obteniendo perfiles idénticos a los estudios en España, los cuales los utilizaremos como referencia para el análisis del aceite de Evanta. Grafica 7 (Anexo 4).

Tabla 12. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides presentes en el HAT de Evanta obtenido por CG en la Universidad La Laguna, España.

HAT			
GC - MS España	T. ret	Area Rel.	%
2n-propil-Q	21,98	7607	4,7
2n-propenil-Q	24,4	7354	4,6
Chimanina D	25,96	1073	0,7
2n-pentil-Q	26,82	452	0,3
2-(1,2trans-epoxipropil)-4MeO-Q	29,62	1368	0,8
2-fenil-Q	33,34	131566	81,6
2-fenil-4-MeO-Q	37,85	11883	7,4
		161303	100

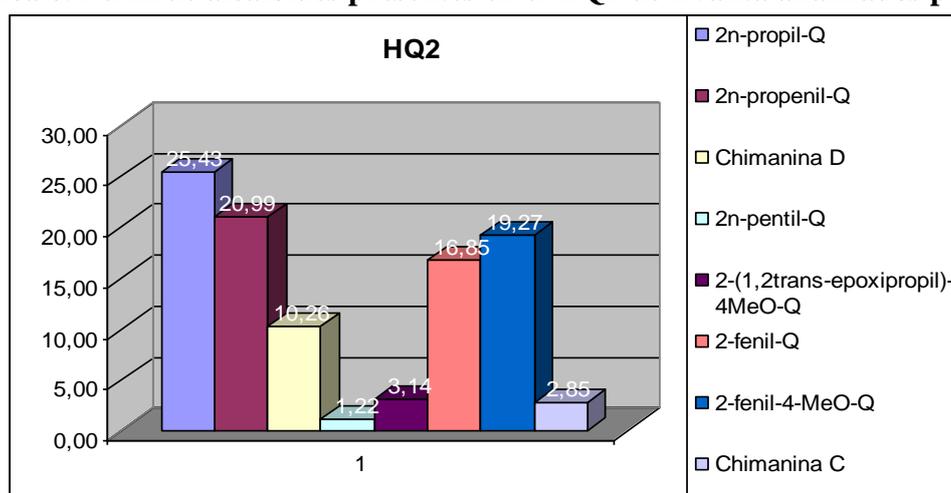
Grafica 7. Comparación de la distribución de los alcaloides totales de hojas (HAT) analizados por CG en la universidad La Laguna, España con los resultados obtenidos en el IIFB.



Estos resultados muestran la distribución de los alcaloides, siendo la 2-fenil-Quinolina el mayoritario con 80% de la muestra, la gran cantidad de este pico impide ver a los picos minoritarios, para la comparación con el aceite esencial de Evanta el pico de la 2-fenil-Quinolina fue precipitado del HAT, tratando de separarlo de la muestra. Para la obtención del HQ2.

Luego de la obtención del HQ2 de Evanta, se lo analizo por cromatografía de gases, obteniendo un perfil de alcaloides que será usado como referencia para la comparación del aceite esencial de Evanta (Anexo 5), Como se observa en la Grafica 8.

Grafica 8. Perfil de alcaloides presentes en el HQ2 de Evanta analizados por CG.



Análisis del aceite esencial de Evanta por CG.

En el análisis del aceite esencial de Evanta por cromatografía de gases, se encontraron una gran cantidad de componentes que no están identificados, la Tabla 13 muestra los tiempos de retención y áreas de los componentes encontrados (Anexo 6).

Tabla 13. Tiempos de retención y áreas de los componentes encontrados en el aceite esencial de evanta por CG.

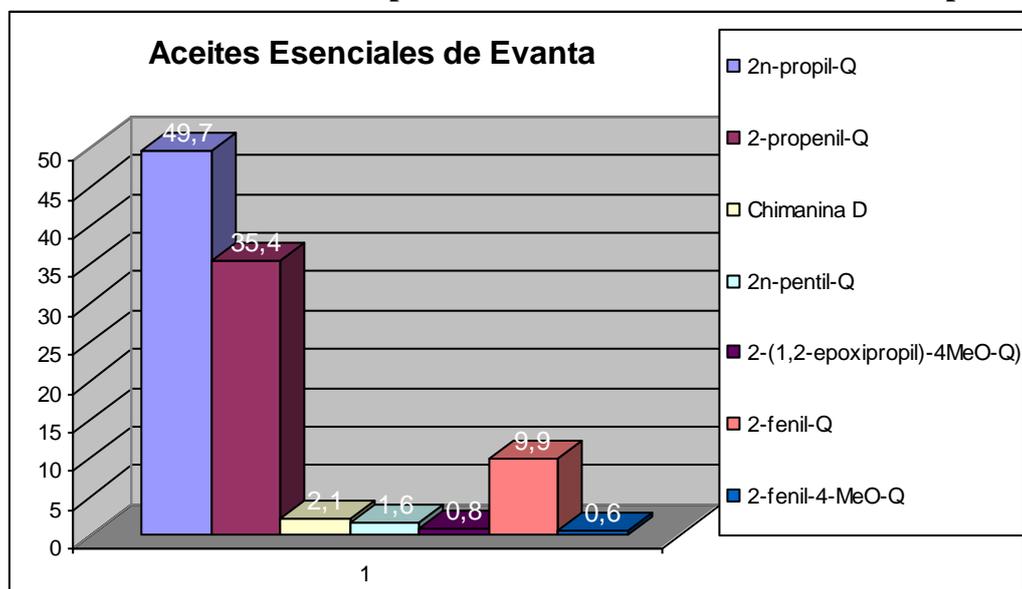
ACEITE ESENCIAL			
Analisis CG-FID	T. Ret	A. Rela	%
Desconocido 1	6,6	1524,7	0,6
Desconocido 2	7,0	2511,1	0,9
Desconocido 3	9,1	10102,8	3,7
Desconocido 4	19,8	47311,5	17,1
Desconocido 5	20,6	13528,2	4,9
2n-propil-Q	21,6	92588	33,5
2-Propenil-Q	24,1	65900,6	23,9
Desconocido 6	24,5	3885,9	1,4
Desconocido 7	24,7	6839,8	2,5
Desconocido 8	24,8	511,4	0,2
Chimanina D	25,3	3208,3	1,2
2n-pentil-Q	26,0	2922,8	1,1
Desconocido 9	26,4	1097,9	0,4
Desconocido 10	27,0	912,3	0,3
Desconocido 11	28,1	855	0,3
2-(1,2trans-epoxipropil)-4MeO-Q	29,4	1522,3	0,6
2-fenil-Q	32,5	18377,6	6,7
Desconocido 12	34,1	1532,4	0,6
2-fenil-4-MeO-Q	36,9	1086,2	0,4
		276219	100

La gran mayoría de estos picos no están identificados, pero es posible formar un perfil tomando como referencia los tiempos de retención de los alcaloides bien identificados en el análisis del HQ2 de Evanta. La Tabla 15 muestra los alcaloides encontrados y el Grafico 9 su distribución.

Tabla 14. Perfil de los alcaloides, tiempos de retención y áreas encontrados en el aceite esencial evanta por CG.

Aceite Esencial de Evanta			
Análisis CG-FID	T. Ret	A. Rela	%
2n-propil-Q	21,6	92588	49,7
2-propenil-Q	24,1	65900,6	35,4
Chimanina D	24,5	3885,9	2,1
2n-pentil-Q	26,0	2922,8	1,6
2-(1,2trans-epoxipropil)-4MeO-Q)	29,4	1522,3	0,8
2-fenil-Q	32,5	18377,6	9,9
2-fenil-4-MeO-Q	36,9	1086,2	0,6
		186283,3	100

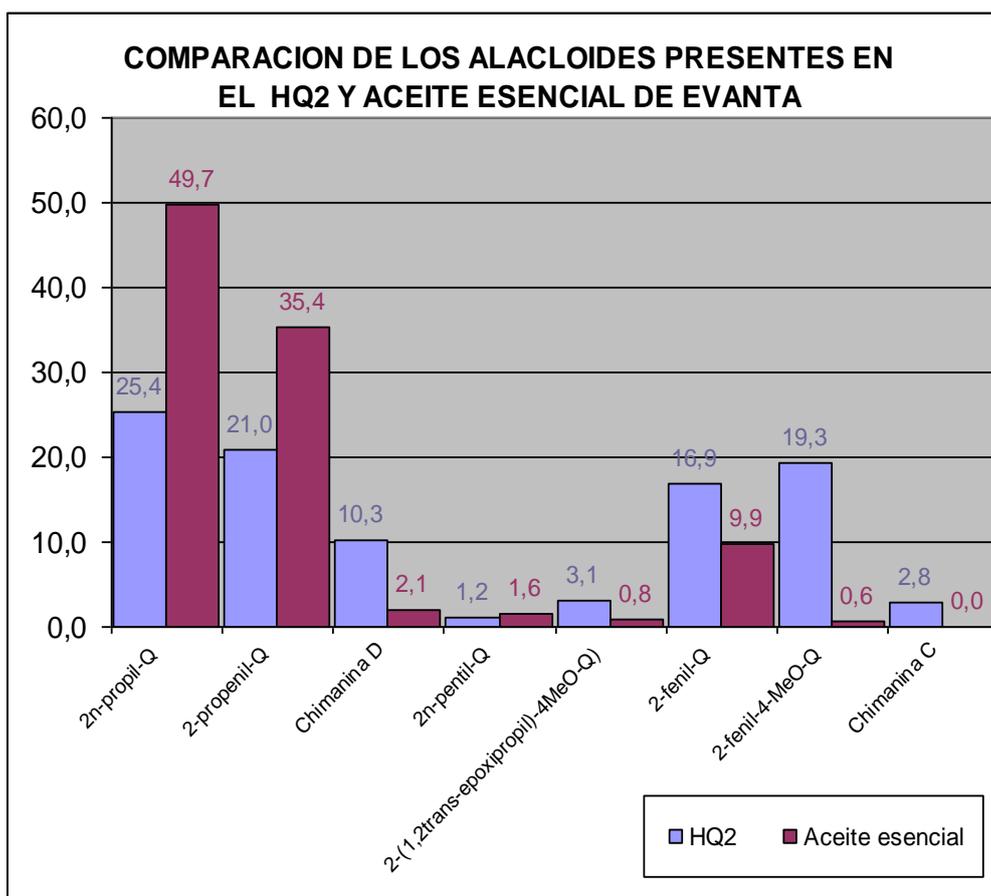
Grafica 9. Perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta por CG.



Comparando ambos perfiles, se observa una distribución diferente de los alcaloides en ambas muestras Grafica 10, sobre todo la 2-fenil-Quinolina que en la muestra del aceite forma parte de los alcaloides minoritarios con 9.9% y en el HAT es el 80% de la muestra.

Los alcaloides minoritarios en el HAT son reflejados en HQ2, al comparar el HQ2 con el aceite esencial se observa que hay una mayor proporción de 2n-propil-Quinolina 49.7% y 2n-propenil-Quinolina con 35.4%. Otra observación es que en la muestra de aceite esencial, es casi nula la presencia de 2-fenil-4MeO-Quinolina con 0.6%.

Grafica 10. Comparación de los alcaloides presentes en el HQ2 y el aceite esencial de Evanta por CG.



Para determinar la composición exacta del aceite esencial de Evanta, son necesarios más estudios, puesto que la gran parte de los picos encontrados no están identificados. En otros estudios realizados para identificar aceites esenciales se utilizaron como técnicas la cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS) y técnicas de resonancia magnética nuclear.

Comparación de los resultados de los análisis por cromatografía de gases (CG) realizadas en España con las realizadas en el IIFB de las fracciones FQ2.

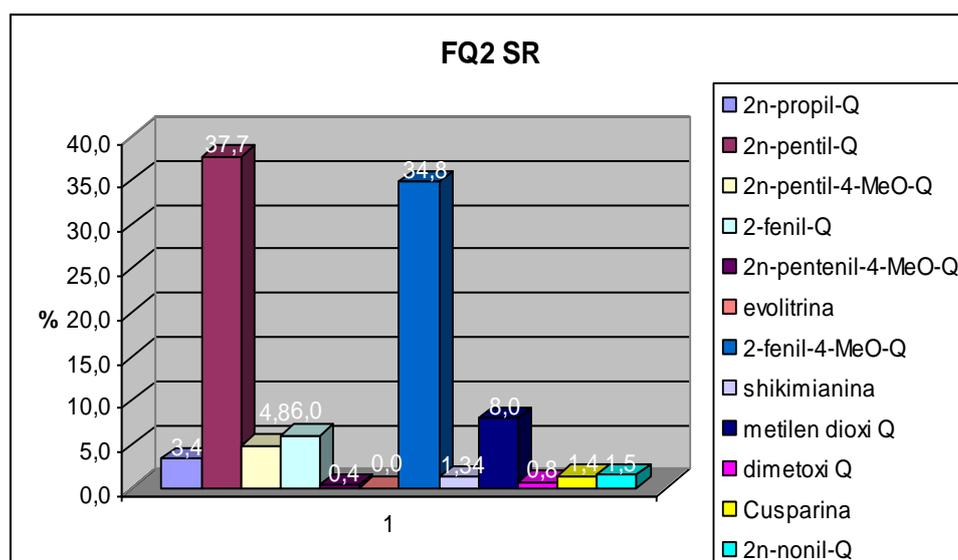
Se analizaron las muestras de FQ2 y FQ3 de 4 regiones: Santa Rosa (SR), Vencedores (VE), Covendo (CO), Yabanico (YA) del norte de La Paz tomando como referencia los resultados obtenidos en la universidad de La Laguna, Islas Canarias, España obteniendo:

El análisis por GC de la muestra FQ2 SR (Anexo 7)Tabla 15. Mostró una alta proporción de los alcaloides 2n-pentil-Quinolina (37.7%) y 2-fenil-4MeO-Quinolina (34.8%). Esta alta proporción es evidente en la Grafica 11.

Tabla 15. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 SR por CG.

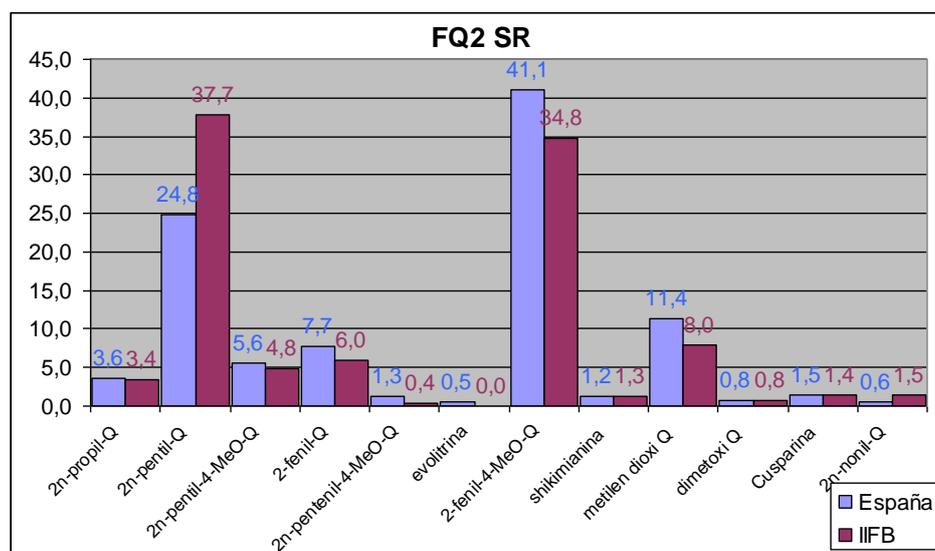
FQ2 SR			
GC-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	22,0	3123,3	3,4
2n-pentil-Q	27,0	34510,4	37,7
2n-pentil-4-MeO-Q	32,1	4420,5	4,8
2-fenil-Q	33,2	5447,5	6
2n-pentenil-4-MeO-Q	34,3	369,0	0,4
evolitrina	37,3	0,0	0
2-fenil-4-MeO-Q	38,1	31802,9	34,8
shikimanina	39,3	1226,3	1,3
metilen dioxi Q	41,6	7274,2	8
dimetoxi Q	42,3	689,7	0,8
Cusparina	45,1	1266,9	1,4
2n-nonil-Q	52,1	1351,8	1,5
		91482,6	100

Grafica 11. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 SR analizados por CG.



Los análisis realizados en España también muestran altas proporciones de 2n-pentil-Quinolina (24.8%) y 2-fenil-4-MeO-Quinolina (41.1%), como alcaloides mayoritarios.

Grafica 12. Comparación de los resultados de FQ2 SR analizados en España con los obtenidos en el IIFB.



En la muestra FQ2 VE (Anexo 8) es destacable la ausencia de uno de los alcaloides (2n-propil-Quinolina) Tabla 16. Que si esta presente en la muestra FQ2 VE analizada en España Grafica 13.

Aquí se puede evidenciar que existe diferencia en la proporción de alcaloides dependiendo de la región de colecta de Evanta.

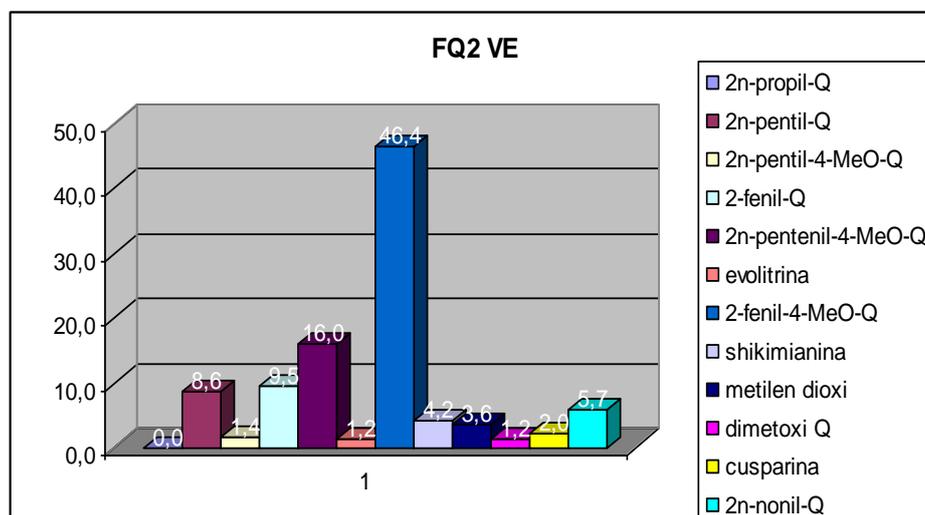
Tabla 16. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 VE por CG.

FQ2 VE			
GC-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	22	0	0
2n-pentil-Q	26,95	2109,2	8,6
2n-pentil-4-MeO-Q	32,11	353,4	1,4
2-fenil-Q	33,2	2331,2	9,5
2n-pentil-4-MeO-Q	34,32	3908,2	16
evolitrina	37,33	285,46	1,2
2-fenil-4-MeO-Q	38,08	11371	46,4
shikimanina	39,23	1031,5	4,2
utilen dioxi	41,52	893,62	3,6
dimetoxi Q	42,3	301,84	1,2
cusparina	45,04	500	2
2n-nonil-Q	52,21	1399,5	5,7
		24485	100

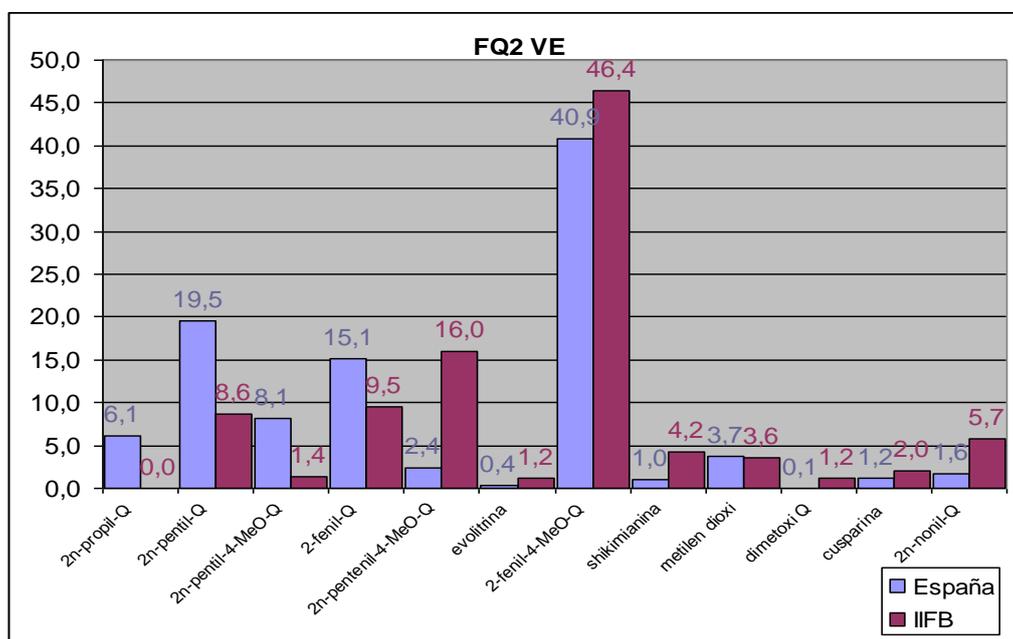
En la muestra de FQ2 VE el alcaloide mayoritario es la 2-fenil-4-MeO-Quinolina con 46.4%. La comparación con los resultados obtenidos en España muestran variaciones en el perfil Grafica 14. Variaciones que pueden ser atribuidas al tiempo de las muestras, por que, si

bien son las mismas muestras, no fueron analizadas juntas, las muestras primero se analizaron en España en mayo del 2008, las muestras analizadas en el IIFB se hicieron en los meses de septiembre y octubre del 2009.

Grafica 13. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 VE analizados por CG.



Grafica 14. Comparación de los resultados de FQ2 VE analizados en España con los obtenidos en el IIFB.

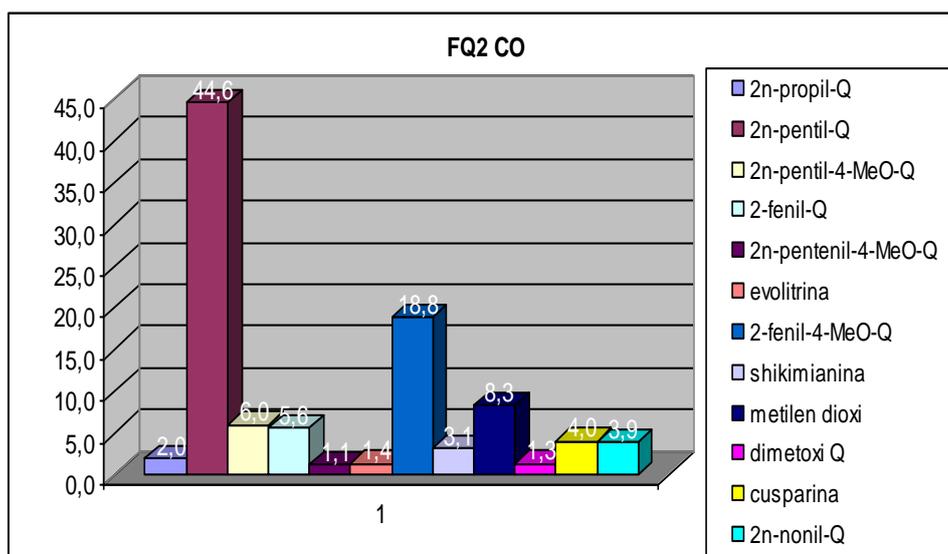


En la muestra FQ2 CO (Anexo 9) el alcaloide mayoritario es la 2n-pentil-Quinolina con 44.6% Tabla 17.

Tabla 17. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 CO por CG.

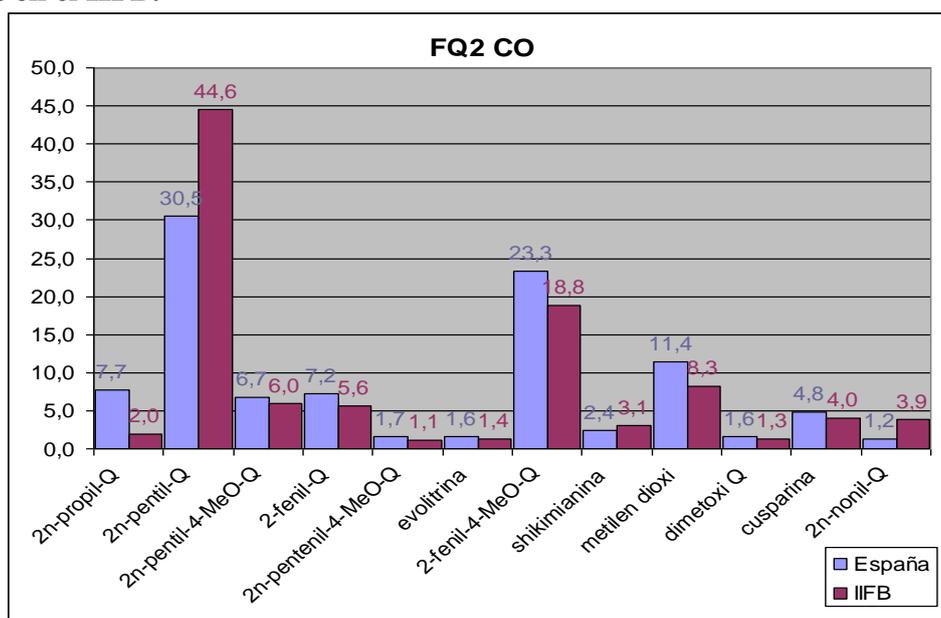
FQ2 CO			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	21,083	829,73	2
2n-pentil-Q	26,061	18770,1	44,6
2n-pentil-4-MeO-Q	31,089	2528,49	6
2-fenil-Q	32,207	2342,69	5,6
2n-pentenil-4-MeO-Q	33,255	476,89	1,1
evoltrina	35,873	571,36	1,4
2-fenil-4-MeO-Q	37,041	7935,99	18,8
shikimanina	38,249	1316,48	3,1
metilen dioxi	40,584	3478,65	8,3
dimetoxi Q	41,277	561,61	1,3
cusparina	44,396	1679,17	4
2n-nonil-Q	49,76	1627,76	3,9
		42119	100

Grafica 15. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 CO analizados por CG.



La comparación con los resultados de España muestran perfiles iguales en alcaloides, con algunas variaciones que se atribuyen al tiempo de las muestras.

Grafica 16. Comparación de los resultados de FQ2 CO analizados en España con los obtenidos en el IIFB.

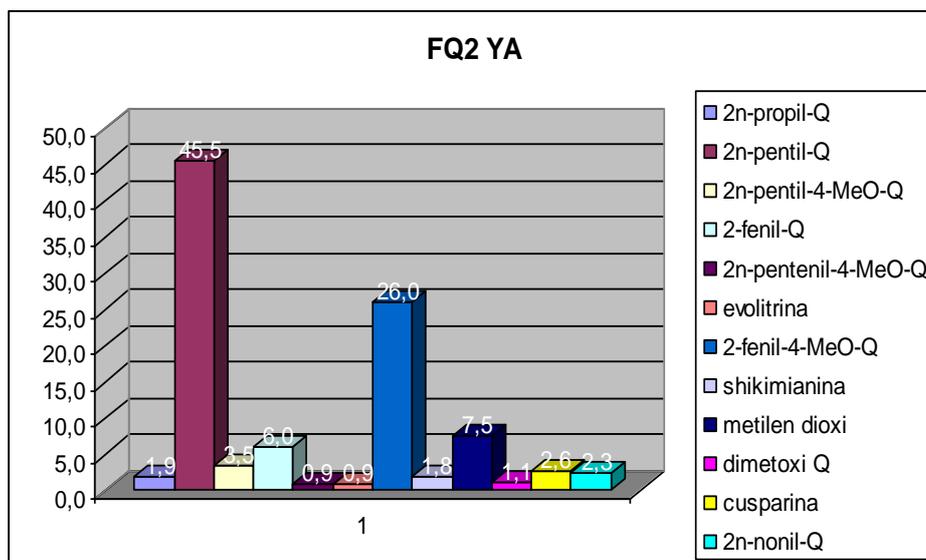


La muestra FQ2 YA (Anexo 10) muestran a la 2n-pentil-Quinolina como alcaloide mayoritario con 45.52% y la 2-fenil-4-MeO-Quinolina con 26.01% Tabla 18. Se obtuvo un perfil con todos los alcaloides que se tienen como referencia en los estudios de España, Grafica 17.

Tabla 18. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ2 YA por CG.

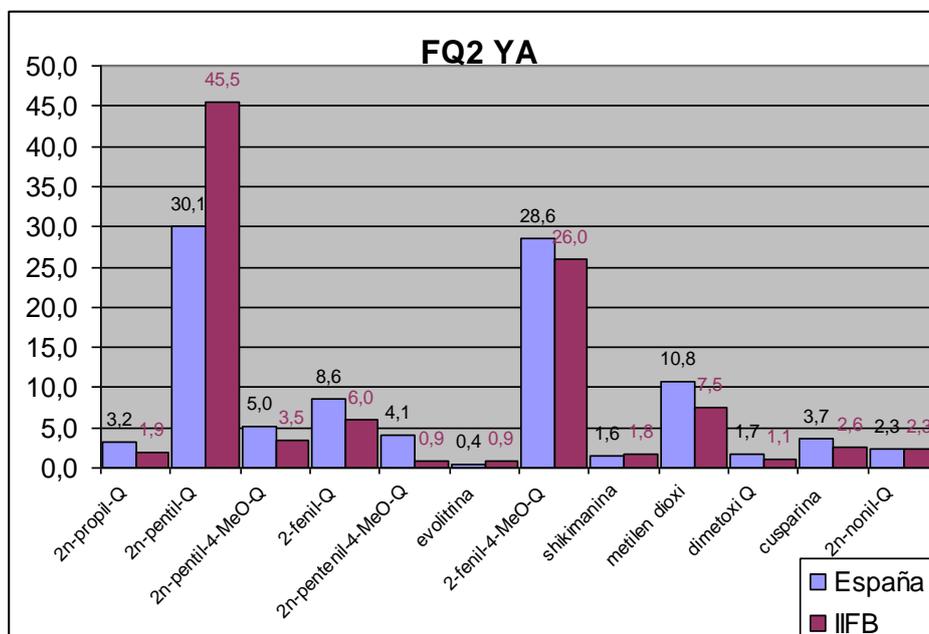
FQ2 YA			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	21,9	1016,3	1,9
2n-pentil-Q	27,1	24631,0	45,5
2n-pentil-4-MeO-Q	32,1	1870,7	3,5
2-fenil-Q	33,2	3270,2	6,0
2n-pentil-4-MeO-Q	34,3	461,4	0,9
evoltrina	37,1	512,3	1,0
2-fenil-4-MeO-Q	38,2	14072,0	26,0
shikimianina	39,2	981,9	1,8
metilen dioxi	41,6	4073,7	7,5
dimetoxi Q	42,3	579,1	1,1
cusparina	45,1	1392,2	2,6
2n-nonil-Q	52,2	1249,9	2,3
		54110	100

Grafica 17. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ2 YA analizados por CG.



Si bien se obtienen los mismos perfiles, existe variación en cuanto a proporción de los alcaloides, el alcaloide mayoritario en ambos es la 2n-pentil-Quinolina, la proporción varía en un 15%.

Grafica 18. Comparación de los resultados de FQ2 YA analizados en España con los obtenidos en el IIFB.



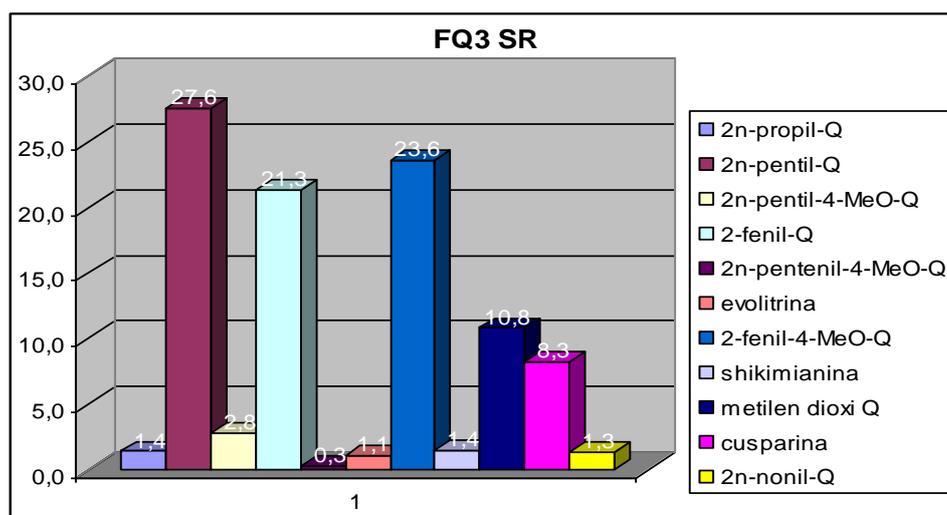
Comparación de los resultados de los análisis por cromatografía de gases (CG) realizadas en España con las realizadas en el IIFB de las fracciones FQ3.

En la Tabla 19 se muestra los tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la fracción FQ3 de la región de Santa Rosa (Anexo 11) y la distribución de los alcaloides encontrados en la Grafica 19. Se pueden observar 5 picos mayoritarios 2n-pentil-Quinolina con 27.6%, 2-fenil-Quinolina 21.3%, 2-fenil-4-MeO-Quinolina 23.6%, metilen dioxil quinolina con 10.8% y la cusparina con 8.3%. Comparando con los resultados de España observamos el mismo perfil de alcaloides, con variaciones en las proporciones que son atribuidas al tiempo de las muestra Grafica 20.

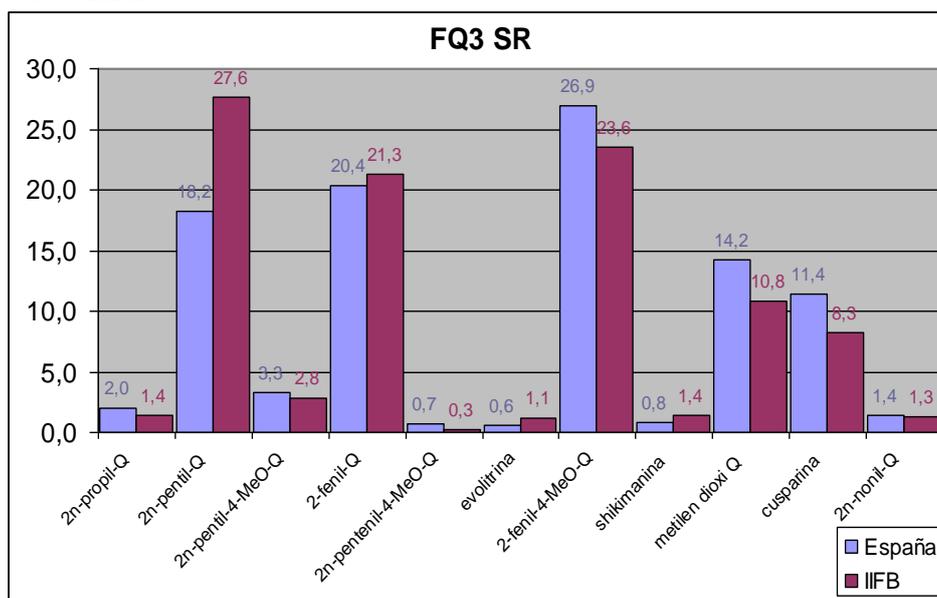
Tabla 19. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 SR por CG.

FQ3 SR			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	21,95	1600,96	1,4
2n-pentil-Q	26,92	31494,7	27,6
2n-pentil-4-MeO-Q	32,07	3199,63	2,8
2-fenil-Q	33,2	24301,3	21,3
2n-pentil-4-MeO-Q	34,28	333,14	0,3
evolitrina	37,31	1275,97	1,1
2-fenil-4-MeO-Q	37,99	26861,8	23,6
shikimianina	39,21	1634,21	1,4
metilen dioxil Q	41,59	12327,5	10,8
cusparina	45,12	9438,74	8,3
2n-nonil-Q	52,13	1479,07	1,3
		113947	100

Grafica 19. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 SR analizados por CG.



Grafica 20. Comparación de los resultados de FQ3 SR analizados en España con los obtenidos en el IIFB.

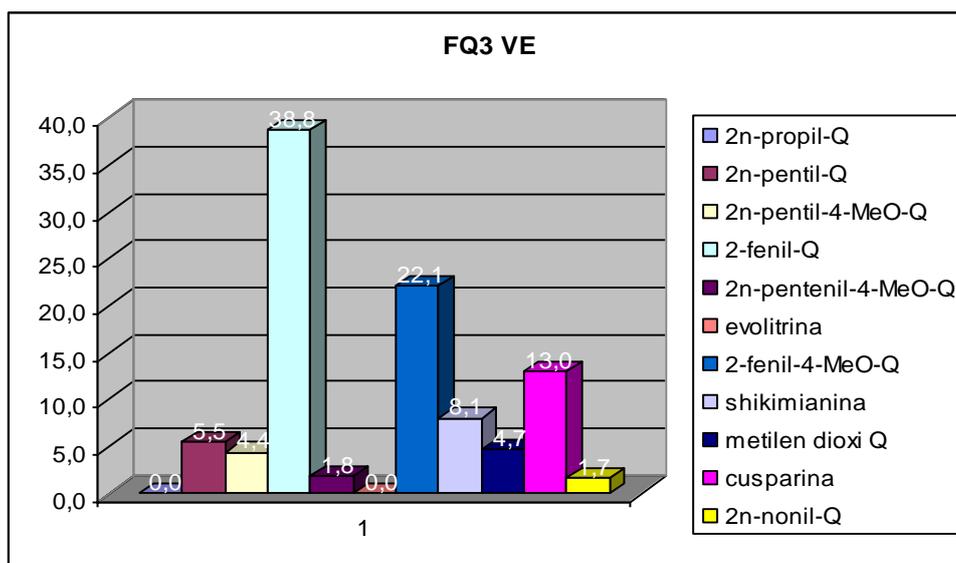


En la muestra FQ3 de la región de Vencedores (Anexo 12), se obtuvieron 3 picos de alcaloides como mayoritarios, la 2-fenil-quinolina con 38.8%, la 2-fenil-4-MeO-Quinolona Grafica 21, y la cusparina con 13%, También se observa que no hay 2n-Propil-Quinolona, En la comparación se repiten los perfiles de los alcaloides pero siempre hay una variación en la proporción Grafica 22.

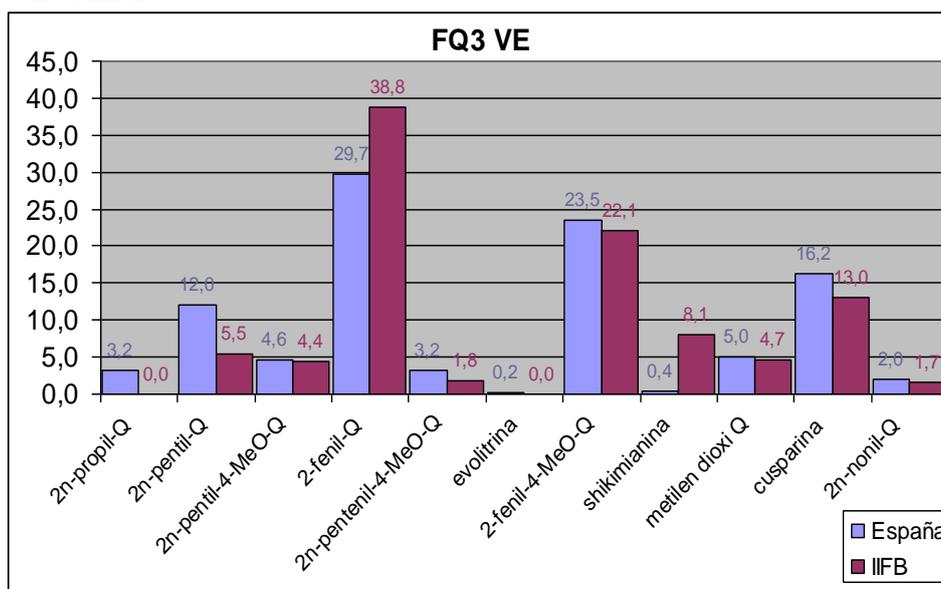
Tabla 20. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 VE por CG.

FQ3 VE			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	22,0	0,0	0,0
2n-pentil-Q	26,9	1255,9	5,5
2n-pentil-4-MeO-Q	32,1	1003,4	4,4
2-fenil-Q	33,2	8851,7	38,8
2n-pentil-4-MeO-Q	34,3	414,5	1,8
evoltrina	37,3	0,0	0,0
2-fenil-4-MeO-Q	38,0	5050,6	22,1
shikimianina	39,2	1840,0	8,1
metilen dioxi Q	41,5	1061,3	4,7
cusparina	45,2	2962,0	13,0
2n-nonil-Q	52,1	377,6	1,7
		22817,1	100

Grafica 21. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 VE analizados por CG.



Grafica 22. Comparación de los resultados de FQ3 VE analizados en España con los obtenidos en el IIFB.

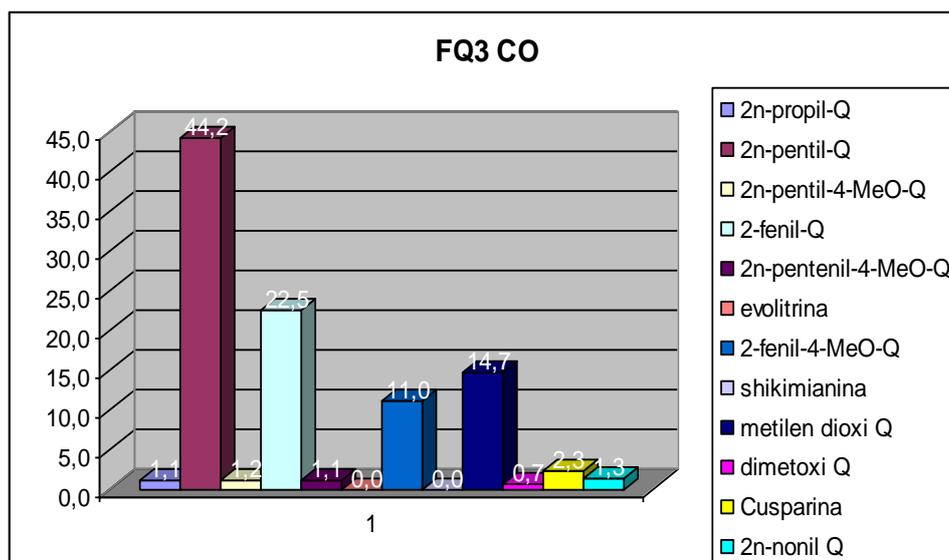


En la muestra FQ3 de la región de Covendo (Anexo 13), se observan 4 como los alcaloides mayoritarios determinados donde la 2n-pentil-Quinolina esta con 44.2%, la 2-fenil-Quinolina con 22.5%, la 2n-pentil-4-MeO-Quinolina con 11% y la metilen Dioxi-Quinolina con 14.7%, Grafica 23.

Tabla 21. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 CO por CG.

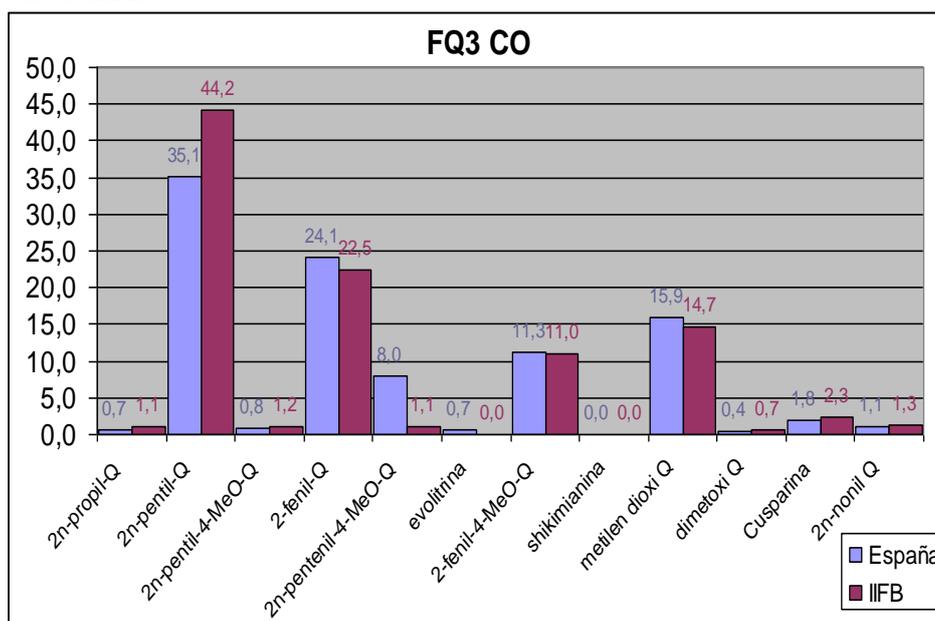
FQ3 CO			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	21,9	600,1	1,1
2n-pentil-Q	26,8	24168,0	44,2
2n-pentil-4-MeO-Q	32,0	634,4	1,2
2-fenil-Q	33,1	12297,0	22,5
2n-pentenil-4-MeO-Q	34,2	585,6	1,1
evolitrina	36,7	0,0	0,0
2-fenil-4-MeO-Q	37,8	6022,9	11,0
shikimianina	39,2	0,0	0,0
metilen dioxi Q	41,5	8059,8	14,7
dimetoxi Q	42,3	393,5	0,7
Cusparina	45,0	1241,6	2,3
2n-nonil Q	52,1	686,1	1,3
		54689	100

Grafica 23. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 CO analizados por CG.



El perfil de alcaloides obtenido es parecido a los resultados obtenidos en España Grafica 24. Siempre con variaciones debidas al tiempo de conservación de la muestra.

Grafica 24. Comparación de los resultados de FQ3 CO analizados en España con los obtenidos en el IIFB.

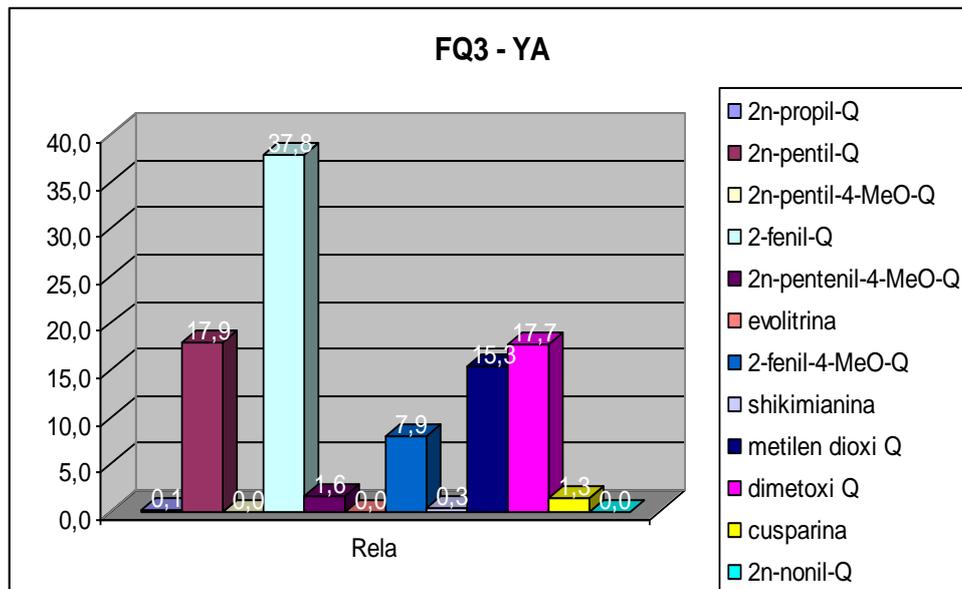


Las muestras de FQ3 de la región de Yabanico (Anexo 14) muestran como alcaloides mayoritarios a 4 picos, de ellos la 2-fenil-Quinolina esta 37,8%, 2n-pentil-Quinolina con 17.9%, la dimetoxi-Quinolina con 17.7% y la metilen dioxi-Quinolina con 15.3% Grafica 25.

Tabla 22. Tiempos de retención y áreas de los alcaloides encontrados en la muestra FQ3 YA por CG.

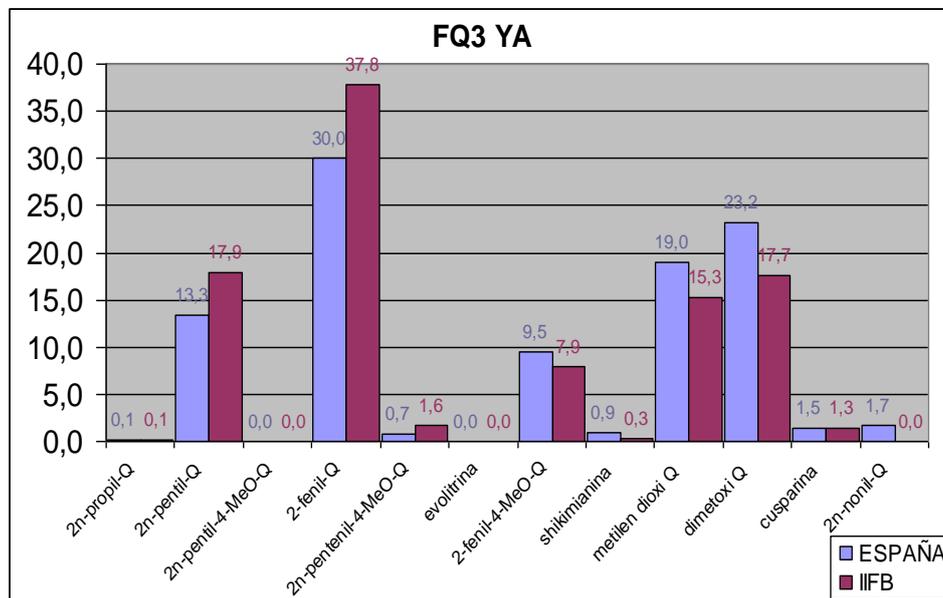
FQ3 YA			
CG-FID	T. Ret	A. Rela	Rela
2n-propil-Q	21,9	66,1	0,1
2n-pentil-Q	26,8	9231,5	17,9
2n-pentil-4-MeO-Q	32,1	0,0	0,0
2-fenil-Q	33,1	19457,2	37,8
2n-pentenil-4-MeO-Q	34,4	847,1	1,6
evolitrina	37,3	0,0	0,0
2-fenil-4-MeO-Q	37,8	4086,7	7,9
shikimianina	39,1	179,7	0,3
metilen dioxi Q	41,5	7872,8	15,3
dimetoxi Q	45,1	9093,5	17,7
cusparina	45,4	683,4	1,3
2n-nonil-Q	52,0	0,0	0,0
		51517,9	100

Grafica 25. Distribución de alcaloides encontrados en la fracción FQ3 YA analizados por CG.



Los resultados muestran perfiles parecidos, con proporciones que varían entre los alcaloides mayoritarios.

Grafica 26. Comparación de los resultados de la muestra FQ3 YA analizados en España con los obtenidos en el IIFB.



Los resultados muestran relación, comparando perfiles de alcaloides siempre se repiten los mayoritarios, pero no así las proporciones de estos, la variación de las proporciones podría deberse al tiempo que estas fueron almacenadas, si bien, en los análisis de España y los análisis del IIFB se trabajaron las mismas muestras, los análisis de España se realizaron en

mayo del 2008, los resultados obtenidos en el IIFB se realizaron en los meses de septiembre y octubre del 2009.

Estos resultados nos podrían ayudar a futuro, para analizar la estabilidad de los alcaloides en el tiempo solo por comparación de perfiles.

CONCLUSIONES

Se utilizó a la cromatografía de gases como método para el análisis del aceite de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), aceites esenciales de hojas y alcaloides de corteza de Evanta (*Galipea longiflora*).

Se determinó el perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) por cromatografía de gases, encontrando semejanzas con los reportados en estudios de Brasil y Suecia.

Los perfiles de ácidos grasos de Nuez de Brasil son diferentes para cada región. Es así, que el aceite de Nuez de Brasil colectada en la región de Bolivia es distinto en proporción de ácidos grasos a la del Brasil.

Se determinó que la cromatografía de gases es un buen método para el análisis de aceite de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*). Siendo un método sensible aun en bajas concentraciones, esta técnica puede ser utilizada para el control de calidad de este aceite. Al poder detectar productos que no formen parte del perfil de ácidos grasos de este aceite.

El aceite de Linaza contiene una gran cantidad de componentes que requieren de estudios químicos más profundos para poder establecer un perfil de sus componentes.

Se logró determinar el perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*) por cromatografía de gases. Utilizando como referencia la fracción HQ2 del extracto de alcaloides totales de hojas (HAT).

Se logró comparar el perfil de alcaloides presentes en el aceite esencial de Evanta (*Galipea longiflora*) con perfil de alcaloides totales de hojas (HAT) de Evanta (*Galipea longiflora*). Donde, ambas presentan un perfil igual de alcaloides, pero estos no están en la misma proporción.

Los aceites esenciales de evanta presentan actividad antiparasitaria contra promastigotes de leishmania con una IC50 de 16.0+/-2.3 ug/mL para *L.braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 y 35.5+/-3.1 ug/mL para *L.amazonensis* clon 1 MHOM/BR/76/LTB-012

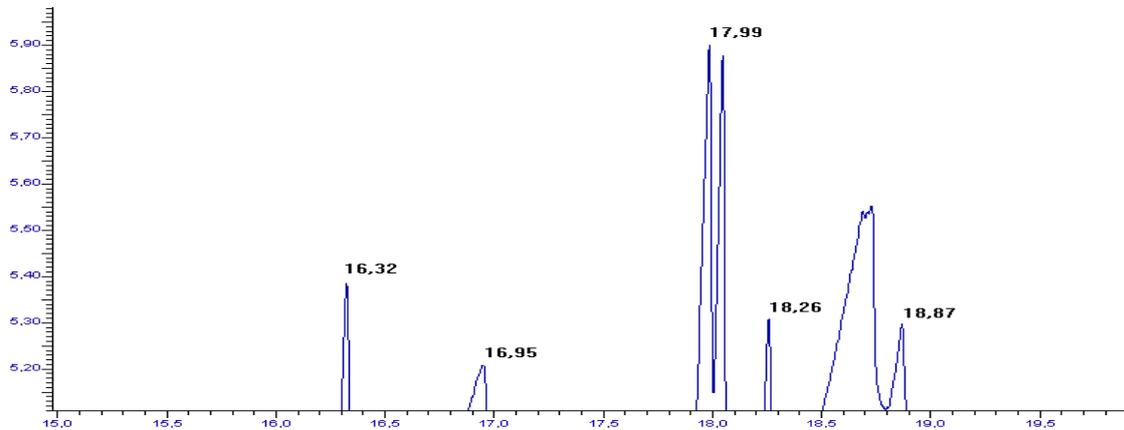
Se determino que la cromatografía de gases es un buen método para el análisis de aceites esenciales de Evanta (*Galipea longiflora*). Pero son necesarios más estudios sobre los constituyentes de este aceite, puesto que presentan más componentes y diferentes a los observados en HAT, y que no corresponden a los patrones aislados y caracterizados.

Se logro comparar el perfil de alcaloides presentes en las fracciones FQ2 y FQ3 obtenidos de alcaloides totales de corteza (CAT) de Evanta (*Galipea longiflora*) estudiados en España con los obtenidos en el IIFB. Estos muestran un perfil igual de alcaloides, pero la proporción de estos es distinta para algunos de los metabolitos, La variación en proporción puede ser atribuible al tiempo que las muestras pasaron almacenadas, pero se requieren realizar estudios datos sobre la estabilidad en relación al tiempo de los alcaloides.

En conclusión la cromatografía de gases es un método confiable en el análisis de aceites y otros metabolito provenientes de plantas.

ANEXOS.

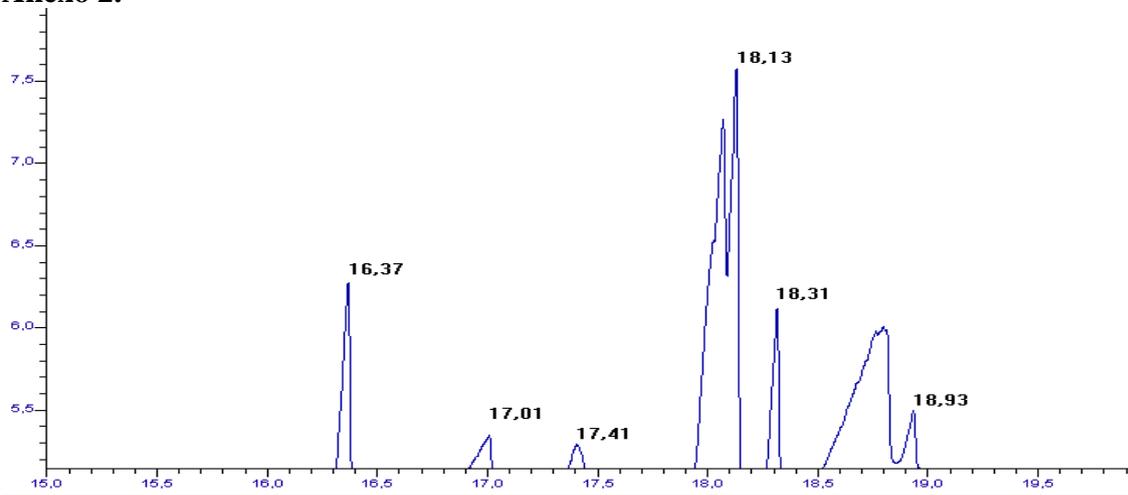
Anexo 1.



Aceite de castaña

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	16,323	763,88	407,97	11,33	11,33	1,8724	
2	16,949	1524,34	220,66	22,61	22,61	6,9082	
3	17,985	1968,56	776,24	29,19	29,19	2,5360	
4	18,047	1369,48	794,54	20,31	20,31	1,7236	
5	18,257	548,51	323,44	8,13	8,13	1,6959	
6	18,868	568,59	209,25	8,43	8,43	2,7172	
		6743,35	2732,10	100,00	100,00		

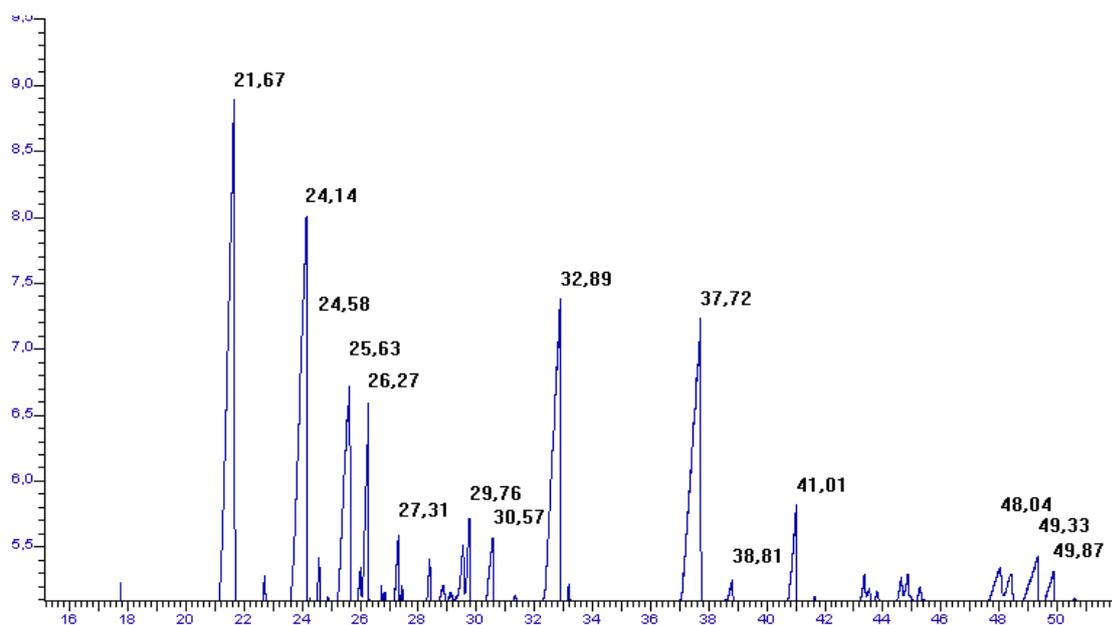
Anexo 2.



Aceite de castaña

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	16,368	3162,65	1296,72	23,80	23,80	2,4390	
2	17,008	1970,83	333,31	14,83	14,83	5,9129	
3	17,407	1179,80	277,75	8,88	8,88	4,2477	
4	18,132	3582,77	2010,49	26,96	26,96	1,7820	
5	18,315	2523,73	1140,45	18,99	18,99	2,2129	
6	18,935	869,39	350,70	6,54	6,54	2,4790	
		13289,17	5409,43	100,00	100,00		

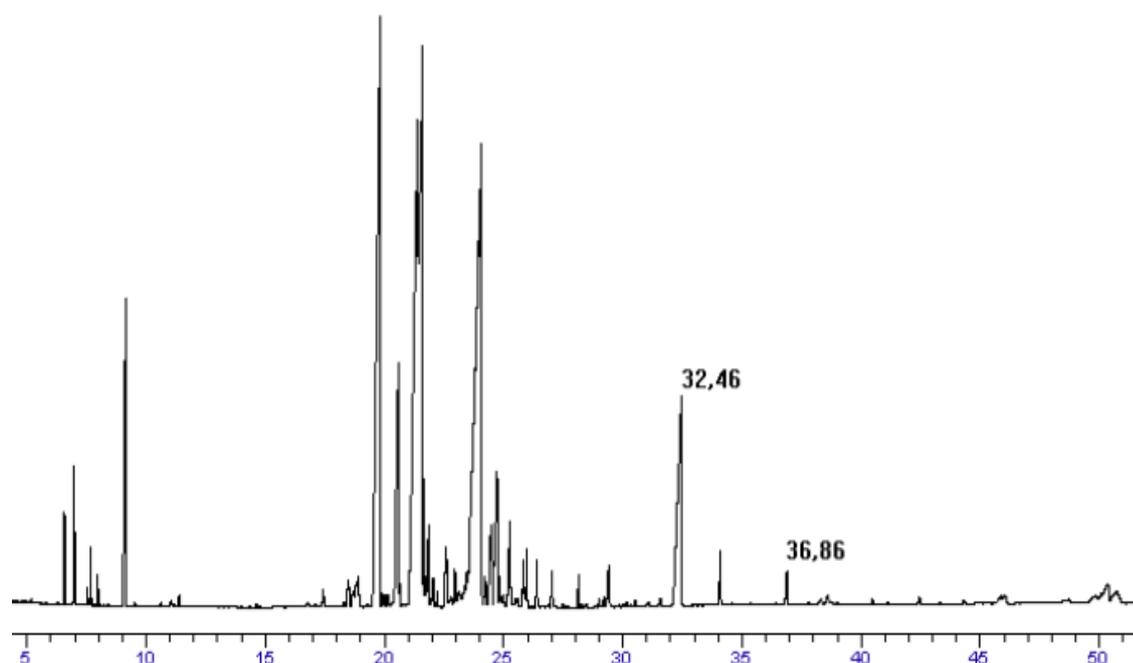
Anexo 5. HQ2



HQ2

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,667	59342,51	3878,10	22,07	22,07	15,3020	
2	24,140	48983,16	3000,98	18,22	18,22	16,3224	
3	24,581	1683,65	388,92	0,63	0,63	4,3291	
4	25,632	23932,88	1690,62	8,90	8,90	14,1563	
5	26,271	10024,66	1528,57	3,73	3,73	6,5582	
6	27,313	2647,99	529,67	1,06	1,06	5,3769	
7	29,763	7321,91	652,80	2,72	2,72	11,2162	
8	30,567	4592,90	508,10	1,71	1,71	9,0394	
9	32,885	39325,86	2340,97	14,63	14,63	16,7989	2-Fenilquinolina
10	37,716	44969,48	2199,23	16,73	16,73	20,4478	4-Metoxiquinolina
11	38,812	2296,13	215,70	0,85	0,85	10,6448	
12	41,008	6649,99	777,00	2,47	2,47	8,5585	
13	48,044	7471,82	274,84	2,78	2,78	27,1865	
14	49,327	6200,05	369,20	2,31	2,31	16,7930	
15	49,875	3200,65	264,36	1,19	1,19	12,1070	
		268843,64	18619,07	100,00	100,00		

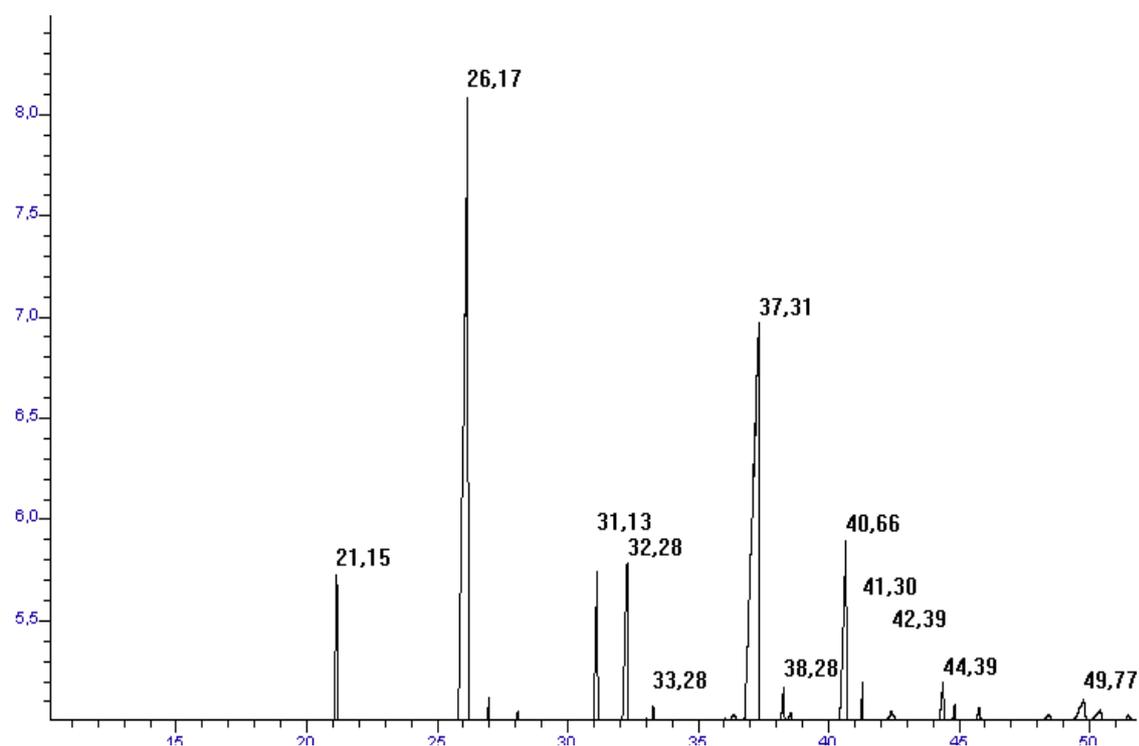
Anexo 6. Aceite



ACEITE DE EVANTA

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
1	6,571	1524,68	737,35	0,55	0,55	2,0678	
2	6,983	2511,10	1104,74	0,91	0,91	2,2730	
3	9,139	10102,84	2473,38	3,66	3,66	4,0846	
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
4	19,827	47311,52	4677,19	17,13	17,13	10,1154	
5	20,588	13528,23	1946,81	4,90	4,90	6,9489	
6	21,587	92588,01	4473,99	33,52	33,52	20,6947	
7	24,072	65900,55	3662,60	23,86	23,86	17,9929	
8	24,503	3885,91	632,79	1,41	1,41	6,1409	
9	24,723	6839,83	1044,01	2,48	2,48	6,5515	
10	24,836	511,42	204,45	0,19	0,19	2,5014	
11	25,251	3208,28	675,72	1,16	1,16	4,7480	
12	25,973	2922,83	462,93	1,06	1,06	6,3138	
13	26,399	1097,94	373,86	0,40	0,40	2,9367	
14	27,037	912,34	284,28	0,33	0,33	3,2093	
15	28,147	854,99	262,82	0,31	0,31	3,2531	
16	29,409	1522,32	321,64	0,55	0,55	4,7330	
17	32,461	18377,55	1684,98	6,65	6,65	10,9067	2-Fenilquinolina
18	34,097	1532,39	440,71	0,55	0,55	3,4771	
19	36,887	1086,16	272,88	0,39	0,39	3,9803	4-Metoxiquinolina
		276218,91	25737,12	100,00	100,00		

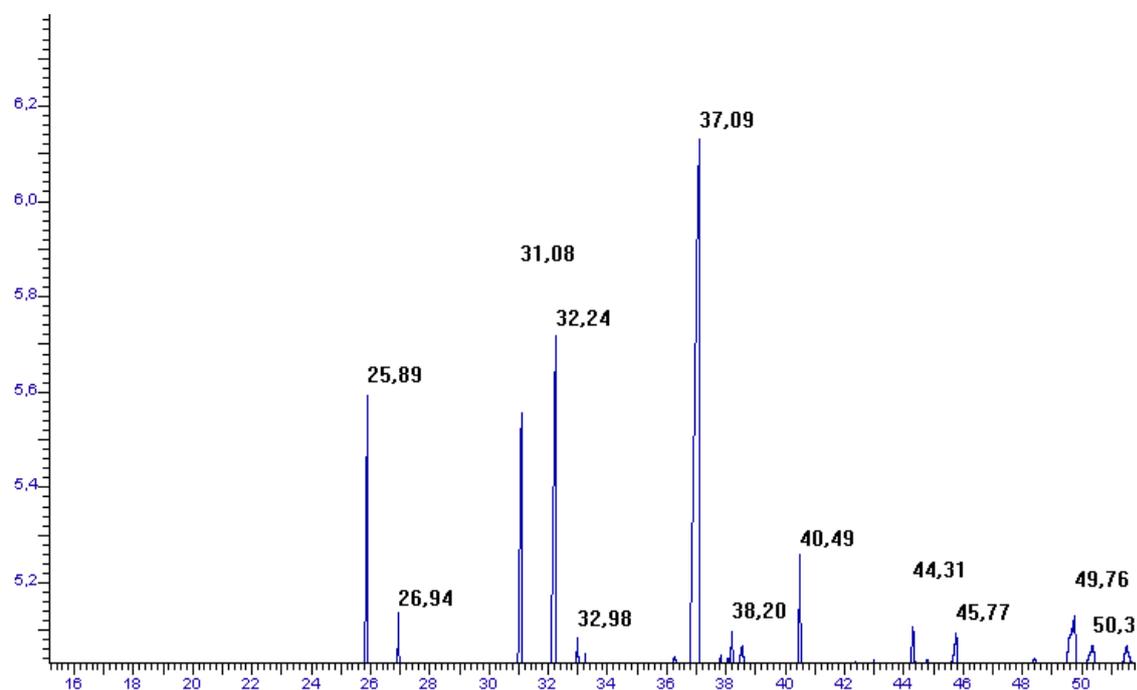
Anexo 7. FQ2 SR



FQ2 - SR

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,147	3123,28	758,76	3,38	3,38	4,1163	
2	26,173	34510,43	3104,01	37,38	37,38	11,1180	
3	31,129	4420,53	762,31	4,79	4,79	5,7988	
4	32,280	5447,52	798,72	5,90	5,90	6,8203	2-Fenilquinolina
5	33,277	369,03	90,48	0,40	0,40	4,0785	
6	37,309	31802,87	1984,75	34,45	34,45	16,0236	4-Metoxiquinolina
7	38,281	1226,31	173,61	1,33	1,33	7,0638	
8	40,661	7274,20	901,79	7,88	7,88	8,0664	
9	41,300	689,72	203,34	0,75	0,75	3,3919	
10	42,385	834,24	57,31	0,90	0,90	14,5565	
11	44,389	1266,89	197,93	1,37	1,37	6,4007	
12	49,769	1351,79	100,05	1,46	1,46	13,5111	
		92316,80	9133,06	100,00	100,00		

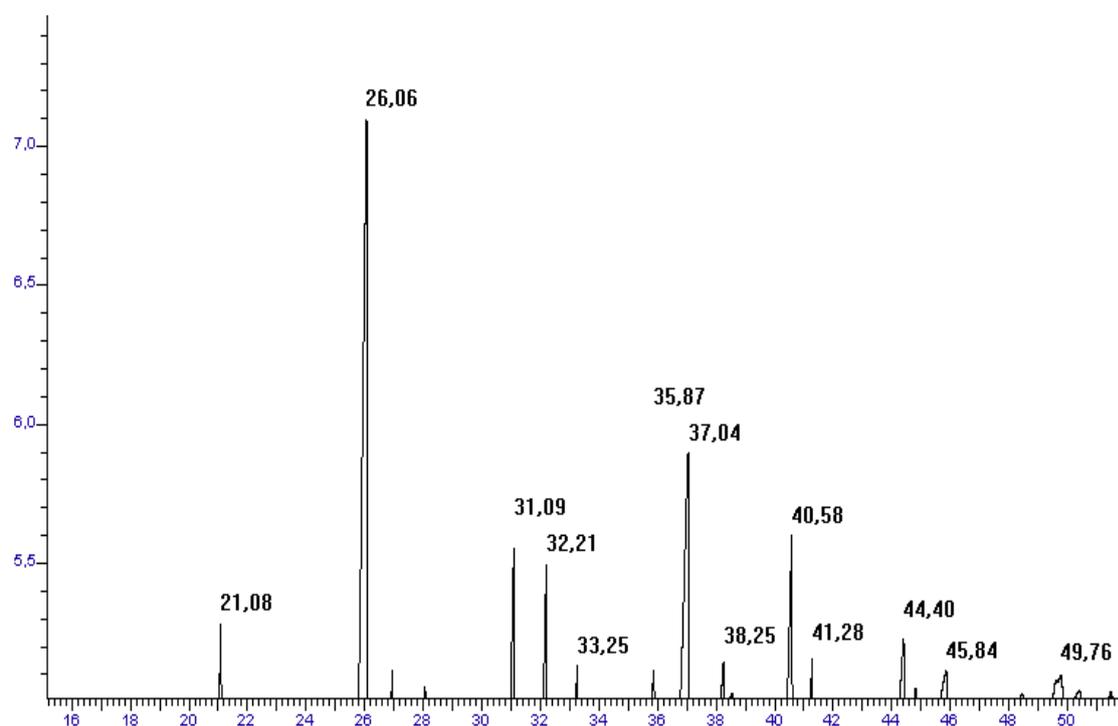
Anexo 8. FQ2 VE



FQ2 - VE

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	25,891	2109,20	590,93	8,61	8,61	3,5693	
2	26,941	353,40	128,79	1,44	1,44	2,7441	
3	31,089	2331,19	542,79	9,52	9,52	4,2948	
4	32,244	3908,21	709,65	15,96	15,96	5,5072	2-Fenilquinolina
5	32,984	285,46	71,51	1,17	1,17	3,9919	
6	37,095	11370,80	1116,78	46,44	46,44	10,1818	4-Metoxiquinolina
7	38,200	1031,49	80,20	4,21	4,21	12,8609	
8	40,495	893,62	250,23	3,65	3,65	3,5712	
9	44,309	301,84	74,82	1,23	1,23	4,0343	
10	45,767	500,00	72,04	2,04	2,04	6,9408	
11	49,757	1399,50	108,21	5,72	5,72	12,9331	
		24484,72	3745,94	100,00	100,00		

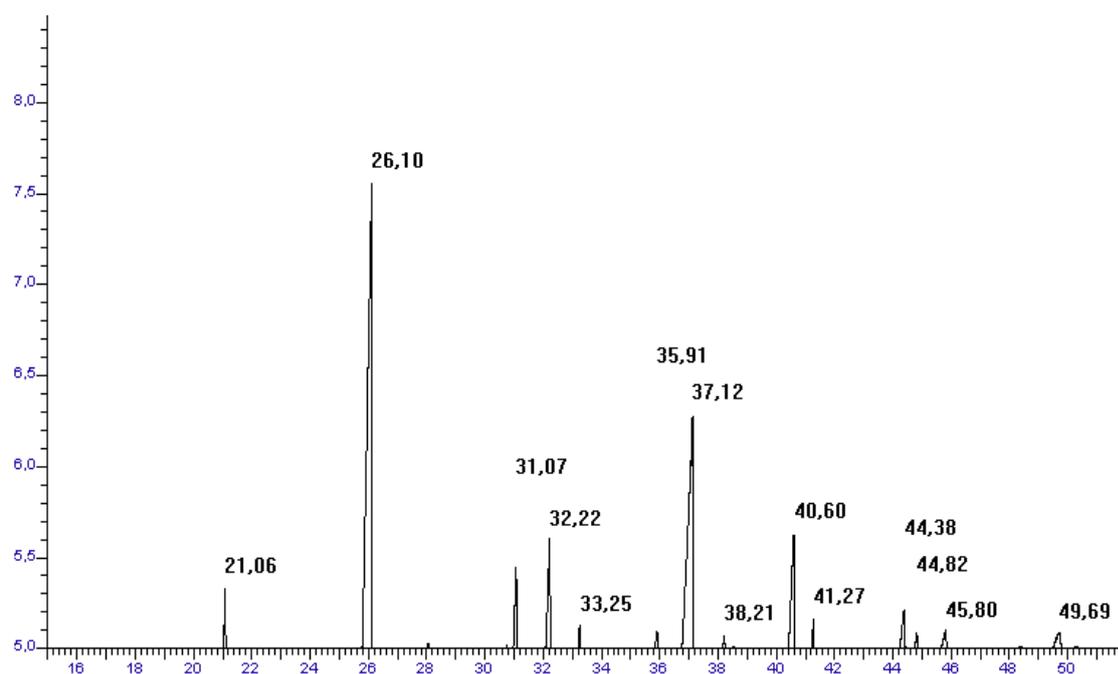
Anexo 9. FQ2 CO



FQ2 - CO

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,083	829,73	306,73	1,97	1,97	2,7050	
2	26,061	18770,13	2118,73	44,56	44,56	8,8591	
3	31,089	2528,49	587,09	6,00	6,00	4,3068	
4	32,207	2342,69	524,22	5,56	5,56	4,4689	2-Fenilquinolina
5	33,255	476,89	164,26	1,13	1,13	2,9033	
6	35,873	571,36	136,18	1,36	1,36	4,1957	
7	37,041	7935,99	917,65	18,84	18,84	8,6481	4-Metoxiquinolina
8	38,249	1316,48	162,67	3,13	3,13	8,0930	
9	40,584	3478,65	627,22	8,26	8,26	5,5461	
10	41,277	561,61	177,14	1,33	1,33	3,1704	
11	44,396	1679,17	258,13	3,99	3,99	6,5050	
12	49,760	1627,76	100,86	3,86	3,86	16,1387	
		42118,94	6080,89	100,00	100,00		

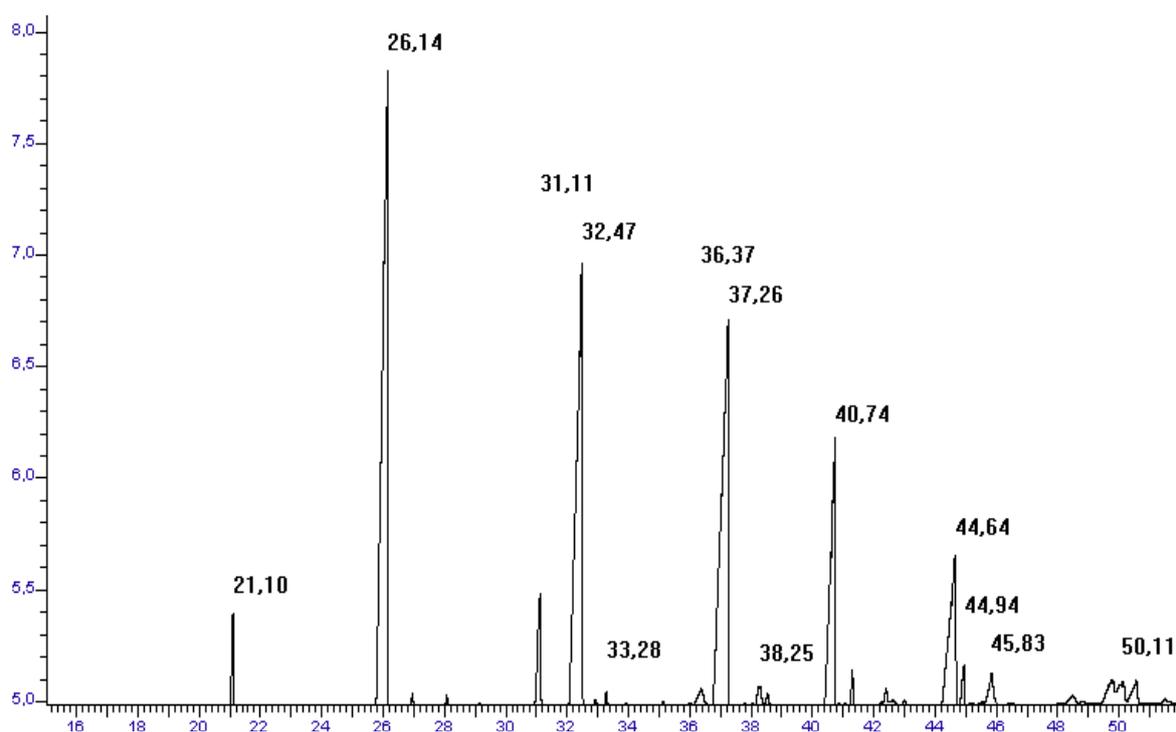
Anexo 10. FQ2 YA



FQ2 - YA

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,081	1016,33	365,75	1,84	1,84	2,7788	
2	26,103	24631,38	2595,28	44,51	44,51	9,4908	
3	31,067	1870,70	482,89	3,38	3,38	3,8740	
4	32,220	3270,15	636,73	5,91	5,91	5,1358	2-Fenilquinolina
5	33,248	461,38	158,71	0,83	0,83	2,9071	
6	35,908	512,26	115,81	0,93	0,93	4,4234	
7	37,123	14071,50	1296,71	25,43	25,43	10,8517	4-Metoxiquinolina
8	38,213	961,89	98,12	1,77	1,77	10,0070	
9	40,596	4073,74	650,13	7,36	7,36	6,2661	
10	41,273	579,10	184,63	1,05	1,05	3,1366	
11	44,381	1392,15	224,03	2,52	2,52	6,2140	
12	44,816	424,29	96,67	0,77	0,77	4,3889	
13	45,799	803,75	111,71	1,45	1,45	7,1949	
14	49,693	1249,90	96,68	2,26	2,26	12,9289	
		55338,53	7113,85	100,00	100,00		

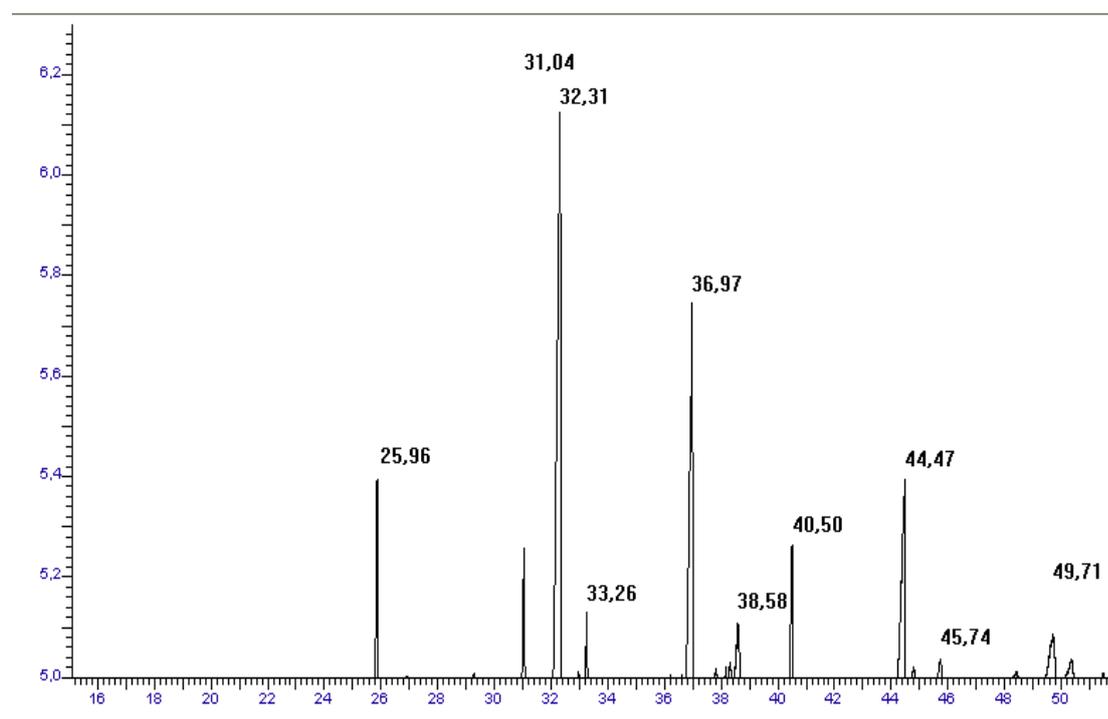
Anexo 11. FQ3 SR



FQ3 - SR

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,099	1600,96	435,37	1,34	1,34	3,6772	
2	26,136	31494,71	2854,24	26,41	26,41	11,0344	
3	31,112	3199,63	509,51	2,68	2,68	6,2798	
4	32,473	24301,29	1980,14	20,38	20,38	12,2725	2-Fenilquinolina
5	33,277	333,14	74,88	0,28	0,28	4,4487	
6	36,375	1275,97	80,58	1,07	1,07	15,8340	
7	37,263	26861,82	1734,31	22,52	22,52	15,4885	4-Metoxiquinolina
8	38,248	1634,21	93,29	1,37	1,37	17,5174	
9	40,739	12327,49	1205,48	10,34	10,34	10,2262	
10	44,637	9438,74	666,35	7,91	7,91	14,1649	
11	44,941	912,33	175,12	0,76	0,76	5,2099	
12	45,832	1479,07	139,43	1,24	1,24	10,6080	
13	49,729	4403,06	108,82	3,69	3,69	40,4631	
		119262,43	10057,52	100,00	100,00		

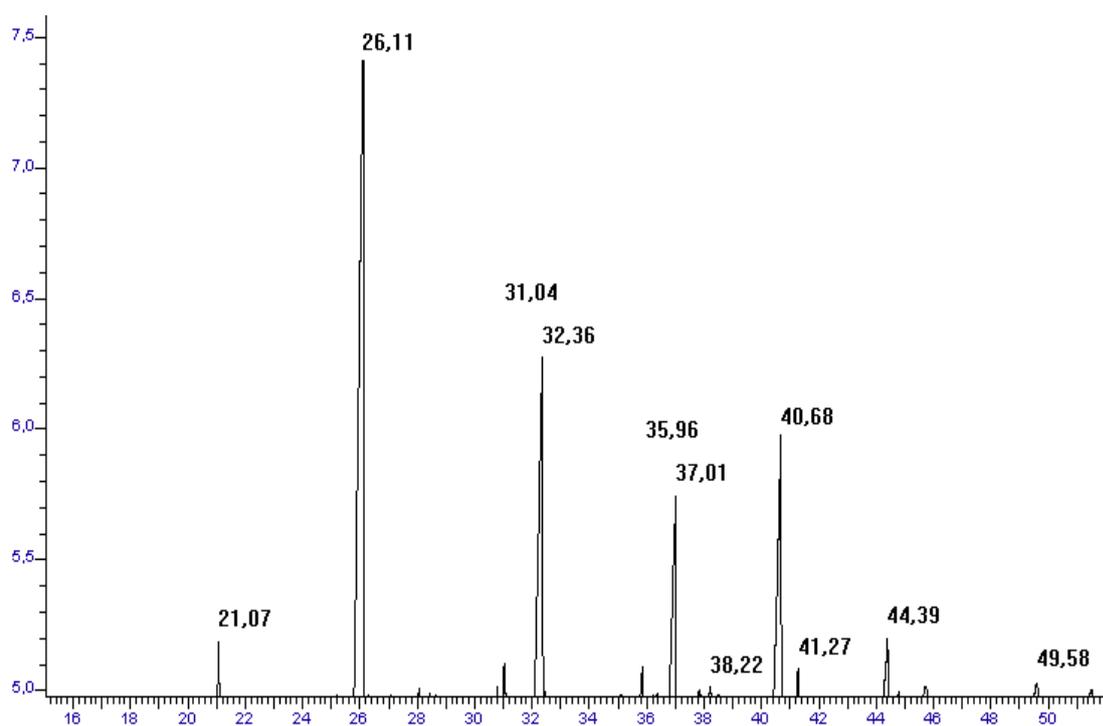
Anexo 12. FQ3 VE



FQ3 - VE

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	25,859	1255,93	412,44	5,22	5,22	3,0451	
2	31,043	1003,42	275,42	4,17	4,17	3,6432	
3	32,313	8851,71	1138,35	36,81	36,81	7,7759	2-Fenilquinolina
4	33,257	414,45	143,73	1,72	1,72	2,8835	
5	36,973	5050,63	753,20	21,00	21,00	6,7056	4-Metoxiquinolina
6	38,584	1840,00	128,12	7,65	7,65	14,3619	
7	40,500	1061,25	285,73	4,41	4,41	3,7142	
8	44,467	2962,04	394,09	12,32	12,32	7,5162	
9	45,743	377,64	48,52	1,57	1,57	7,7827	
10	49,712	1228,17	91,84	5,11	5,11	13,3737	
		24045,24	3671,44	100,00	100,00		

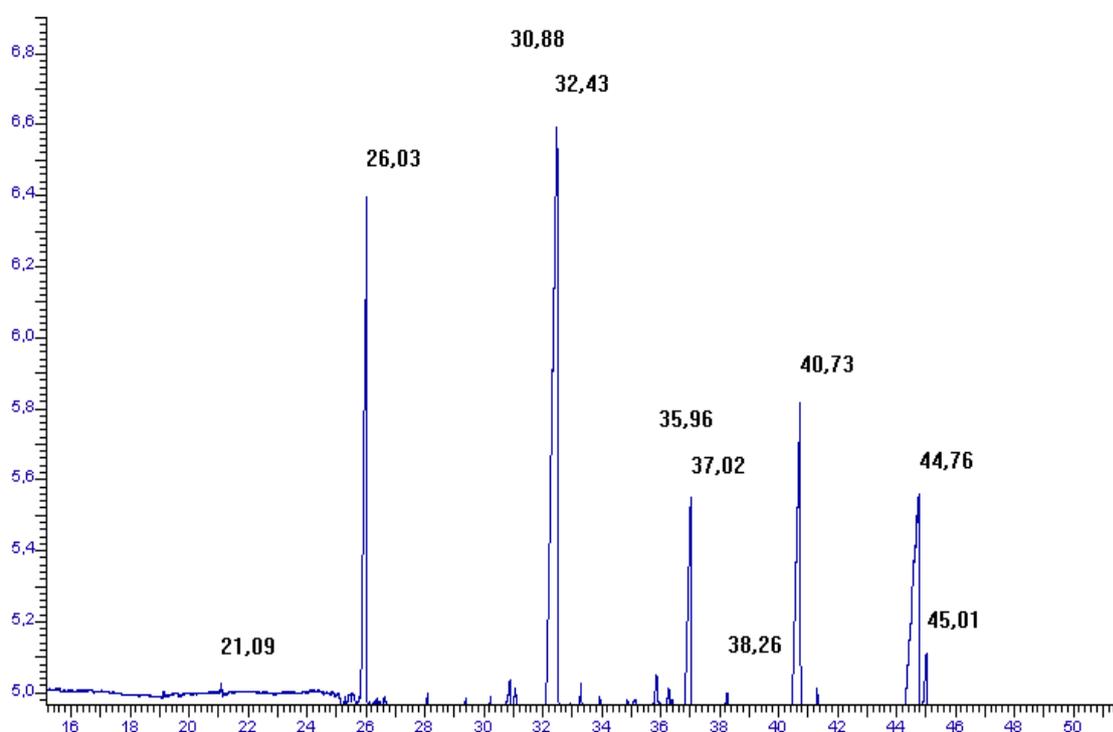
Anexo 13. FQ3 CO



FQ3 - CO

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,071	600,12	233,81	1,08	1,08	2,5667	
2	26,109	24167,52	2449,57	43,50	43,50	9,8660	
3	31,044	634,38	154,82	1,14	1,14	4,0976	
4	32,361	12297,26	1317,12	22,13	22,13	9,3365	2-Fenilquinolina
5	35,861	585,62	137,56	1,05	1,05	4,2571	
6	37,008	6022,94	788,56	10,84	10,84	7,6379	4-Metoxiquinolina
7	38,219	869,88	62,58	1,57	1,57	13,8996	
8	40,680	8059,84	1015,10	14,51	14,51	7,9399	
9	41,275	393,52	130,46	0,71	0,71	3,0164	
10	44,392	1241,57	231,98	2,23	2,23	5,3520	
11	49,584	686,14	71,87	1,23	1,23	9,5474	
		55558,79	6593,43	100,00	100,00		

Anexo 14. FQ3 YA



FQ3 - YA

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area/Height [s]	Component Name
-	13,601	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	Naftaleno
1	21,085	66,06	28,71	0,13	0,13	2,3007	
2	26,025	9231,51	1430,75	17,68	17,68	6,4522	
3	30,883	688,93	78,50	1,32	1,32	8,7758	
4	32,479	19457,20	1635,05	37,27	37,27	11,9001	2-Fenilquinolina
5	35,859	847,07	86,82	1,62	1,62	9,7563	
6	37,024	4086,68	593,58	7,83	7,83	6,8847	4-Metoxiquinolina
7	38,257	179,73	39,13	0,34	0,34	4,5931	
8	40,733	7872,79	873,37	15,08	15,08	9,0143	
9	44,760	9093,51	603,59	17,42	17,42	15,0657	
10	45,011	683,36	150,47	1,31	1,31	4,5415	
		52206,83	5519,98	100,00	100,00		