



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

***Estudio de composición química y posibles usos de las
semillas de Renealmia alpinia***

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Autor: Rodríguez Gaona, Melissa Antonella

Director: Malagón Avilés, Omar Germán

LOJA

2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 22 de julio de 2023

Magister

Claudia Teresa Cruz Erazo

Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Estudio de composición química y posibles usos de las semillas de *Renealmia alpinia* realizado por Melissa Antonella Rodríguez Gaona ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Omar Germán Malagón Áviles

C.I.: 1725761322

Correo electrónico: omalagon@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Melissa Antonella Rodríguez Gaona, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Estudio de composición química y posibles usos de las semillas de *Renalmia alpinia*, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico, Capítulo 2. Materiales y métodos, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Omar Germán Malagón Áviles director (a) del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Melissa Antonella Rodríguez Gaona

C.I.: 1105183816

Correo electrónico: marodriguez50@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios, por todas las bendiciones recibidas, por darme la fuerza para continuar día a día, por darme la voluntad de luchar por mis sueños, también a una persona que fue muy importante en mi vida mi abuelito paterno, quien me inculco los valores de la perseverancia y el amor por lo que uno hace, y que desde el cielo me dio la luz para enfrentarme a las etapas más difíciles de la vida.

A mis padres, pilares fundamentales en cada uno de mis logros, quienes con su amor y dulcera incondicional hicieron posible que hoy este cumpliendo mis metas, a mi hermana quien ha estado conmigo en este largo proceso dándome el aliento que necesito para no desistir.

A mi familia quienes a lo largo de mi vida me han inculcado los valores morales que me han hecho una mujer de bien, y me han apoyado en cada paso que he dado a largo de todo este proceso.

Finalmente, a John, demás amigos y allegados, quienes me han brindado su lealtad, su tiempo, y su presencia para no rendirme, ser una mejor persona, y servir con lo que hago a la sociedad.

Agradecimiento

Quiero agradecer a la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirme las puertas, y ofrecerme la oportunidad de poder formarme como una profesional, a su planta docente, por brindarme su tiempo, su bondad, y sus conocimientos.

A mis padres por todo su apoyo, su aliento, así como toda la fortaleza que me han dado a largo de mi vida, a mi querida hermana, por estar ahí impulsándome en cada una de mis metas, y estando a mi lado afrontando muchas dificultades.

También quiero brindar mis agradecimientos a mi familia, por todo el apoyo ofrecido, a mis amigas, amigos, y compañeros de carrera, con quienes he compartido muy gratas experiencias, a lo largo de todo este proceso académico.

Finalmente, al Ph. D Omar Malagón, por brindarme de su tiempo y paciencia, a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Índice de contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
Marco teórico	5
1.1 Familia Zingiberaceae.....	5
1.2 Género Renealmia.....	5
1.3 <i>Renealmia alpinia</i>	5
1.3.1 <i>Semillas de Renealmia alpinia</i>	7
1.3.2 <i>Usos y propiedades de las semillas de Renealmia alpinia</i>	7
1.4 Aceite vegetal y su composición	8
1.4.1 <i>Ácidos grasos</i>	8
1.4.2 <i>Materia insaponificable</i>	10
1.5 Extracción de aceites vegetales	10
1.5.1 <i>Extracción por método Soxhlet</i>	11
1.5.2 <i>Extracción en frío</i>	12

1.5.3 Extracción por maceración	12
1.6 Métodos para aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios	12
1.6.1 Cromatografía en capa fina	12
1.6.2 Cromatografía en columna	13
1.6.3 Cromatografía de gases	14
1.6.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	14
1.6.5 Cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de flama (FID).....	15
1.7 Elucidación estructural.....	16
1.7.1 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	16
1.8 Desarrollo de prototipo a partir de materias primas vegetales.....	17
Capítulo dos	18
Materiales y métodos.....	18
2.1 Recolección de la materia vegetal	18
2.2 Desección de las semillas de <i>Renealmia alpinia</i>	19
2.3 Extracción del aceite vegetal de las semillas de <i>Renealmia alpinia</i>.....	19
2.4 Análisis cualitativo.....	20
2.4.1 Proceso de transesterificación	21
2.5 Análisis cuantitativo	21
2.5.1 Curva de calibración	21
2.5.2 Evaluación de composición química a través de GC-FID	21
2.6 Aislamiento de metabolitos.....	22
2.6.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....	22
2.6.2 TLC preparativa.....	23
2.6.3 Aislamiento y elucidación estructural	25
2.7 Formulación de productos	25

Capítulo tres	26
Resultados y Discusión.....	26
3.1 Rendimiento del aceite vegetal y materia insaponificable	26
3.2 Composición química del aceite vegetal de las semillas de <i>Renealmia alpinia</i>	27
3.3 Identificación del compuesto aislado por RMN	29
3.4 Formulación del producto	33
3.4.1 Estandarización del principio activo	34
3.4.2 Preformulación de excipientes candidatos	36
3.4.3 Preformulación tentativa	37
3.4.4 Proceso de manufactura del producto elixir bucal.....	38
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Referencias	41
Apéndice.....	46
Apéndice A. Compuestos y ácidos grasos del aceite vegetal <i>Renealmia alpinia</i>	46
Apéndice B. Espectro ¹ H del compuesto 1 aislado	46
Apéndice C. Espectro ¹³ C del compuesto 1 aislado	47
Apéndice D. Espectro DEPT del compuesto 1 aislado.....	47
.....	47
Apéndice E. Espectro COSY del compuesto 1 aislado	48
Apéndice F. Espectro HMBC del compuesto 1 aislado	48
Apéndice G. Espectro HMQC del compuesto 1 aislado.....	49

Apéndice H. Espectro TOCSY del compuesto 1 aislado.....	49
Apéndice I. Conversión de 1µg/mL a %	50
Apéndice J. TLC en fase directa con hexano-acetato	50
Apéndice K. TLC en fase directa con hexano-diclorometano	52
Apéndice L. TLC en fase directa con hexano-acetona.....	53

Índice de tablas

Tabla 1 Rendimiento de los extractos del aceite vegetal de las semillas <i>Renealmia alpinia</i>	26
Tabla 2 Rendimiento de los extractos de la materia insaponificable de las semillas <i>Renealmia alpinia</i>	26
Tabla 3 Ácidos grasos de las semillas <i>Renealmia alpinia</i>	27
Tabla 4 Compuestos de las semillas <i>Renealmia alpinia</i>	28
Tabla 5 Análisis de ¹ H, ¹³ C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, TOCSY y ROESY del compuesto elucidado.	32
Tabla 6 Preformulación de excipientes candidatos para el producto elixir bucal.....	36
Tabla 7 Preformulación tentativa del producto elixir bucal	37

Índice de figuras

Figura 1 <i>Renealmia alpinia</i> (Zingiberaceae).....	6
Figura 2 Fruto maduro de <i>Renealmia alpinia</i>	7
Figura 3 Estructura química del ácido palmítico	9
Figura 4 Estructura química del ácido oleico	9
Figura 5 Estructura química del ácido linoleico	10

Figura 6 Método Soxhlet.....	11
Figura 7 Cromatografía en capa fina	13
Figura 8 Esquema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas 15	
Figura 9 Esquema de FID	16
Figura 10 Pueblos Shuar en la provincia de Morona Santiago.....	18
Figura 11 Semillas de Renealmia alpinia deshidratadas.....	19
Figura 12 Extracción del aceite vegetal por el método Soxhlet.....	19
Figura 13 Rotaevaporación de extractos	20
Figura 14 Cromatógrafo de gases thermo Scientific TRACE 1310.....	20
Figura 15 Purificación de muestras mediante cromatografía en capa fina (TLC)	22
Figura 16 Partición de muestra 3 con los disolventes metanol/hexano	23
Figura 17 Rotaevaporación de extracto metanólico.....	23
Figura 18 TLC preparativa sembrando 20 mg de muestra	24
Figura 19 Compuestos separados de la TLC preparativa.....	24
Figura 20 Purificación de muestras mediante cromatografía en capa fina (TLC)	25
Figura 21 Concentración de ácidos grasos del aceite vegetal de las semillas de Renealmia alpinia.....	28
Figura 22 Concentración de compuestos del aceite vegetal de las semillas de Renealmia alpinia.....	29
Figura 23 Estructura del compuesto aislado (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial	29
Figura 24 Proceso de estandarización del principio activo (E)-labda-8(17),12-diene-15,16dial.....	35

**Figura 25 Procedimiento de manufactura del producto elixir bucal de las semillas de
Renealmia alpinia..... 38**

Resumen

La especie *Renealmia alpinia*, que forma parte de la familia Zingiberaceae, se concentra principalmente en la región amazónica de Ecuador. Se caracteriza por tener una diversidad de propiedades beneficiosas para la salud del ser humano. En este proyecto de investigación, los extractos de las semillas fueron obtenidos mediante el método soxhlet, estudiándose la composición química, a través de un análisis cualitativo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GS-MS) y cuantitativo mediante el detector de ionización de llama (FID). En el aceite vegetal se encontraron 14 compuestos, con un total de 99.96%, 9 de ellos pertenecieron a ácidos grasos representando el 80.57% y 5 compuestos terpenos con una cantidad de 19.39%. El ácido más presente en el aceite vegetal es el oleico, representando el 35.56%. Además, se encuentran otros ácidos como el palmítico con 20.08%, palmitoleico con un 15.78%, linoleico 4.70%, y esteárico y linolénico con un 2.04%. Por la técnica espectroscópica (RMN) mediante elucidación estructural se identificó el compuesto (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial. Finalmente, con base en la presencia del compuesto aislado se formuló un producto en base a las características y propiedades estudiadas, siendo un elixir bucal el producto de elección.

Palabras clave: *Renealmia alpinia*, ácidos grasos, ácido oleico, (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, elixir bucal.

Abstract

The species *Renealmia alpinia*, which belongs to the Zingiberaceae family, is mainly concentrated in the Amazon region of Ecuador. It is characterized by having a diversity of beneficial properties for human health. In this research project, seed extracts were obtained using the Soxhlet method, and their chemical composition was studied through qualitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GS-MS) and quantitative analysis using the flame ionization detector (FID). Fourteen compounds were found in the vegetable oil, totaling 99.96%, with 9 of them belonging to fatty acids, representing 80.57%, and 5 terpene compounds accounting for 19.39%. The most abundant fatty acid in the vegetable oil was oleic acid, representing 35.56%. Other acids found include palmitic acid at 20.08%, palmitoleic acid at 15.78%, linoleic acid at 4.70%, and stearic and linolenic acids at 2.04%. The compound (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial was identified through structural elucidation using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Finally, based on the presence of the isolated compound, a product was formulated considering the studied characteristics and properties, resulting in an oral elixir as the chosen product.

Keywords: *Renealmia alpinia*, fat acid, oleic acid, (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, oral elixir.

Introducción

Ecuador, un país en vías de desarrollo, en donde la investigación de la eficiencia de productos agrícolas va en un crecimiento acelerado. Saber aprovechar los recursos alimenticios procedentes de la agricultura sostenible supone un avance para una economía sesgada a la producción petrolífera. Tomando en cuenta que Ecuador es una nación mega diversa en recursos vegetales, es factible postular que la planta *Renealmia alpinia*, procedente de la familia Zingiberaceae, cuya distribución se encuentra presente en varias comunidades de la región amazónica, puede convertirse en una especie potencial de la Amazonía para el consumo y desarrollo de nuevos productos de interés alimentario, entre otros (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014).

Renealmia alpinia es una planta cuyas características más notorias son; un tamaño de 2 a 6 metros, sus hojas presentan un perfil elíptico de 30 a 100 cm de largo por 15 cm de ancho, los frutos son compactos elipsoides de 1,5 a 3,5 cm caracterizados por un color rojizo en etapa joven a negrozco morado en etapa madura (Macía, 2003).

Acorde a su amplia distribución, se ha logrado conocer propiedades de interés médico, basados en la composición química de la planta, siendo los más primordiales los metabolitos secundarios seguidos de los ácidos grasos, diterpenos, sesquiterpenos, carotenoides, flavonoides, entre otros (Fernández, et al., 2010).

Haciendo hincapié en la importancia de las semillas de esta particular planta, se han determinado algunos compuestos como; flavonoides procedentes de la catequina y la naringenina. En adición, también se han encontrado diterpenoides clase labdano y diarilheptanoides (Escutia Monroy, 2021). Por consiguiente, los primeros compuestos y los diarilheptanoides son considerados compuestos fenólicos, siendo las propiedades antioxidantes las de más recurrente análisis, por ende, las semillas tienen una buena calidad de aplicación para la elaboración de insumos comestibles con alto grado de compuestos bioactivos (Luna, et al., 2018).

En la tribu indígena Chocoanos tradicionalmente, han empleado esta planta contra las picaduras de *Bothrops* una especie de serpiente venenosa y en medicina ha sido usado como antiemético, antipirético y muy eficiente contra infecciones fúngicas. En otras comunidades como Surinam, también se ha utilizado de manera tradicional para tratar la epilepsia (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014). Las semillas de esta planta son usadas para el desarrollo de productos comestibles, siendo la industria el sector quien aprovecha sus propiedades, principalmente en la elaboración de productos de aceites usados en frituras (Macía, 2003).

Este proyecto tiene como enfoque primordial analizar las semillas de *Renealmia alpinia* desde un punto deductivo, partiendo de parámetros generales en los cuales se engloban las características básicas de esta planta, para posteriormente seguir un proceso sistemático de análisis, en donde, nos centramos en el estudio de las semillas, y sus propiedades, para finalmente establecer las pautas para la elaboración de nuevos productos, con una tendencia natural.

Justificando que la importancia se centra en el aprovechamiento de los recursos naturales presentes en el Ecuador, de esta forma hacemos un óptimo uso de cada una de las herramientas puesta a nuestra disposición para el análisis químico tanto general como específico.

El objetivo primordial para el desarrollo de este proyecto es el de estudiar la composición química de la semilla de *Renealmia alpinia*, con el propósito de buscar nuevas alternativas de uso sustentable.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 Familia Zingiberaceae

La familia Zingiberaceae, es considerada una de las más grandes dentro del orden Zingiberales, se describen como plantas herbáceas con características perennes, rizomatosas, aromáticas, con hojas tipo dísticas (frágiles) o dispuestas en espiral en relación con el tallo, las flores se presentan de manera zigomorfas y las semillas contienen endospermo y arilo formado por una cobertura pulposa (Vovides, Rees, & Torres, 1999).

Está conformado por un grupo aproximado de 90 géneros subdivididos en 2000 especies, agrupadas en 8 familias, tiene una distribución pantropical, primordialmente repartidas en zonas selváticas de Asia y Sudamérica. Diversos ejemplares relacionados a esta familia contienen aceites aromáticos, con grandes aplicaciones para la medicina, perfumes y alimentación (Kress, Betancur, & Echeverry, 1999). Además, son conocidas por tener usos como especias, tinte y resinas (Escobar, 2012).

1.2 Género Renealmia

El género Renealmia presenta una marcada disposición en zonas con climas tropicales de América, Asia y África, constando con 85 especies, de las cuales 62 tienen presencia en el trópico americano incluyendo a Ecuador, su distribución se centra en la amazonia de zonas andinas (Macía, 2003). Son plantas robustas presentes en regiones de 2500 msm, son llamativas, conformadas por brácteas que varían de verdes a anaranjadas o rojas (León-Yáñez, et al., 2019).

Dentro de Ecuador se encuentran 6 géneros de Renealmia y 31 especies siendo las más importantes las siguientes; *Renealmia aurantifera*, *Renealmia dolichocalyx*, *Renealmia oligotricha*, *Renealmia sessilifolia* y *Renealmia alpinia* (León-Yáñez, et al., 2019).

1.3 *Renealmia alpinia*

Conocida coloquialmente como guaiporé, jazmín de monte, mantadrea o pintura negra, es una especie con una propagación proporcional a la generación de vástagos a partir de su rizoma. Tiene una estructura herbácea musoide, con una altura promedio de 6 m,

presenta un olor conforáceo y hojas elípticas de 30 a 100 cm de largo por 5 a 18 cm de ancho, las cuales se caracterizan por tener un color rojizo en las nervaduras (Figura 1) (Alarcón et al., 2008).

Los frutos, son cápsulas de forma elipsoides que miden de 1,5 a 3,5 cm caracterizados por un color rojizo en etapa joven a negruzco morado en etapa madura, poseen numerosas semillas incrustadas en una pulpa de color amarillo y las flores por lo general son de color rosado (Alarcón, et al., 2008).

Figura 1

Renealmia alpinia (Zingiberaceae)



Nota. Adaptado de Flickr *Renealmia alpinia* [Figura 1], por Yakovlev, 2007.

Renealmia alpinia se la usa de manera tradicional en la tribu indígena de Chocó, principalmente para las picaduras de serpientes del género *Bothrops*. En la medicina convencional se la emplea como antiemético para tratar úlceras malignas, antipirético para controlar la fiebre, antifúngico para infecciones por hongos y en las tribus de Surinam es utilizada para tratamientos de la epilepsia (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014).

Asimismo, la decocción de la planta entera incluida su tallo y raíces, sirve para curar infecciones vaginales y dolor de estómago (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014).

Las vainas de las hojas son usadas en los cultivos para evitar que los roedores se coman el maíz (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014).

1.3.1 Semillas de *Renealmia alpinia*

Los frutos de la especie *Renealmia alpinia*, se caracterizan por ser de color rojo en estado de inmadurez y negros cuando están maduros, en el interior se encuentra una gran cantidad de semillas que varían de 100 a 200, son de color negro, están rodeadas por una pulpa de color amarillo y representan el 70% del peso total del fruto (Figura 2) (Guevara, et al.,2017).

Figura 2

*Fruto maduro de *Renealmia alpinia**



Nota. Adaptado de Obtención, evaluación de pigmentos micro encapsulados a partir de frutos xkijit (*Renealmia alpinia*) e incorporación en una matriz alimentaria [Figura 2], por Jiménez, 2018.

1.3.2 Usos y propiedades de las semillas de *Renealmia alpinia*

Las semillas son usadas como preparados de aceites y condimentos para el consumo humano y se pueden elaborar bebidas alcohólicas a partir de la maceración en conjunto con otras especies como: *Juniperus communis* conocida como enebro y las semillas de cilantro (Escutia Monroy, 2021).

De igual manera, se utilizan como semillas comestibles para combatir las náuseas y vómitos (Gómez-Betancur & Benjumea, 2014).

En cuanto a sus propiedades, las semillas son antioxidantes, por lo tanto, pueden ser utilizadas para preparar productos ricos en compuestos bioactivos. Además, de acuerdo a los metabolitos secundarios aislados se ha clasificado como antiinflamatorios, antitrombóticos, cardioprotectores, antimicrobianos y vasodilatadores (Escutia Monroy, 2021).

1.4 Aceite vegetal y su composición

Los aceites vegetales han sido utilizados desde la antigüedad por los seres humanos, principalmente como fuentes de alimento, combustibles, etc. Los elementos primordiales de estos compuestos son los triésteres de ácidos grasos y el glicerol denominados triglicéridos, un aceite vegetal puede estar conformado por un solo tipo de triglicéridos o por una cadena de estos (Durán, Torres, & Sanhueza, 2015).

Si la mezcla de un aceite vegetal es de composición sólida, a una temperatura ambiente, se describe como una grasa, pero si dicha composición presenta una consistencia líquida es denominada como un aceite, por consiguiente, grasas y aceites se consideran iguales químicamente, pero diferentes por su apariencia física (Durán, Torres, & Sanhueza, 2015).

En base a su composición es importante su aplicabilidad para el uso por parte de los seres humanos, como lo es en el caso de los aceites con alta concentración de ácidos grasos mono y polinsaturados, ya que son más propensos al proceso de oxidación por la presencia de oxígeno a altas temperaturas (Durán, Torres, & Sanhueza, 2015).

Los aceites vegetales se obtienen de semillas o frijoles, mediante los métodos de prensado o por extracción con hexano (Gunstone, 2011).

1.4.1 Ácidos grasos

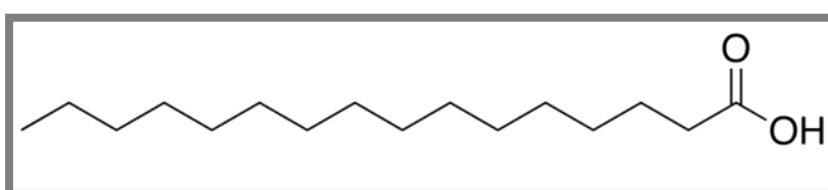
Los ácidos grasos son considerados uno de los primordiales componentes de los aceites, de las grasas de depósito y de las grasas alimentarias. Están formados por el 76% de carbono, el 12,7 % de hidrógeno y el 11,3 % de oxígeno, en el extremo de la cadena presenta un grupo carboxilo -COOH, mientras que en el otro extremo se encuentra el metilo

-CH₃. Se clasifica en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Guzmán, 2011).

Los ácidos grasos saturados presentan enlaces sencillos entre los átomos de carbono, se caracterizan por ser sólidos a temperatura ambiente y predominan las grasas de origen animal (Guzmán, 2011). Un claro ejemplo es el ácido palmítico (Figura 3), butírico, láurico, esteárico, araquidónico, entre otros.

Figura 3

Estructura química del ácido palmítico

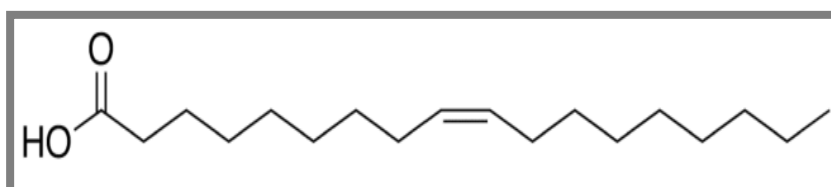


Nota. Adaptado de Productos naturales del zoapatl [Figura 3], por Caballero & Walls, 2015.

Los ácidos grasos monoinsaturados tienen un doble enlace y se encuentran en el aceite de oliva. Por ejemplo: el ácido oleico (Figura 4) (Carbajal, 2018).

Figura 4

Estructura química del ácido oleico

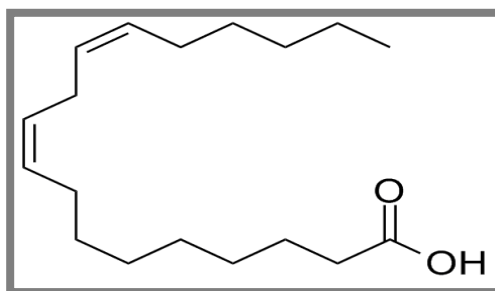


Nota. Adaptado de Productos naturales del zoapatl [Figura 4], por Caballero & Walls, 2015.

Los ácidos grasos poliinsaturados poseen de dos a más dobles enlaces y están presentes en mayor cantidad en los aceites de origen vegetal. Un ejemplo es el ácido linoleico (Figura 5) (Carbajal, 2018).

Figura 5

Estructura química del ácido linoleico



Nota. Adaptado de Productos naturales del zoapatl [Figura 5], por Caballero & Walls, 2015.

1.4.2 Materia insaponificable

La materia insaponificable hace referencia a todas las sustancias que se encuentran disueltas en aceites y grasas, no pueden ser saponificadas por el tratamiento cáustico usual, sin embargo, son solubles en solventes ordinarios de aceites y grasas. Dentro de este grupo se encuentra los esteroides, hidrocarburos, los pigmentos y alcoholes alifáticos altos (Gupta, 2017).

Los compuestos que forman parte de la materia insaponificable de los aceites vegetales son: tocoferoles, fosfolípidos, carotenoides, tocotrienoles, escualeno, etc. Por consiguiente, se considera que los tocoferoles y los carotenos, tienen propiedades antioxidantes que logran estabilizar el aceite con la oxidación. Por otro lado, durante la refinación, se pueden perder algunos compuestos de gran valor y las cantidades aisladas de aceites refinados dependerá de las condiciones de purificación (Gunstone, 2011).

1.5 Extracción de aceites vegetales

Los aceites vegetales se pueden extraer mediante la aplicación de diferentes métodos, siendo los más importantes el prensado, donde el material vegetal es comprimido mecánicamente con la finalidad de liberar el aceite, para ser recalentado y finalmente filtrado (Cosío, Álvarez, & Meléndez, 2012).

Otro método de extracción es con solvente, el cual es capaz de extraer una gran cantidad de aceite especialmente de semillas, es un método rápido con un elevado costo debido al equipo y los solventes usados (Rojas, 2019).

1.5.1 Extracción por método Soxhlet

La extracción por el método de Soxhlet ha sido y continúa siendo uno de los métodos más utilizados, este se basa en extraer una muestra haciendo uso de un disolvente, cuyo propósito es analizar el contenido de grasas de una manera cualitativa y cuantitativa, mediante cromatografía de gases (GC) u otros equipos relevantes (Nielsen, 2009).

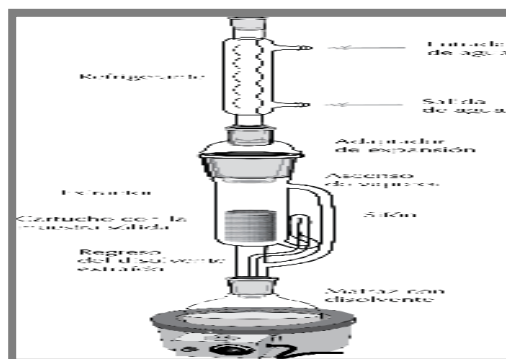
Previamente, pesada la muestra con la que se va a realizar la extracción y colocando el disolvente en el balón, este último se procede a calentar a una temperatura la cual dependerá del punto de ebullición de cada reactivo (Figura 6) (Nielsen, 2009).

Una vez calentado, se evapora el disolvente y se condensa cubriendo la muestra. El disolvente emperezara a caer gota por gota sobre la muestra la cual termina cubriendo en un tiempo estimado de 10 a 20 minutos (Nielsen, 2009).

Una de sus mayores ventajas es que la extracción se encuentra en contacto directo con el disolvente por lo que permite que los analitos a analizar tengan una mejor solubilidad. Sin embargo, una de sus mayores desventajas es que los intervalos de tiempo suelen tener una extensa duración siendo periodos de 8 a 12 horas los más comunes. (Matissek, 2005).

Figura 6

Método Soxhlet



Nota. Adaptado de Recursos Educativos de Química [Figura 6], por Ritter, 2022

1.5.2 Extracción en frío

Es un método mecánico donde no se utiliza ningún proceso químico. Se recomienda tener una temperatura baja porque la calidad es mucho mejor, de igual manera, no debe pasar los 27 °C, ya que se puede reducir la viscosidad y, por ende, se perderá la mayor cantidad de propiedades, aromas y sabor (García, 2021).

Este proceso no es muy recomendable, por su bajo rendimiento, sin embargo, garantiza un aceite vegetal de máxima calidad, sin defectos en los aromas y sabores (García, 2021).

1.5.3 Extracción por maceración

El proceso de maceración es uno de los métodos más convencionales, el cual consiste en colocar la muestra directamente con el solvente, durante ciertos intervalos de tiempo determinados. El disolvente puede ser agua, alcoholes o una mezcla de ambos (Duarte, et al., 2020).

La eficiencia depende sobre todo de las condiciones o parámetros a trabajar. Por otro lado, la maceración dinámica favorece la difusión de sustancias bioactivas en el solvente (Duarte, et al., 2020).

El macerado es proporcional a ciertos factores como; el tiempo, la cantidad de líquido, y la temperatura a la que se encuentra (Duarte, et al., 2020).

1.6 Métodos para aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son el resultado de plantas, bacterias y hongos, se biosintetizan como compuestos que presentan una diversidad estructural como: flavonoides, benzoquinonas, cumarinas, alcaloides, tetraciclinas, glucósidos, etc. El uso de equipos ha permitido en gran medida la caracterización de metabolitos secundarios, principalmente a través de resonancia magnética nuclear (RMN) (Rojas, 2019).

1.6.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC), consiste en un método el cual permite la separación y la identificación de sustancias en una determinada mezcla de solutos, la capa

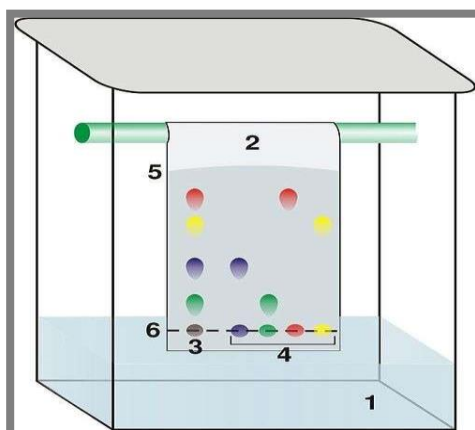
fina se encuentra formada por gel de sílice (óxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio) y finalmente celulosa (Mallitasig & Rivera, 2012).

Es un método completamente analítico, se usan porcentajes muy pequeños de sustancias a analizar, las láminas de cromatografía en capa fina tienen un soporte rígido de material de vidrio, aluminio, o celulosa, en el cual se coloca el material utilizado para la fase estacionaria, y la distancia alcanzada dependerá de la polaridad y los solventes empleados (Mallitasig & Rivera, 2012).

La cámara de cromatografía está constituida por un vaso precipitado o un cilindro de vidrio, al que se le coloca una tapa que cierra la cámara de forma hermética, evitando así el escape de los vapores de los solventes usados (Figura 7) (Mallitasig & Rivera, 2012).

Figura 7

Cromatografía en capa fina



Nota. Adaptado de Cromatografía en capa fina: características, para que sirve [Figura 7], por Lifeder, 2020.

1.6.2 Cromatografía en columna

Los principios subyacentes de la cromatografía en columna son los mismos que los principios subyacentes de la cromatografía en capa fina. Antes de ejecutar una columna para evaluar la situación y determinar la proporción adecuada de solvente, se realiza una TLC. Idealmente, para una buena separación, el componente deseado debería tener un R_f de

aproximadamente 0,35 y estar separado por al menos 0,2 unidades Rf de los otros componentes (Fernández H. , 2017)

Un Rf cercano a 0,35 es ideal porque es lo suficientemente lento como para que se produzca el equilibrio entre la fase estacionaria y la móvil, pero lo suficientemente rápido como para minimizar el ensanchamiento de la banda debido a la difusión (Fernández H. , 2017).

Cuando se coloca la sustancia en la columna y se hace pasar un líquido a través de ella, las impurezas o los diferentes componentes presentes se separan debido a que tienen distintos tiempos sobre la superficie de la columna. Por ende, el eluyente puede ser movido a través de la columna por gravedad o mediante el uso de una bomba de aire o gas inerte con el fin de generar presión (Fernández H. , 2017).

1.6.3 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica muy eficaz para separar, identificar, y especialmente dimensionar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Con gran frecuencia la cromatografía de gases se aplica para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto dentro de una muestra previamente determinada, llevada a cabo por una comparación del cromatograma de la sustancia pura con el de la muestra a analizar. Una desventaja de este método es que puede haber diferentes compuestos que presenten el mismo comportamiento cromatográfico bajo condiciones idénticas, lo que llevaría a identificaciones erróneas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.6.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) es una técnica de orden analítico aplicado para la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias (Ábalos, et al., 2003).

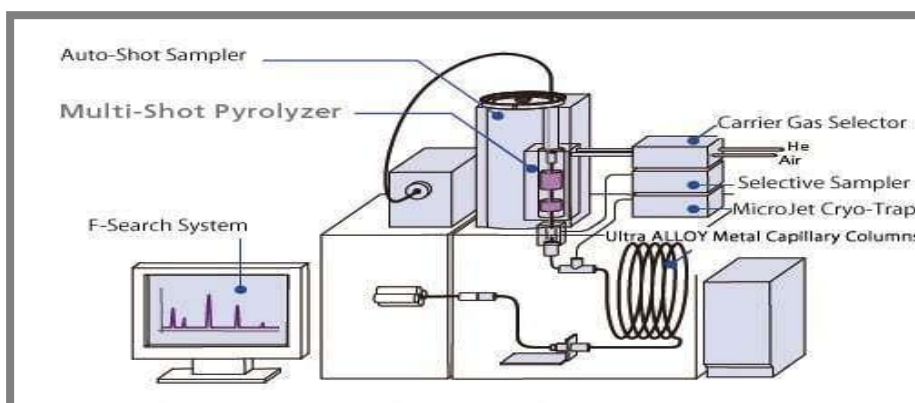
La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre la fase móvil y estacionaria que conforman el sistema (Ábalos, et al., 2003).

Separadas las sustancias, estas posteriormente se fragmentan y analizan en relativa función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar (Figura 8) (Ábalos, et al., 2003).

La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia se realiza mediante el empleo de sustancias de referencia (Ábalos, et al., 2003).

Figura 8

Esquema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas



Nota. Adaptado de Cromatografía de gases masas (GC-MS): Técnica Pirólisis- Cromatografía de gases [Figura 8], por Camacho, 2019.

1.6.5 Cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de flama (FID)

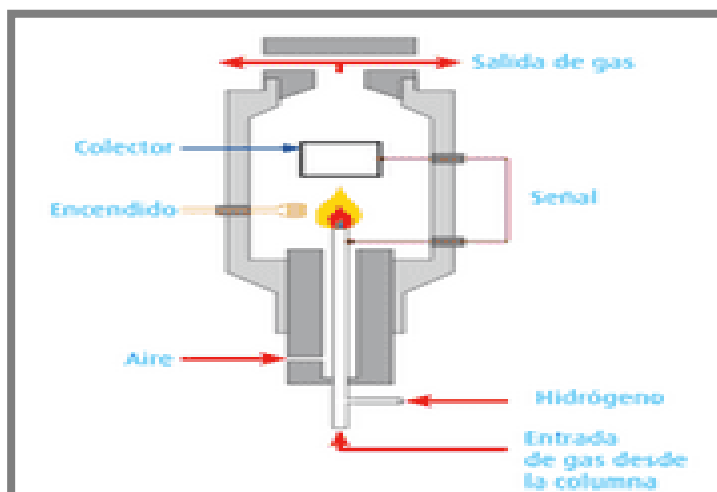
El detector de ionización de flama conocido en sus siglas como FID, se lo ha empleado en cromatografía de gases por tener un extenso rango de respuesta lineal (Saint Laumer, et al., 2010).

Consiste en un quemador, donde el efluente de la columna se mezcla con H_2 y aire, con el fin de encenderse electrónicamente. La mayor parte de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de la flama, producen iones y electrones que a su vez son capaces de conducir la electricidad mediante la flama (Figura 9). FID es un método

sensible a las impurezas de los hidrocarburos, lo que puede provocar un aumento en el ruido de línea de base y reducir la sensibilidad del detector (Rovira, 2019).

Figura 9

Esquema de FID



Nota. Adaptado de Determinación de aceites minerales en aceite de oliva mediante cromatografía de gases-detector de ionización de la llama [Figura 9], por Rovira, 2019.

Esta técnica es ampliamente usada para realizar análisis en aceites. De tal manera, que responde al número de átomos de carbono que entra en él por unidad de tiempo, siendo así un detector sensible a la masa y no a la concentración (Rovira, 2019).

1.7 Elucidación estructural

Dentro de este proceso, los compuestos son analizados mediante métodos espectroscópicos, especialmente se usa el RMN 1D y 2D, espectrometría de masa, con diversas técnicas de desorción de muestras y EM de alta resolución para adquirir la fórmula molecular con exactitud. Además, se puede realizar reacciones de derivatización o síntesis parciales para confirmar la estructura de los compuestos (Patiño, 2013).

1.7.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear, también conocida como RMN, es una técnica analítica que permite establecer la composición química de una muestra y su estructura

molecular. Se considera un método no invasivo y no destructivo, el cual analiza la interacción existente de los núcleos que giran en un fuerte campo magnético (Khan, et al., 2022).

Esta técnica permite analizar la observancia directa de los átomos. Siendo la integral una señal de RMN, la cual es proporcional al número de átomos en el volumen de sonda. Tal señal, se considera como la medida de las relaciones molares de dichas moléculas, independientemente del peso molecular. En este proceso se puede reconocer diversos componentes que forman parte de los lípidos los cuales están compuestos por elementos como el ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , y ^{31}P . La espectroscopía se usa habitualmente para ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ya que ^{15}N , y ^{17}O se encuentra de manera reducida. Los espectros, incluyen una sonda que tiene cuatro números, permitiendo realizar un estudio secuencial de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P y ^{19}F (García González, et al., 2022).

Actualmente hay equipos con una intensidad de campo de 19.2 T o con una frecuencia de 800 MHz para protones. Los estudios se determinan continuamente con una frecuencia de protones entre 300 a 500 MHz. Asimismo, recalcar que cada átomo presentará una señal y dependerá de la intensidad del campo magnético. Ciertos cambios en las frecuencias, se denomina como desplazamiento químico y los resultados se manifiestan mediante espectros de RMN o un diagrama de intensidad (García González, et al., 2022).

1.8 Desarrollo de prototipo a partir de materias primas vegetales

El prototipo tiene como fin validar o aprobar diversos aspectos sobre un producto, demostrando el cumplimiento de los objetivos del diseño propuesto y requerimientos necesarios para su elaboración. Para el desarrollo de estos documentos, es necesario llevar a cabo pruebas preliminares de laboratorio con el fin de establecer la formulación final en base a los compuestos encontrados. Para formular y diseñar un producto es importante seguir una serie de pasos como son los siguientes; generación de la idea, selección de un producto, investigación y diseño preliminar, construcción del prototipo, realización de pruebas y diseño definitivo del producto (Ramírez, et al., 2020).

Capítulo dos

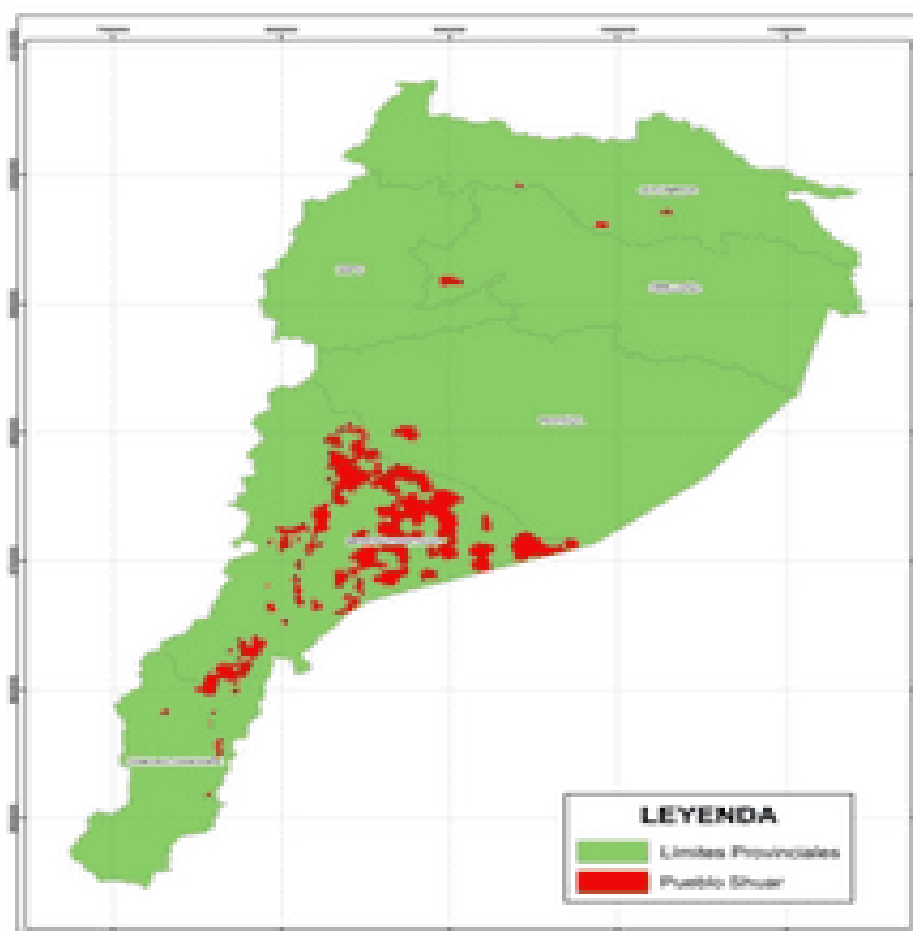
Materiales y métodos

2.1 Recolección de la materia vegetal

Los frutos de *Renealmia alpinia*, fueron recolectados en la región Amazónica de Ecuador en el centro Shuar Kaank Grande, ubicado en la parroquia San José del cantón Tiwintza, en la provincia de Morona Santiago (Figura 10), bajo permiso MAAE-ARSFC-2021-1233. Posteriormente, fueron llevados a la planta de bioproductos de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se clasificó el pericarpio, las semillas y la pulpa. Para el presente trabajo de titulación, se trabajó con las semillas de este fruto.

Figura 10

Pueblos Shuar en la provincia de Morona Santiago



Nota. Adaptado de Universidad Andina Simón Bolívar [Figura 10], por Juncosa, 2017.

2.2 Desección de las semillas de *Renealmia alpinia*

Previamente limpiado, seleccionado y separado el material, se procedió a deshidratar 0.50 kg durante 24 horas a una temperatura de 35 °C (Figura 11). Luego, se trituraron las semillas deshidratadas para la obtención de las muestras.

Figura 11

Semillas de Renealmia alpinia deshidratadas



2.3 Extracción del aceite vegetal de las semillas de *Renealmia alpinia*

La obtención de los extractos se realizó por triplicado a través del método Soxhlet. Primero se usó una cantidad de 40.02 g, donde se ejecutó por 4 horas con el solvente hexano para obtener el aceite vegetal y las siguientes 4 horas con diclorometano para extraer la materia insaponificable. De igual manera, en la segunda extracción se pesó 43.67 g y se llevó a cabo el proceso con hexano durante 4 horas y acetato de etilo por 4 horas. Asimismo, en la tercera muestra se utilizó hexano y acetato de etilo por el mismo tiempo con una cantidad de 63.15 g (Figura 12).

Figura 12

Extracción del aceite vegetal por el método Soxhlet



Los extractos recolectados se filtraron mediante un embudo con papel filtro para retener sólidos suspendidos. Inmediatamente se evaporó en un Rotavapor R-210 de marca Buchi a una temperatura de 30 °C (Figura 13), el cual permitió una separación eficaz de los solventes de las muestras sin dañarlas.

Figura 13

Rotaevaporación de extractos



2.4 Análisis cualitativo

Para la identificación de los ácidos grasos del aceite vegetal, se utilizó el equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), usando la columna polar HP-INNOWax de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de polietilenglicol (Figura 14). Las condiciones con las que trabajó el inyector fue un split ratio 5:1, una temperatura de 230 °C con un volumen de inyección de 1 µL. Mientras que las condiciones del horno empezaron a 100 °C manteniéndose durante 5 min, luego subió a 4 °C/min hasta los 230 °C. Una vez que alcanzó los 230 °C se mantuvo por 15 min con el fin de lograr separar los picos.

Figura 14

Cromatógrafo de gases thermo Scientific TRACE 1310



2.4.1 Proceso de transesterificación

Este procedimiento consistió en pesar 100 mg de la muestra, añadir 2 mL de hexano y homogenizar en un vórtex por 30 segundos. Consecutivamente, se adicionó 200 μ L de KOH (2N) diluido en metanol, se agitó en el vórtex por 30 segundos y se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm. Finalmente, para la muestra uno y dos se tomó 300 μ L de la fase hexánica (sobrenadante), añadiendo 700 μ L de hexano, mientras que en la tercera muestra se tomó 100 μ L del sobrenadante y se añadió 900 μ L de hexano, proceso que se realizó por duplicado en cada muestra y se pasó a un vial de 1 mL para su posterior análisis en el equipo de cromatografía de gases.

Los espectros de masa se analizaron por medio de la base de datos del cromatógrafo y se compararon con los espectros de la página NIST WebBook según el tiempo de retención.

2.5 Análisis cuantitativo

Para el análisis cuantitativo se usó el detector de ionización de llama (FID), bajo las mismas condiciones usadas en GC-MS. La temperatura empleada fue de 230 °C, un flujo de aire de 350 mL/min, un flujo de gas de 40 mL/min y un flujo de hidrógeno de 35 mL/min. De igual manera, se realizó el proceso de transesterificación para las muestras y se prepararon los estándares para obtener la curva de calibración.

2.5.1 Curva de calibración

Para la preparación de estándares se usó principalmente el caproato de isopropilo y el tetradecano como un patrón interno para determinar la curva de calibración, para llevar a cabo este proceso se diluyó 0.6, 1.4, 4.3, 8.4, 16.6 y 34 mg del caproato de isopropilo, se añadió 7.1 mg de tetradecano y se aforó con ciclohexano.

2.5.2 Evaluación de composición química a través de GC-FID

Para el análisis químico mediante GC - FID, se aplicó la teoría de Alain Chaintreau, con el fin de cuantificar los compuestos mediante el RRF (Factor de respuesta relativo), partiendo de la composición molecular de cada uno. Además, se compararon los tiempos de retención de SM y de FID, y las áreas de cada compuesto, para realizar los cálculos y con ello obtener la cantidad de los analitos.

Con el propósito de obtener un valor más real y aumentar el rendimiento de la cantidad de ácidos grasos, se realizó el proceso de transesterificación mediante el uso de caproato de isopropilo y tetradecano.

En este proceso, se pesó 50 mg de cada muestra, seguidamente se añadió 20 μ L de caproato de isopropilo obteniendo un peso de 15.5 mg, 20 μ L de tetradecano con un peso de 14.6 mg y se llevó a cabo la transesterificación utilizando el mismo procedimiento mencionado previamente.

2.6 Aislamiento de metabolitos

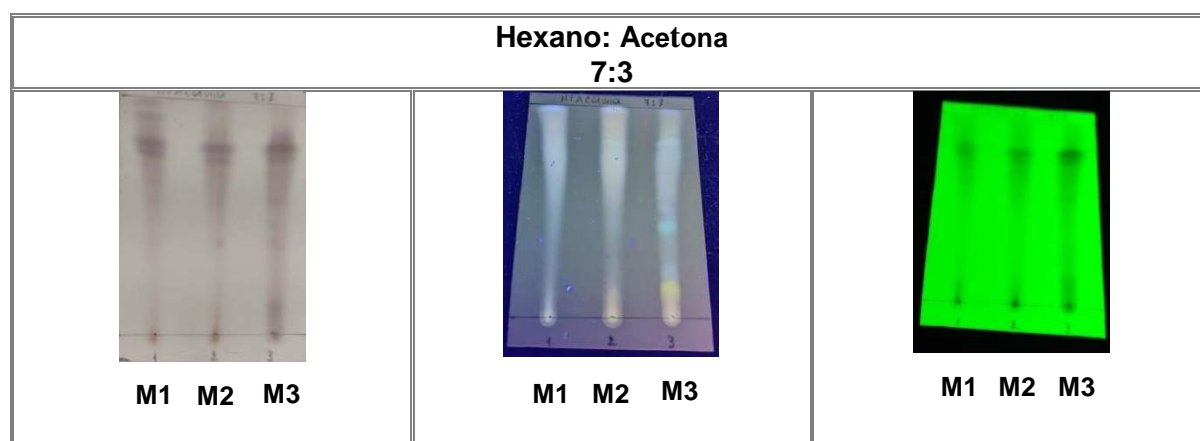
Para la caracterización de la materia insaponificable se purificaron los tres extractos de diclorometano y acetato de etilo, realizando cromatografía en capa fina (TLC) en fase directa para obtener un Rf: <0.3.

2.6.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Para aislar los metabolitos secundarios, se realizó una serie de pruebas mediante TLC en gel de sílice fase directa (Apéndice J), usando los solventes hexano/acetato en las polaridades 9.5:5, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, hexano/diclorometano en las polaridades 5:5, 4.5:5.5, 6:4, 7:3, y finalmente hexano/acetona 8:2, 7:3 (Figura 15).

Figura 15

Purificación de muestras mediante cromatografía en capa fina (TLC)



Para conseguir una mejor separación de los compuestos se utilizó el tercer extracto, donde se llevó a cabo el proceso de partición con una cantidad de 827.8 mg de muestra agregando un volumen desconocido metanol/hexano (Figura 16).

Figura 16

Partición de muestra 3 con los disolventes metanol/hexano



Las dos muestras obtenidas se rotaevaporaron (Figura 17), permitiendo que los solventes se destilen eficientemente.

Figura 17

Rotaevaporación de extracto metanólico



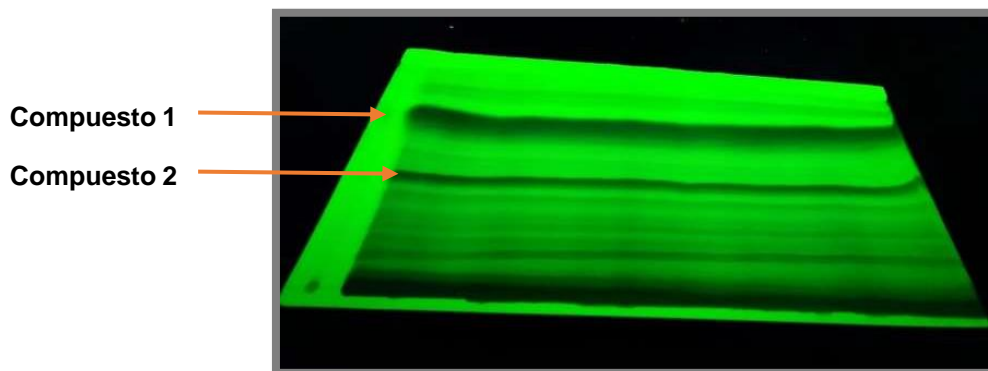
2.6.2 TLC preparativa

Por medio de cromatografía en capa fina se purificó el extracto metanólico de las semillas *Renalmia alpinia*. Seguidamente, se desarrolló una TLC preparativa sembrando 20 mg de muestra en una placa de 10 cm de largo, usando los solventes hexano/acetona a una polaridad de 8:2 (Figura 18). Una vez terminado el corrido cromatográfico se llevó para visualizar mediante la luz ultravioleta (UV) usando principalmente la onda corta y larga de 254

y 365 nm, considerada una técnica no destructiva, la cual fue empleada para marcar los compuestos a separar.

Figura 18

TLC preparativa sembrando 20 mg de muestra



Una vez apartados los compuestos señalados, se filtraron en acetona mediante una microcolumna de pipeta Pasteur con algodón, donde se los recolecto en distintos viales para posteriormente ser analizados en RMN (Figura 19).

Figura 19

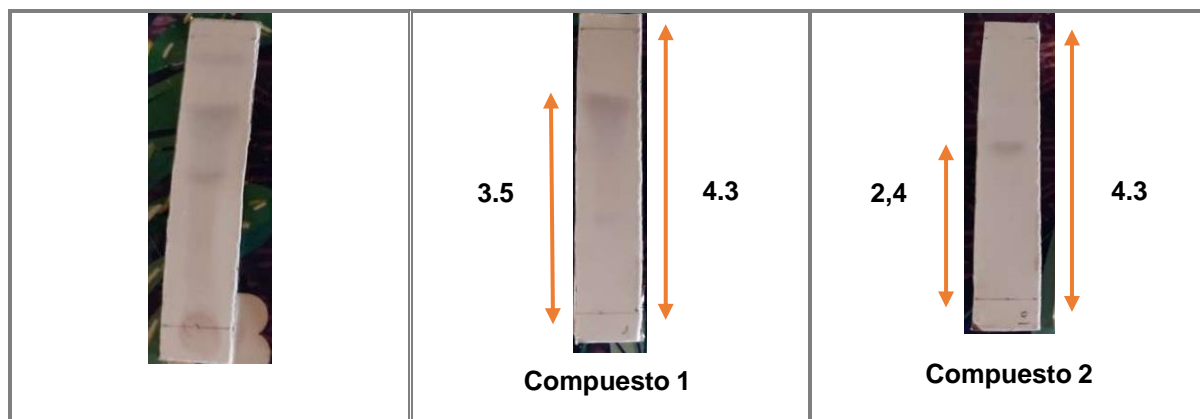
Compuestos separados de la TLC preparativa



Para verificar que las muestras estén puras se realizaron nuevamente TLC en placa de fase directa, se reveló con ácido sulfúrico y vainillina, luego se calentó en una plancha y ya finalizado este proceso, se calculó el Rf del primer compuesto separado dando como resultado 0.80 y el segundo compuesto señala un Rf de 0.55 así como lo indica la (Figura 20).

Figura 20

Purificación de muestras mediante cromatografía en capa fina (TLC)



2.6.3 Aislamiento y elucidación estructural

Los compuestos aislados se los colocó en una cámara para desecarlos durante un tiempo establecido de 2- 3 días, y seguidamente se los llevó al laboratorio de RMN para ser analizados.

2.7 Formulación de productos

De acuerdo a los compuestos encontrados en las semillas de *Renealmia alpinia* se desarrollará un prototipo siguiendo una metodología rigurosa y sistemática con el fin de poder obtener un producto de calidad y funcional. Para llevar a cabo este proceso, es primordial recopilar toda la información acerca de los compuestos, propiedades y beneficios que atribuye esta planta especialmente las semillas, mediante la revisión de literatura científica disponible en las páginas como PubMed, ScienceDirect, Scopus, Google Scholar, Web of Science, JSTOR, PLOS One, Nature, entre otros.

Por consiguiente, señalados los compuestos a utilizar, se verificará el grado de pureza. De tal modo, que se podrá diseñar el prototipo, definiendo sus características y propiedades, así como los procesos necesarios para su preparación. Finalizando la elaboración del prototipo, se podrá realizar una evaluación, con el fin de comprobar su funcionamiento y detectar posibles problemas o áreas de mejora para tener un producto final de mayor calidad y rendimiento.

Capítulo tres

Resultados y Discusión

3.1 Rendimiento del aceite vegetal y materia insaponificable

Los extractos de las semillas de *Renealmia alpina* se obtuvieron mediante el método Soxhlet, utilizando una materia seca de 0.40 kg. Para la elaboración del aceite vegetal se aplicó hexano y para la materia insaponificable diclorometano y acetato de etilo.

El rendimiento de las seis muestras obtenidas se detalla en la Tabla 1 y 2, donde se presenta el peso inicial de las semillas secas, peso final y el rendimiento a partir de los diferentes disolventes empleados.

Tabla 1

Rendimiento de los extractos del aceite vegetal de las semillas Renealmia alpina

Extractos del aceite vegetal			
Disolvente	Peso inicial de las semillas secas (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
	40.02	8.8	21.98
Hexano	43.67	10.76	24.63
	63.25	9.07	14.34

Tabla 2

Rendimiento de los extractos de la materia insaponificable de las semillas Renealmia alpina

Extractos de la materia insaponificable			
Disolvente	Peso inicial de las semillas secas (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Dicloro metano	40.02	1.86	4.64
Acetato de etilo	43.67	1.37	3.14
Acetato de etilo	63.25	1.52	2.4

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el rendimiento más alto del aceite vegetal representa un valor de 24.63% correspondiente a la muestra dos, mientras que estudios previamente realizados manifiestan que, a partir de una cantidad de 2 g de base seca, usando hexano como disolvente, obtienen un rendimiento de 13.55%, con etanol un 13.12% y con éter de petróleo 13% (Espinosa Enríquez J. L., 2018).

Por otro lado, según literatura investigada se ha reportado un rendimiento del 14% de las semillas *Renealmia alpinia*, extraído con hexano durante ocho horas mediante la técnica Soxhlet (Lognay, et al., 1991).

Los valores obtenidos en el presente proyecto son mayores a los establecidos por investigaciones, y estas variaciones pueden ser atribuibles a diversas modificaciones como la cantidad de materia usada durante la obtención de las muestras, los solventes, el tiempo de extracción, el lugar donde se recolectó, las condiciones previas con las que se trabajó las semillas, la temperatura, entre otros (Meier & Mediavilla, 1998).

3.2 Composición química del aceite vegetal de las semillas de *Renealmia alpinia*

Se identificó un total de 14 compuestos del aceite vegetal de las semillas de *Renealmia alpinia* (Apéndice A) obteniendo una cantidad total de 99.96%, entre ellos nueve pertenecen a ácidos grasos con una cantidad de 80.57% (Tabla 3) y cinco a compuestos de diferente índole con 19.39% (Tabla 4).

Tabla 3

Ácidos grasos de las semillas Renealmia alpinia

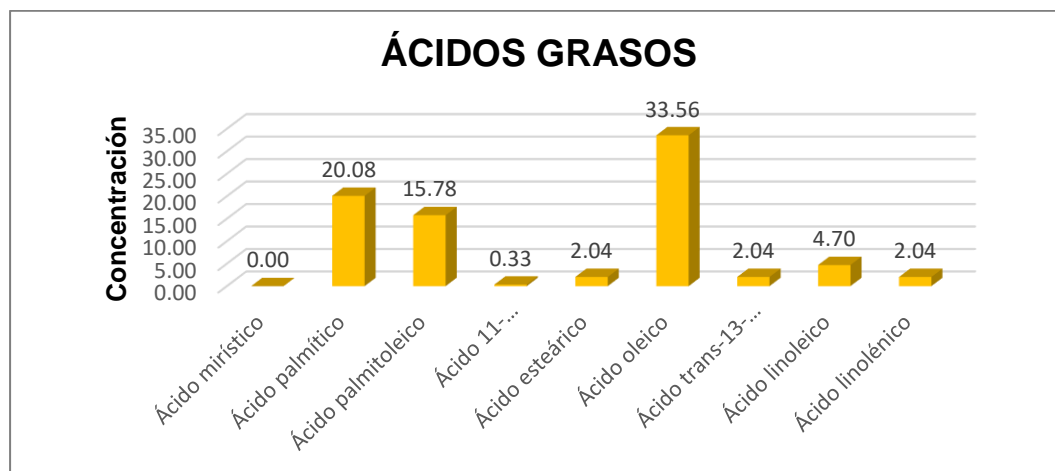
N°	ÁCIDOS GRASOS	E1	E2	E3	\bar{X}	σ	C.V
1	Ácido mirístico	t	t	t	t	-	-
2	Ácido palmítico	22.39	17.86	20.00	20.08	2.27	0.11
3	Ácido palmitoleico	20.80	15.55	11.00	15.78	4.90	0.31
4	Ácido 11-hexadecenoico	0.00	0.00	1.00	0.33	0.58	1.73
5	Ácido esteárico	1.88	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
6	Ácido oleico	30.01	33.66	37.00	33.56	3.50	0.10
7	Ácido trans-13-octadecenoico	1.88	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
8	Ácido linoleico	5.62	4.48	4.00	4.70	0.83	0.18
9	Ácido linolénico	1.87	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
TOTAL					80.57		

Nota. t: trazas.

Entre los principales ácidos grasos, el que mayor predomina es el ácido oleico con 35.56%, seguido del ácido palmítico con 20.08%, ácido palmitoleico 15.78%, ácido linoleico 4.70%, y, el ácido esteárico y linolénico con 2.04% (Figura 21).

Figura 21

Concentración de ácidos grasos del aceite vegetal de las semillas de *Renealmia alpinia*



Espinosa Enríquez J. L., (2018) en su investigación manifiesta que a partir de una extracción de semillas de *Renealmia alpinia*, consiguió 0.271 g de aceite vegetal, donde obtuvo seis ácidos grasos principalmente, el que mayor valor representó fue el ácido oleico con 58.03%, ácido palmítico con 18.46%, ácido palmitoleico con 17%, ácido lenoleico con 2.26%, el esteárico con 2.23% y el mirístico con 0.6163%.

De tal manera, se puede evidenciar que los resultados obtenidos con los de literatura se aproximan, ya que se utilizó el mismo método de extracción, aplicando hexano como un solvente orgánico.

Por otro lado, el resto de los compuestos encontrados, presentaron un valor menor con respecto a los ácidos grasos.

Tabla 4

Compuestos de las semillas *Renealmia alpinia*

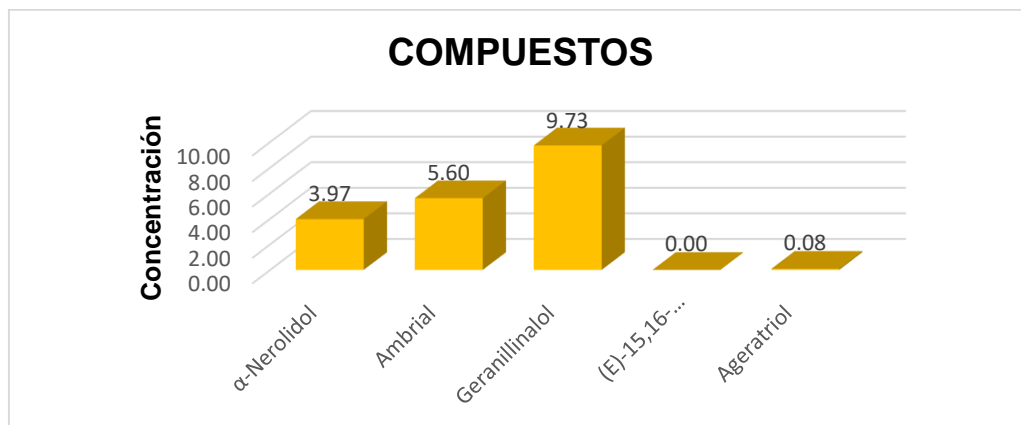
N°	COMPUESTOS	E1	E2	E3	\bar{X}	σ	C.V
1	α -Nerolidol	3.15	3.77	5.00	3.97	0.94	0.24
2	Ambrial	4.92	5.89	6.00	5.60	0.59	0.11
3	Geranillinalol	9.65	11.54	8.00	9.73	1.77	0.18
4	(E)-15,16-Dinorlabda-8(17),12-dien-14-al	t	t	t	t	-	-
5	Ageratriol	0.00	0.24	0.00	0.08	0.14	1.73
TOTAL					19.39		

Nota. t: trazas.

Siendo el Geranillinalol con 9.73%, el compuesto más abundante, seguido del Ambrial con 5.60% y α -Nerolidol con 3.97% perteneciente al grupo de los terpenoides (Figura 22).

Figura 22

Concentración de compuestos del aceite vegetal de las semillas de Renealmia alpinia



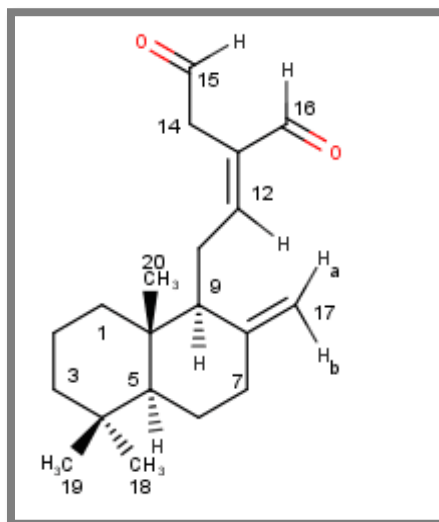
De acuerdo a investigaciones, a partir de extractos aromáticos de aceites esenciales de esta especie se logró identificar el α -Nerolidol con 1.4% y otros compuestos como α -Pino 5%, α -Felandreno 1%, terpinoleno al 13%, entre otros (Espinosa Enríquez J. L., 2018).

3.3 Identificación del compuesto aislado por RMN

El compuesto fue reconocido como un diterpeno clase labdano, (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, con fórmula de $C_{20}H_{30}O_2$ y un peso molecular de 302.5 g/mol (Figura 23).

Figura 23

Estructura del compuesto aislado (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial



Los análisis fueron llevados a cabo mediante resonancia magnética nuclear, estudiando los espectros ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC, HMBC y TOCSY, utilizando una cantidad de 2.7 mg de muestra, con el disolvente Acetona-d (Tabla 5).

De acuerdo a los análisis efectuados y las investigaciones empleadas, el espectro ^1H (Apéndice B) de RMN comprobó la presencia de dos grupos aldehídos, singuletes en δ 9.40 (1H) y 9.60 (1H). Por otro lado, presentó tres grupos metilos singuletes en δ 0.89 (3H), 0.83 (3H) y 0.75 (3H), los cuáles se encuentran asociados a átomos de carbono cuaternarios. Un exometileno δ 6.81 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), un metileno alílico δ 3.46 (2H, s).

El espectro ^{13}C (Apéndice C) constató 20 carbonos en la estructura, donde se muestra los grupos metilos CH_3 , metileno CH_2 y metino CH . Asimismo, dos carbonos en la δ 197.26 y δ 193.28, los cuales indicaron que se encuentran incorporados al oxígeno grupo CHO.

Por otro lado, mediante el espectro DEPT (Apéndice D) se logró determinar los diversos grupos CH, identificando 8- CH_2 , 3- CH_3 y 3- CH .

Para COSY (Apéndice E) se correlacionó los protones separados a una distancia de un enlace, para el δ 1.77 (1.36), δ 2.09 (1.36) y para δ 2.57(6.81). Los espectros de HMQC (Apéndice G), establecieron la relación de protones – carbonos, siendo δ 1.36 (24.08), δ 2.40 (37.78) y δ 6.81 (159.08).

De igual manera, el espectro HMBC mediante el (Apéndice F), se identificaron las correlaciones de protón-carbón, con la única diferencia que muestran estos carbonos a dos o tres enlaces de distancia con los protones.

El espectro TOCSY es una técnica de análisis la cual mediante el (Apéndice H), permitió relacionar los protones de un sistema de spin y facilitar la identificación del acoplamiento entre dos hidrógenos distantes por más de tres enlaces.

De acuerdo a los estudios de (Zhou, et al., 1997), para el compuesto analizado 8(17), 12(E)-labdadiene-15-16-dial por ^1H -RMN se obtuvo en el δ 9.40 (1H, s), δ 9.63 (1H, s) correspondientes a dos grupos aldehídos, similares al del compuesto aislado, en el δ 1.90 (1H, dd, 11-3.1) para la posición 9, mientras que para el compuesto estudiado la señal en esta posición no fue identificada debido a que se puede encontrar solapada bajo alguna muy

similar, por otro lado, en ^{13}C -RMN, se determinaron valores equivalentes a los del presente trabajo, los cuáles fueron 33.6 (3H), 21.7 (3H) y 14.4 (3H) para los tres grupos metilos.

Tabla 5

Análisis de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC, HMBC y TOCSY del compuesto elucidado.

Posición	^1H δ (ppm)	Mult.	J (Hz)	\int	^{13}C δ (ppm)	DEPT	COSY	HMQC	HMBC	TOCSY
1_{eq}	1.61	ct	13.5	2H	38.87	CH2	-	-	-	-
1_{ax}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2_{eq}	1.50	m	-	1H	19.16	CH2	-	-	-	-
2_{ax}	1.47	m	-	1H	-	-	-	-	-	-
3_{eq}	1.23	m	-	1H	41.93	CH2	-	-	-	2.41
3_{ax}	1.40	m	-	1H	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	33.27	-	-	-	-	-
5	1.14	td	13	1H	55.14	CH	-	-	-	-
6_{eq}	1.77	ddt	-	1H	24.07	CH2	1.36	-	-	-
6_{ax}	1.36	dd	-	1H	-	-	-	24.08	-	-
7_{eq}	2.40	m	-	1H	37.66	CH2	-	37.78	-	4.89
7_{ax}	2.09	m	-	1H	-	-	1.36	-	-	-
8	-	-	-	-	148.25	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	56.31	CH	-	-	-	-
10	-	-	-	-	39.38	-	-	-	-	-
11_{eq}	2.57	ddd	16	1H	24.45	CH2	6.81	-	-	-
11_{ax}	2.45	c	-	1H	-	-	-	-	-	-
12	6.81	t	6.5	1H	159.06	CH	-	159.08	-	2.55
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14_{eq}	3.46	s	-	1H	38.96	CH2	-	-	197.40	-
14_{ax}	2.81	d	16.1	1H	-	-	-	-	-	-
15	9.40	s	-	1H	197.26	-	-	-	-	-
16	9.60	s	-	1H	193.28	-	-	-	-	3.49
17a	4.85	s	-	1H	107.50	CH2	-	-	56.31	2.45
17b	4.47	s	-	1H	-	-	-	-	-	4.89
18	0.89	s	-	3H	33.06	CH3	-	-	-	-
19	0.83	s	-	3H	21.19	CH3	-	-	-	-
20	0.75	s	-	3H	13.85	CH3	-	-	33.21	-

3.4 Formulación del producto

El desarrollo de la formulación del producto elixir bucal fue elaborado en base al compuesto aislado un diterpeno tipo labdano, (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, de las semillas de *Reinealmia alpinia*, la cual posee propiedades antifúngicas para tratar la candidiasis producida por el hongo *Candida albicans*.

Los diterpenos clase labdano se destacan principalmente por sus propiedades beneficiosas para el cuerpo humano, por lo que pueden ser empleadas en diversas formulaciones farmacéuticas. Se caracterizan por tener propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antiprotozoarias, antibacterianas frente a *S. aureus* bacterias gram positivas y *E. coli* para bacterias gram negativas. Igualmente, presenta una actividad antifúngica contra el hongo infeccioso oportunista *Saccharomyces cerevisiae* (Demetzos & Dimas, 2001).

Además de tener propiedades enzimáticas y endócrinas, algunos de los diterpenos tipo labdano resaltaron por sus distinguidas propiedades antiproliferativas y citotóxicas (Demetzos & Dimas, 2001).

El extracto presenta una oleoresina cruda de color pardo oscuro con olor agradable, de consistencia pegajosa (Lognay, y otros, 1991). Los diterpenos clase labdano se degradan entre 250 y 450 °C, tienen una densidad de 1.27 g/cm³ (Orta Amaro, 2007). También muestran un índice de refracción de 1.505 ± 0.03 a temperatura ambiente, inicialmente es aceitoso, pero tiene a endurecerse con el cambio de temperatura (Chakrabarty, 2019).

Por otra parte, conforme a las investigaciones efectuadas, se determinó que el ángulo de contacto de la gota de agua en la superficie del labdano diterpeno corresponde a 108.5°C, señalando que estos compuestos son de carácter hidrofóbico facilitando su interacción y el cruce de membranas plasmáticas (Chakrabarty, 2019).

La viscosidad tiende a reducir de 40 a 110 mL/g cuando la temperatura aumenta, deduciendo que la dependencia de la viscosidad con la temperatura es muy evidente. Asimismo, posee un coeficiente de partición de 5.36, lo que indica una mayor lipofilicidad (Chakrabarty, 2019).

En cuanto a los parámetros de biodisponibilidad y toxicidad, tiene una solubilidad de 4.95, lo que afecta significativamente a las propiedades de absorción, una distribución de 5.37 (De pH 1 - 8) y una absorción aproximadamente de 4.9 ± 1.0 . La biodisponibilidad por vía oral constituye un valor $\leq 30\%$ e intestinal $\geq 70\%$ (Chakrabarty, 2019).

Dentro de las clases de toxicidad se encuentran dos tipos, la categoría dos indica que es tóxico cuando se ingiere por vía oral, mientras que la categoría cuatro, manifiesta que no hay indicación de peligro por vía intravenosa (IV). Según estudios realizados, el test de Ames señala un valor de +0.09, lo que significa que tiene una actividad mutagénica de tipo moderada (Chakrabarty, 2019).

3.4.1 Estandarización del principio activo

Para elaborar una formulación que sea segura y eficaz, se procedió a realizar la estandarización del principio activo mediante literatura investigada, con el fin de establecer la concentración exacta de API que va a ser empleada en el producto elixir bucal.

El compuesto (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial fue identificado en semillas de la planta *Alpinia galangal* durante una investigación previa. A través de ensayos realizados contra varios microorganismos, se descubrió que este compuesto fue efectivo contra el hongo *Candida albicans*, demostrando actividad a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Roth, Chandra, & Nair, 1998).⁴

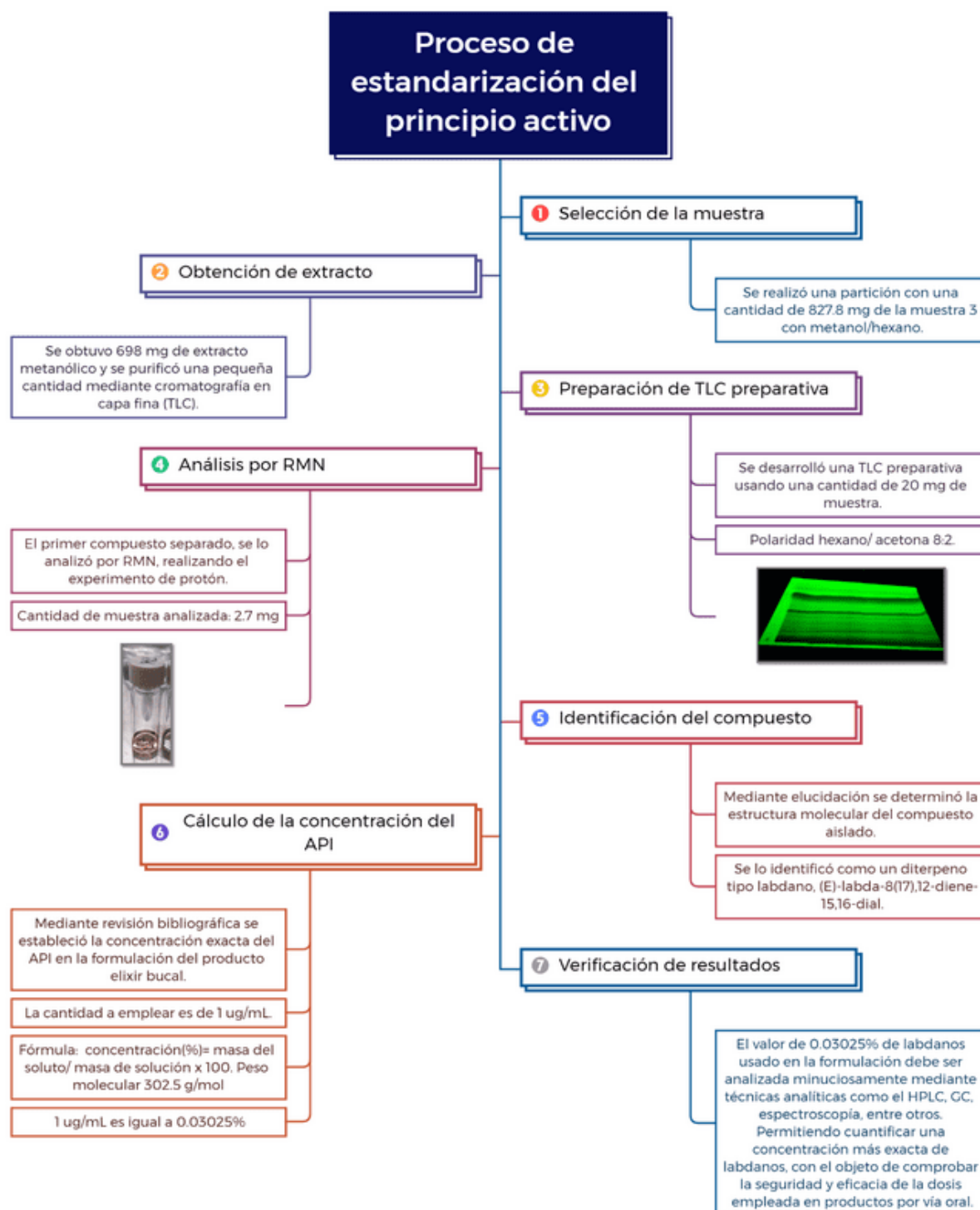
En otro estudio se realizaron pruebas de hemólisis para investigar el efecto de (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial en los eritrocitos. Se determinó que la dosis máxima para administración intravenosa fue de $\leq 0.44 \text{ mg/mL}$. Por lo tanto, se concluyó que este compuesto puede ser administrado por el torrente sanguíneo sin riesgo de causar anemia hemolítica. Asimismo, este tipo labdano demostró inhibir el crecimiento de *Candida albicans* en función de su dosis suministrada.

En la (Figura 24) se describe el proceso para obtener la cantidad del compuesto utilizado en la preformulación, se determinó la cantidad exacta mediante ensayos preliminares y se expresó en porcentaje (Apéndice I) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (\%)} = \frac{\text{masa del soluto}}{\text{masa de solución}} \times 100$$

Figura 24

Proceso de estandarización del principio activo (E)-labda-8(17),12-diene-15,16dial



3.4.2 Preformulación de excipientes candidatos

En la Tabla 6 se presenta una lista de excipientes que pueden ser utilizados para la formulación del producto, agregando el rango de aplicación respectivamente.

Tabla 6

Preformulación de excipientes candidatos para el producto elixir bucal

Función	Componentes	Rango (%)
Vehículo primario	Agua purificada	60 – 80%
Vehículo secundario (Cosolventes)	Etanol	10 – 25%
	Propilenglicol	10 – 25%
	Glicerina	≤20%
Regulador de pH	Ácido cítrico	0.1 – 2.0%
	Ácido acético	1.0 – 2.0%
	Fosfato de sodio	1.0 – 10%
	Citrato de sodio	0.3 – 2.0%
Modificadores organolépticos (Edulcorantes)	Sacarosa	5 – 30%
	Sorbitol	5 – 70%
	Sucralosa	0.1 – 1%
	Sacarina sódica	0.1 – 0.5%
(Refrescantes)	Cristales de mentol	0.1 – 2.0%
Conservantes antimicrobianos	Ácido benzoico	0.01 – 0.1%
	Benzoato de sodio	0.1 – 2.0%
	Ácido sórbico	0.1 – 0.5%
	Glicerina	>20%
Conservantes antioxidantes	Ácido ascórbico	0.01 – 0.1%
	Ácido cítrico	0.1 – 2.0%
	Sorbitol	<5%
	EDTA	0.01 – 0.3%

Los rangos de estas sustancias, normalmente dependerá de la forma farmacéutica que se vaya a emplear, en comprimidos, jarabes, cremas, geles, soluciones, la cantidad de estos pueden variar. Las farmacopeas evalúan la cantidad precisa que debe ser usado para cada producto, evaluando la dosificación, con el propósito de mejorar la biodisponibilidad, estabilidad u otra cualquier característica mientras se usa (Villafuerte Robles, 2011).

Además, la selección de cada uno de los excipientes va a depender mayormente de la característica que se le desea atribuir al producto, es decir, el color, olor, textura, consistencia y sabor (Villafuerte Robles, 2011).

Por esta razón, estos componentes son esenciales al momento de elaborar un medicamento, ya que cumplen una función importante en garantizar un producto de mejor calidad.

3.4.3 *Preformulación tentativa*

En la Tabla 7, se detalla la preformulación final del producto elixir bucal, en base al compuesto analizado (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial.

Tabla 7

Preformulación tentativa del producto elixir bucal

Función	Componentes	%	Rango
API	Diterpeno clase Labdano (E)-labda-8(17),12-diene- 15,16-dial	0.03	0.03
Vehículo primario	Agua purificada	33.935	60 – 80%
Solvente	Etanol	10.0	10 – 25%
Cosolvente	Propilenglicol	15.0	10 – 25%
Regulador de pH	Citrato de sodio	0.2	0.1 - 5%
Edulcorante	Sorbitol	6.0	5 – 70%
Edulcorante	Sacarina sódica	0.1	0.1 – 0.5%
Conservante	Ácido benzoico	0.1	0.01 – 0.1%
Conservante	Benzoato de sodio	0.4	0.1 – 2.0%
Refrescante	Cristales de mentol	0.2	0.1 – 2.0%
Estabilizante	EDTA	0.1	0.01 – 0.3%
-	Agua	33.935	-
TOTAL		100%	-

Para esta forma farmacéutica, se utilizará el etanol como solvente ya que tiene un mayor poder de acción para solubilizar el principio activo, para reforzar la solución del API se le añade el cosolvente propilenglicol. Por otro lado, el ácido benzoico, actuará como un coadyuvante, proporcionando una función antibacteriana, los cristales de mentol, proveerán

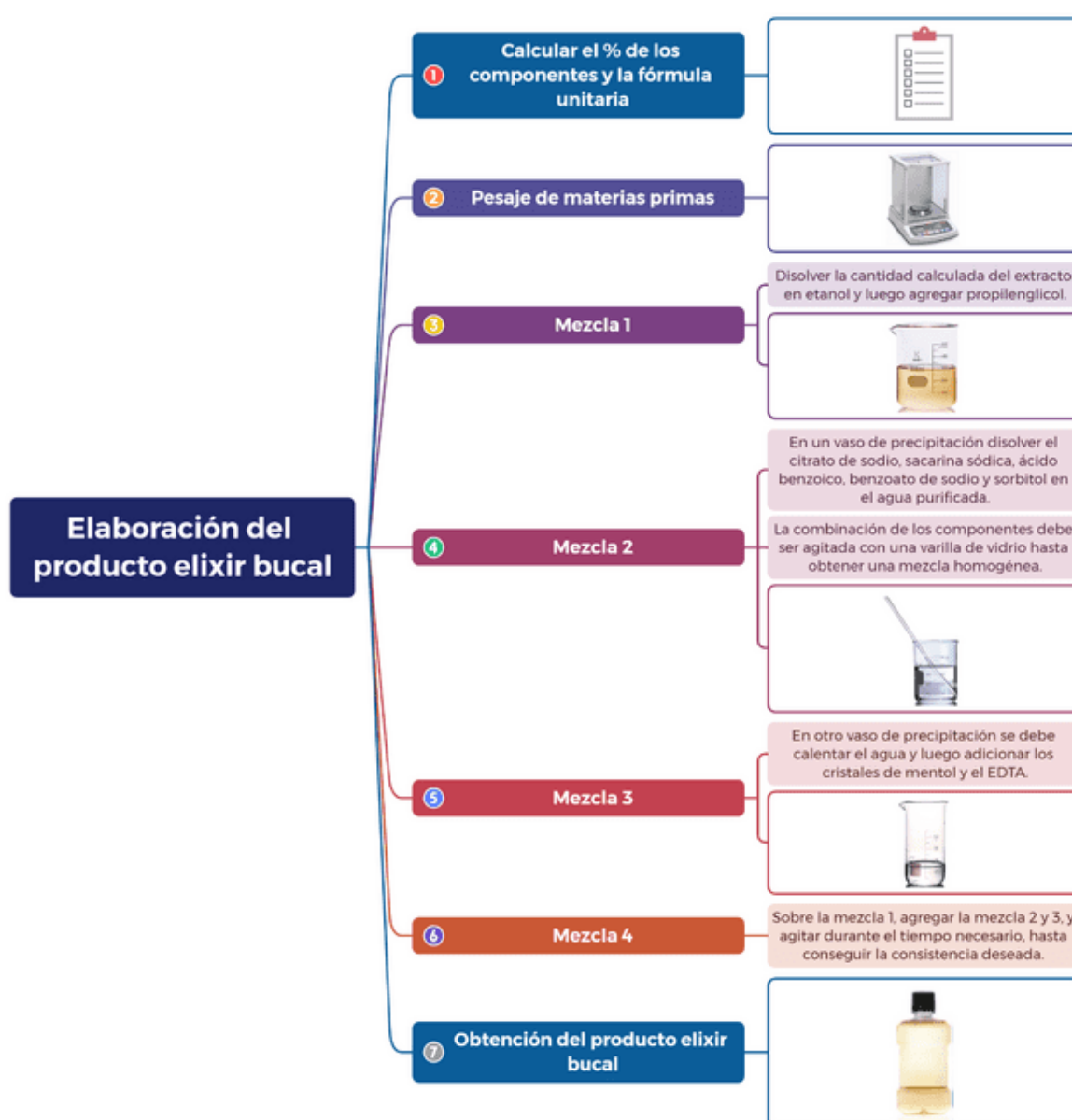
una sensación mentolada y el EDTA actuará como un estabilizante, con el fin de que el elixir bucal no presente cambios en su color, consistencia, sabor, etc.

3.4.4 Proceso de manufactura del producto elixir bucal

En la (Figura 25) se explica el proceso de elaboración del producto, permitiendo aumentar su eficacia y eficiencia durante su realización. A su vez, esto permite disminuir los errores y acortar los tiempos de ejecución, lo cual refleja en un mayor ahorro de recursos.

Figura 25

Procedimiento de manufactura del producto elixir bucal de las semillas de Renealmia alpina



Conclusiones

Se determinó la composición química del aceite vegetal de las semillas de la especie *Renealmia alpinia*, a partir de GC-MS y GC-FID, se identificaron 14 compuestos, 9 correspondientes a ácidos grasos, siendo el ácido oleico (35.56%) la cantidad mayoritaria, el ácido palmítico (20.08%) y ácido palmitoleico (15.78%). Los terpenos fueron el grupo al que pertenecieron los cinco compuestos restantes, siendo el geranilinalol uno de los compuestos con mayor porcentaje encontrado, alcanzando un valor de (9,73%).

Mediante el análisis de RMN por elucidación estructural, se logró identificar el compuesto (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, presentado una fórmula de $C_{20}H_{30}O_2$ y un peso molecular de 302.5 g/mol.

En base a las propiedades y características del compuesto aislado, se propuso una formulación de un producto elixir bucal, presentando una preformulación con la concentración de API basada en investigaciones previas y el proceso de manufactura para su posterior realización.

Recomendaciones

Se recomienda proseguir con el análisis de la composición química de las semillas de *Renealmia alpinia*, utilizando otros métodos de identificación complementarios, debido a que existe una amplia diversidad de compuestos presentes.

Realizar el estudio de los componentes no insaponificables, por la aplicación de cromatografía en columna, con el fin de completar el estudio del aceite vegetal.

Se sugiere determinar la concentración precisa del principio activo (API), con el fin de evaluar su toxicidad y comparar su eficacia con estudios previos, además, de investigar más a fondo los posibles excipientes que pueden ser empleados en la preformulación, ya que estos son los que proporcionan las características principales al producto.

Referencias

- Ábalos, A., Espuny, M. J., Bermúdez, R. C., & Manresa, A. (2003). Aplicación de la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxicanoatos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Revista Cubana de Química*, 15(2), 3-11.
- Alarcón, J., Martínez, D., Quintana, C., Jiménez, S., Díaz, A., & Jiménez, I. (2008). Propagación in vitro de *Renealmia alpinia* (Rottb), planta con actividad antiofídica. *Vitae*, 61-69.
- Caballero, Y., & Walls, F. (2015). Productos naturales del zoapatl. *Bol Inst Quim Univ Nal Auton Mex*, 79-102.
- Camacho, A. (2019). *Cromatografía De Gases Masas (GCMS): Técnica Pirólisis-Cromatografía De Gases (Py-GCMS)*.
- Carbajal, A. (2018). Química biológica: conceptos teóricos y ejercicios de aplicación: Cátedra de Química Orgánica y Biológica. *Manual de Nutrición y Dietética*.
- Chakrabarty, I. (2019). Investigation on the vibrational and antimicrobial potential of (E)-Labda-8(17), 12-diene-15,16-dias from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B.L. Burtt.
- Cosío, S. M., Álvarez, M. R., & Meléndez, L. A. (2012). Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. *Instituto Politécnico Nacional No. 195*.
- Demetzos, C., & Dimas, k. (2001). Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products*, 235-292.
- Duarte, A., Jiménez, J., Pineda, J., González C, & García, J. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, 61-74.
- Durán, S., Torres, J., & Sanhueza, J. (2015). Aceites vegetales de uso frecuente en Sudamérica: características y propiedades. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 11-19.
- Escobar, J. V. (2012). *Neutralización del veneno de Bothrops asper con plantas de la familia Zingiberaceae utilizadas en la etnobotánica del accidente ofídico en el oriente antioqueño*.

- Escutia Monroy, B. (2021). *Extractos antioxidantes de semillas de Renealmia alpina como una alternativa de uso nutracéutico*. Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo.
- Espinosa Enríquez, J. L. (2018). *Obtención, caracterización y conservación de aceite de Tapicón (Renealmia alpina) para uso alimentario*. Obtenido de <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1345/SSIT0015646.pdf?sequence=1>
- Fernández, H. (2017). Cromatografía en columna. *Métodos cromatográficos*, 16-18.
- Fernández, M., Ortiz, W., Pereáñez, J., & Martínez, D. (2010). Evaluación de las propiedades antifúngicas del extracto etanólico y fracciones obtenidas de Renealmia alpina (Rottb) Maas (Zingiberaceae) cultivada in vitro. *Vitae*, 17(1), 75-82.
- García González, M., Sánchez Mendoza, E., Waksman Minsky, N., & Saucedo, A. (2022). Fundamentos y analogías para entender mejor la espectroscopía de RMN. *Educación química*, 33(4), 3-13.
- García, G. (2021). Extracción en frío, método que garantiza la calidad del aceite de oliva.
- Gómez-Betancur, I., & Benjumea, D. (2014). Traditional use of the genus Renealmia and Renealmia alpina Maas (Zingiberaceae)- a review in the treatment of snakebites. *Elsevier*, 574-582. doi:10.1016/S1995-7645(14)60292-3
- Guevara, M., Ochoa, C., Carranza, P., Contreras, L., & Luna, J. (2017). Composition, physico-chemical properties and antioxidant capacity of Renealmia alpina (Rottb.) Maas fruit. *Uncuyo*, 377-385.
- Gunstone, F. (2011). *Vegetable Oils in Food Technology: composition, properties and uses (2nd ed.)*. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Gupta, M. (2017). Guía práctica para el procesamiento de aceite vegetal. *Elsevier*.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas identificación de compuestos causantes del mal olor. *Laboratorio de Control de la Contaminación Ambiental*, 35-41.

- Guzmán, A. (2011). Perfil lipídico y contenido de ácidos grasos trans en productos ecuatorianos de mayor consumo. (*Bachelor's thesis, QUITO/PUCE/2011*).
- Jiménez, O. (2018). *Composición proximal del fruto. Obtención, evaluación de pigmentos microencapsulados a partir de frutos xkijit (Renealmia alpinia) e incorporación en una matriz alimenticia.*
- Juncosa, J. (2017). *Saber para prevalecer civilización, educación y evangelización en el territorio Shuar.*
- Khan, M., Ahmad, B., Kamboh, A., & Qadeer, Z. (2022). Use of NMR relaxometry for determination of meat properties: a brief review. *Food Materials Research, 2-8.*
- Kress, W. J., Betancur, J., & Echeverry, B. (1999). *Heliconias: llamas de la selva colombiana.* Cristina Uribe Ediciones.
- León-Yáñez, S., Valencia, N., Pitmam, L., Endara, C., & Navarrete, H. (2019). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador.* Obtenido de Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Lifeder. (2020). *Cromatografía en capa fina: características, para que sirve.*
- Lognay, G., Marlier, M., Severin, M., Haubruge, E., Gibon, V., & Trevejo, E. (1991). On the Characterization of some Terpenes from *Renealmia alpinia* Rott. (Maas) Oleoresin. *Flavour and fragrance journal, 87-91.*
- Luna, M., Ochoa, C., Carranza, P., Contreras, L., & Luna, J. (2018). Composición, propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante del fruto *Renealmia alpina* (Rottb.) Maas. *FCA Uncuyo, 50(2), 377-385.*
- Macía, M. J. (2003). *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae): planta comestible de la Sierra Norte de Puebla (México). *Anales Jardín Botánico, 60(1), 183-187.*
- Mallitasig, M. E., & Rivera, M. J. (2012). Determinación de compuestos anfetamínicos y metanfetamínicos en muestras de orina que ingresan al laboratorio de química forense del departamento de criminalística de la policía judicial de Chimborazo mediante el método de cromatografía en capa fina duran. (*Bachelor's thesis, Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, 2012.*).

- Matissek. (2005). *Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet*. Madrid: Ciencias Ambientales.
- Meier, C., & Mediavilla, V. (1998). Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *Int Hemp Assoc*, 16-20.
- Nielsen, S. (2009). *Análisis de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Orta Amaro, M. (2007). Copal: Microestructura, composición y algunas propiedades relevante (Doctoral dissertation).
- Patiño, L. P. (2013). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios a partir de esponjas, corales, tunicados y briozoos del Atlántico sur y la Antártida. (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Ramírez, J., Renjifo, K., Cardenas, J., & Mejía, M. (2020). Estructuración de una definición para un prototipo de ingredientes naturales. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 10-19.
- Ritter, F. (2022). Extracción sólido - líquido (Soxhlet).
- Rojas, K. M. (2019). Obtención y extracción de aceites vegetales.
- Roth, G., Chandra, A., & Nair, M. (1998). Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *Journal of natural products*, 61(4), 542-545.
- Rovira, D. M. (2019). Determinación de aceites minerales en aceite de oliva mediante extracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases-detector de ionización de la llama. *Universidad de almería*, 1-48.
- Saint Laumer, J., Esmeralda, C., Merie, P., & Chaintreau, A. (2010). Cuantificación en cromatografía de gases: predicción de factores de respuesta del detector de ionización de llama a partir de entalpías de combustión y estructuras moleculares. *Anal.química*, 6457-6462.
- Villafuerte Robles, L. (2011). Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(1), 18-36.
- Vovides, A. P., Rees, J., & Torres, V. (1999). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Instituto de Ecología.

Yakovlev, A. (2007). *Flickr*. Obtenido de *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae):

<https://www.flickr.com/photos/botalex/with/4044305992/>

Zhou, B. N., Baj, N. J., Glass, T. E., Malone, S., Werkhoven, M. C., Van Troon, F., & Wisse, J. H. (1997). Bioactive labdane diterpenoids from *Renealmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. *Journal of Natural Products*, 60(12), 1287-1293.

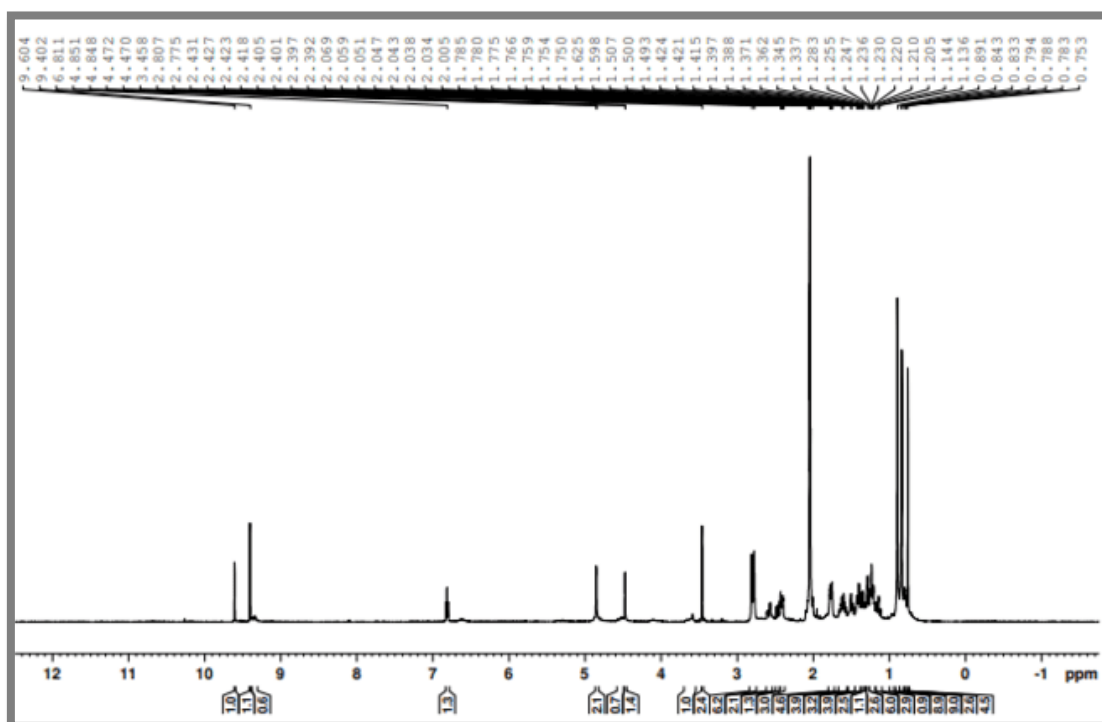
Apéndice

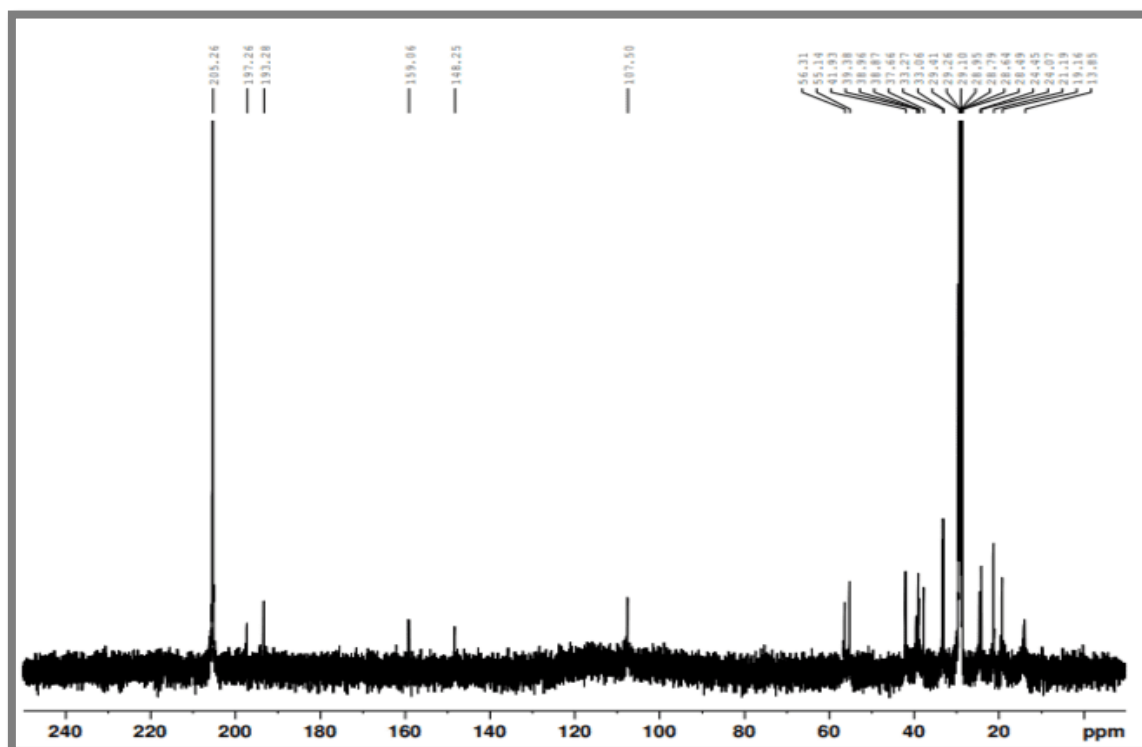
Apéndice A. Compuestos y ácidos grasos del aceite vegetal *Renalmia alpina*

N°	COMPUESTOS y ÁCIDOS GRASOS	E1	E2	E3	\bar{X}	σ	C.V
1	Ácido mirístico	t	t	t	t	-	-
2	α -Nerolidol	3.15	3.77	5.00	3.97	0.94	0.24
3	Ácido palmítico	22.39	17.86	20.00	20.08	2.27	0.11
4	Ácido palmitoleico	20.80	15.55	11.00	15.78	4.90	0.31
5	Ácido 11-hexadecenoico	0.00	0.00	1.00	0.33	0.58	1.73
6	Ambrial	4.92	5.89	6.00	5.60	0.59	0.11
7	Ácido esteárico	1.88	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
8	Ácido oleico	30.01	33.66	37.00	33.56	3.50	0.10
9	Ácido trans-13-octadecenoico	1.88	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
10	Ácido linoleico	5.62	4.48	4.00	4.70	0.83	0.18
11	Geranillinalol	9.65	11.54	8.00	9.73	1.77	0.18
12	Ácido linolénico	1.87	2.24	2.00	2.04	0.19	0.09
13	(E)-15,16-Dinorlabda-8(17),12-dien-14-al	t	t	t	t	-	-
14	Ageratriol	0.00	0.24	0.00	0.08	0.14	1.73
TOTAL					99.96		

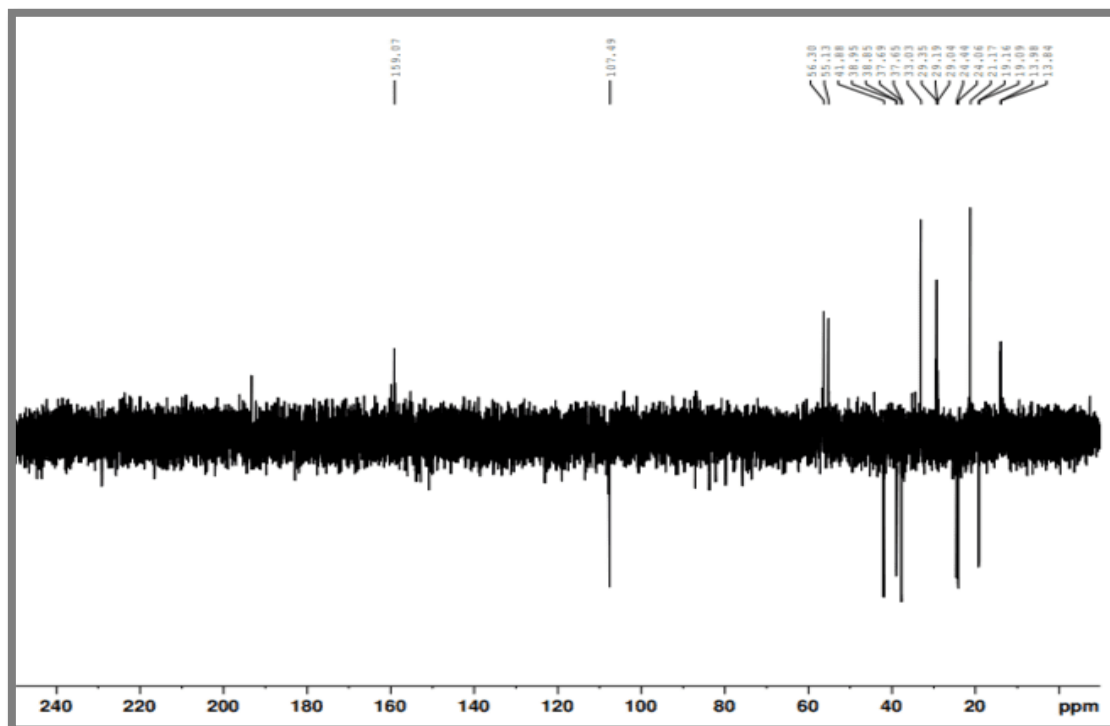
Nota. t: trazas

Apéndice B. Espectro ^1H del compuesto 1 aislado

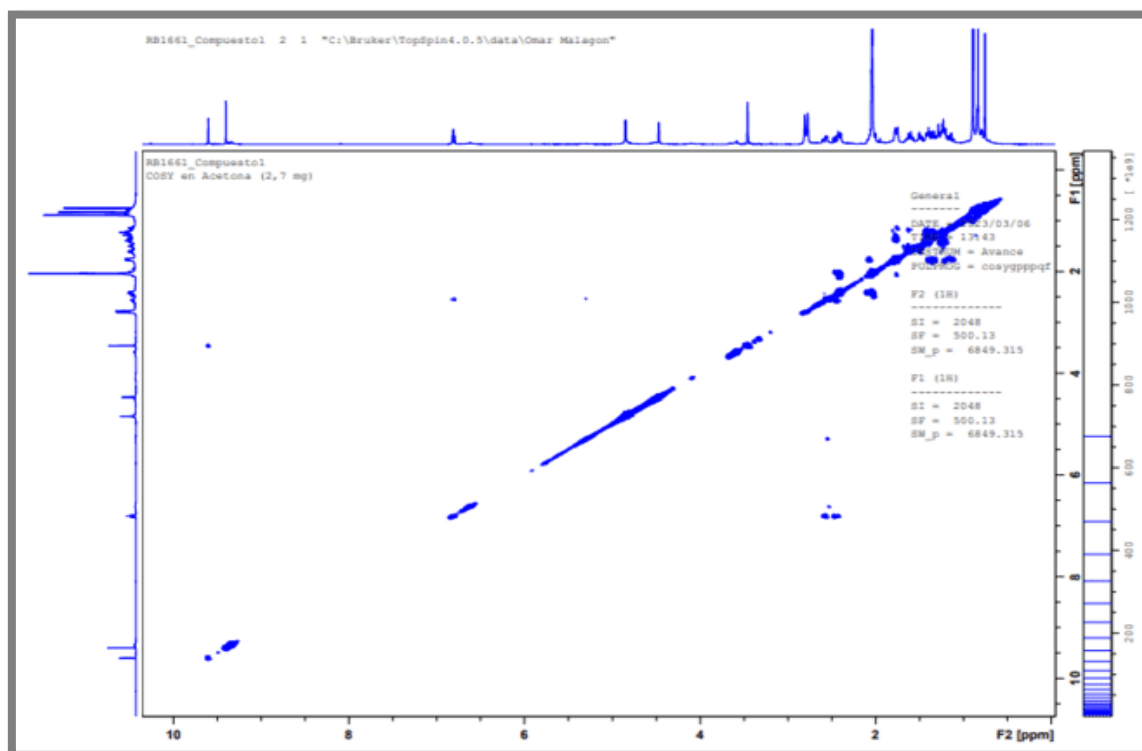


Apéndice C. Espectro ^{13}C del compuesto 1 aislado

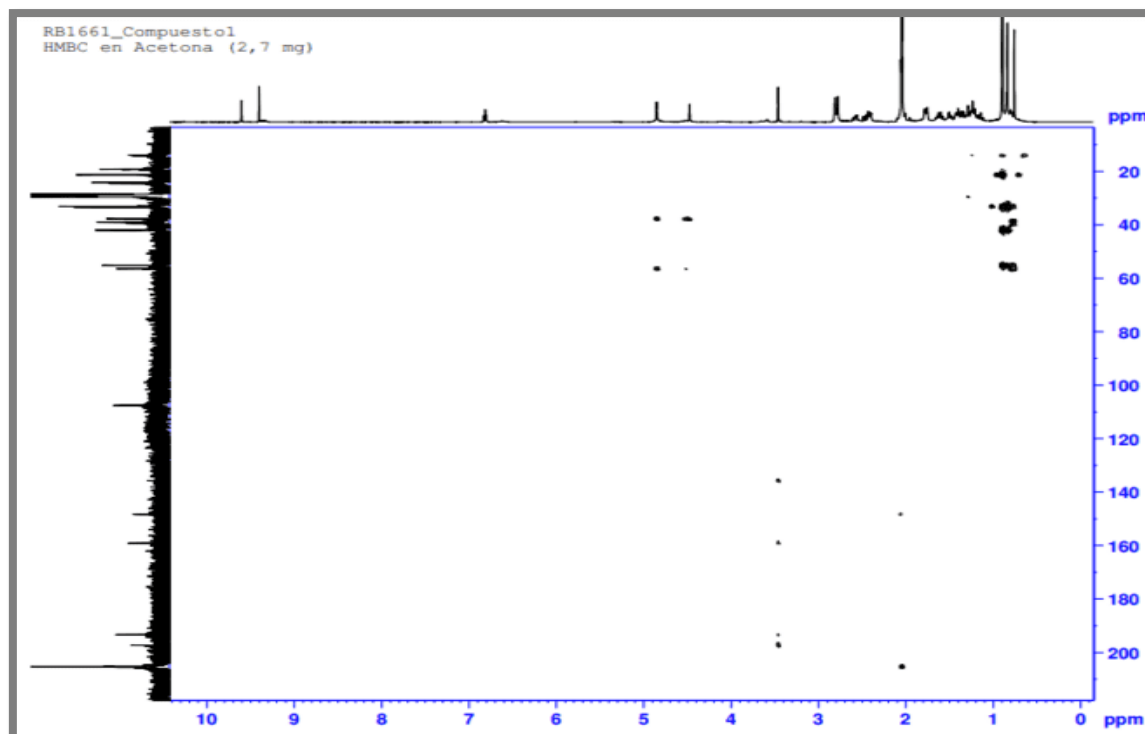
Apéndice D. Espectro DEPT del compuesto 1 aislado



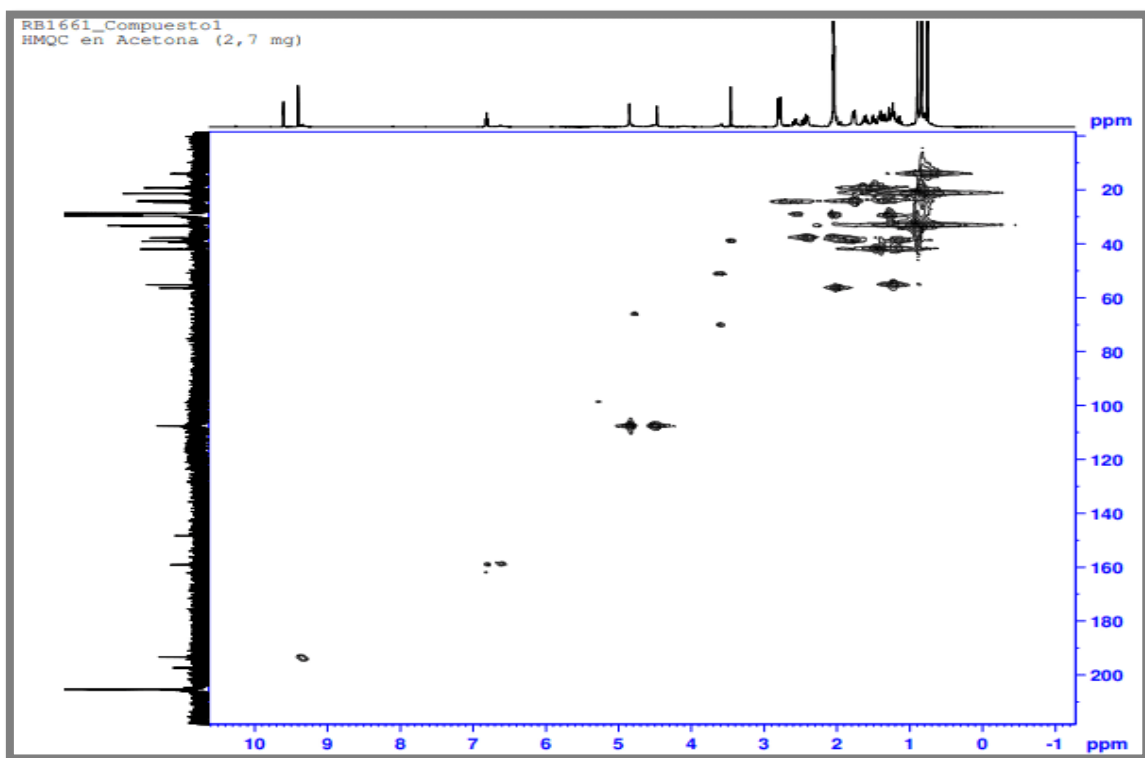
Apéndice E. Espectro COSY del compuesto 1 aislado



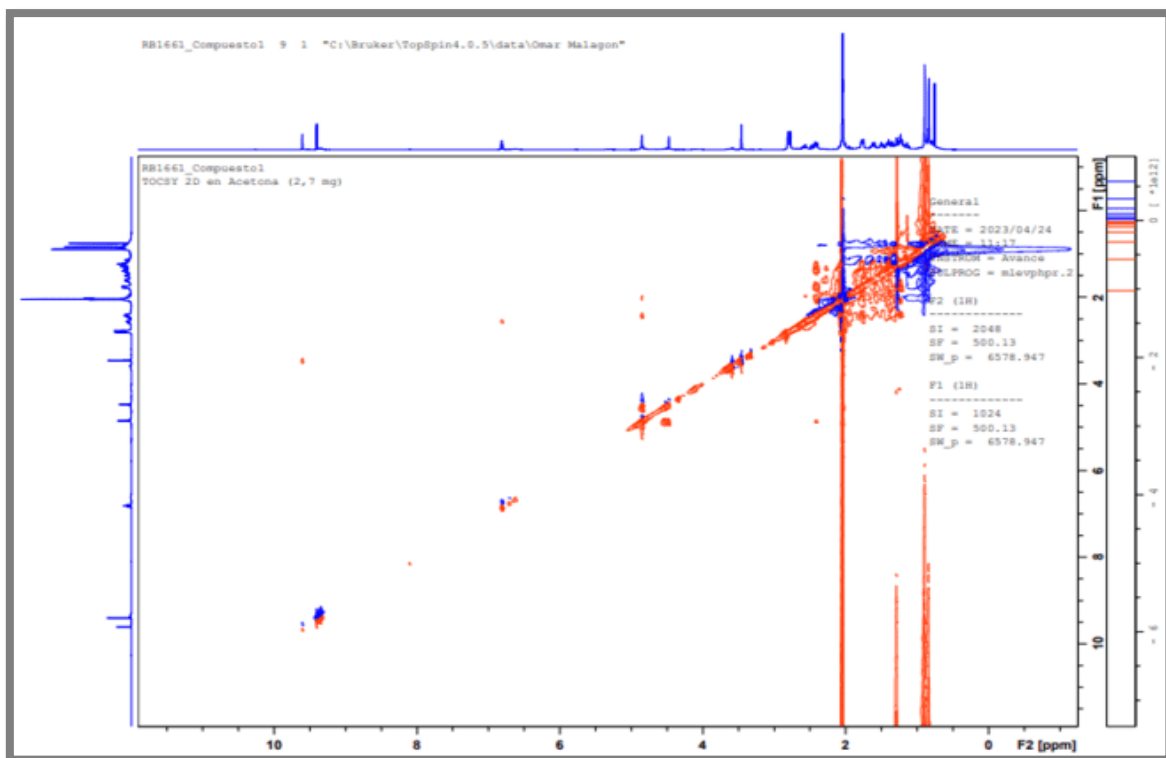
Apéndice F. Espectro HMBC del compuesto 1 aislado



Apéndice G. Espectro HMQC del compuesto 1 aislado



Apéndice H. Espectro TOCSY del compuesto 1 aislado



Apéndice I. Conversión de 1µg/mL a %

Peso molecular del compuesto: 302.5 g/mol

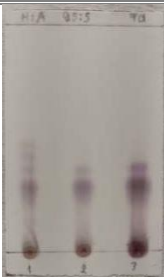
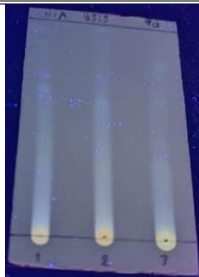
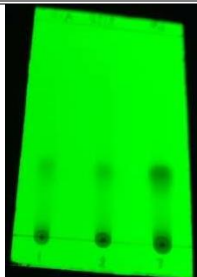
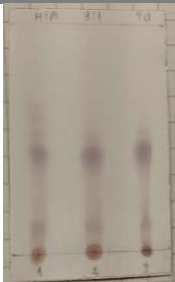
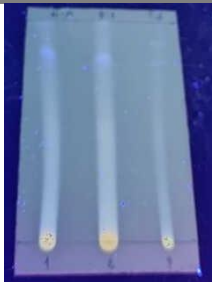
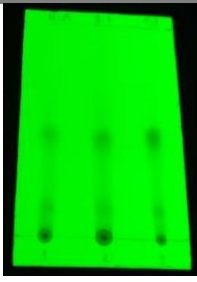
$$\frac{1\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0.001 \text{ g/L}$$

$$\text{Masa del soluto(g)} = 1\text{L} \times 0.001 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 302.5 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.3025\text{g}$$

$$\% = \frac{\text{masa de soluto}}{\text{masa de solución}} \times 100$$

$$\% = \frac{0.3025\text{g}}{1000\text{g}} \times 100 = 0.03025\%$$

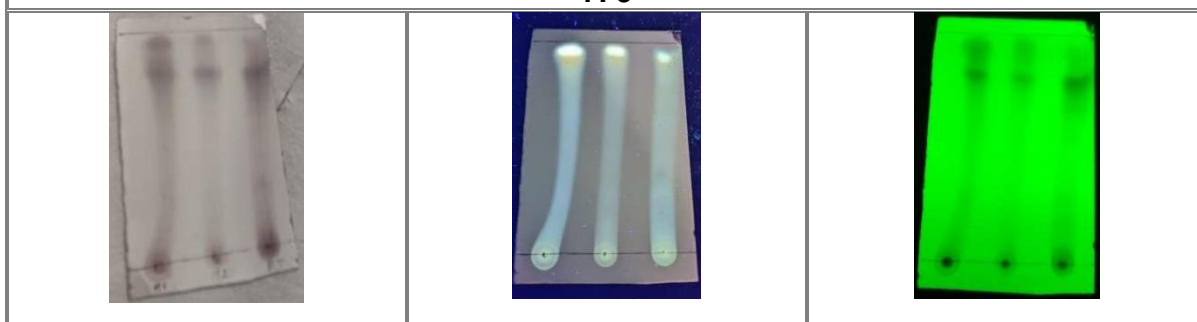
Apéndice J. TLC en fase directa con hexano-acetato

H: A 9.5: 5		
		
Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 9.5:5 en H: A, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.		
H: A 9: 1		
		
Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 9:1 en H: A, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.		
H: A 8: 2		



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 8:2 en H: A, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.

H: A
7: 3



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 7:3 en H: A, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.

H: A
5: 5



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 5:5 en H: A, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra corre totalmente.

Hexano
100% puro



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de Hexano 100% puro, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra no sube.

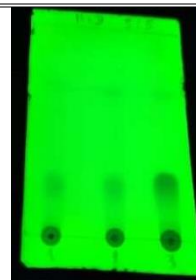
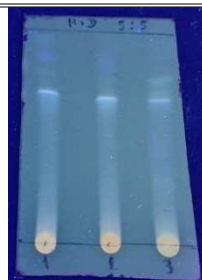
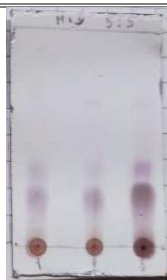
**Acetato
100% puro**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de Acetato 100% puro, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra corre en su mayoría.

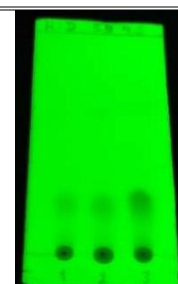
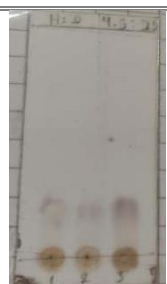
Apéndice K. TLC en fase directa con hexano-diclorometano

**H:D
5:5**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 5:5 en H:D, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.

**H:D
4.5:5.5**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 4.5:5.5 en H:D, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una suficiente separación.

**H:D
6:4**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 6:4 en H:D, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una muy buena separación.

**H:D
7:3**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 7:3 en H:D, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que no hay una muy buena separación.


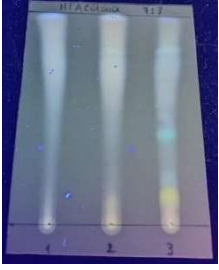
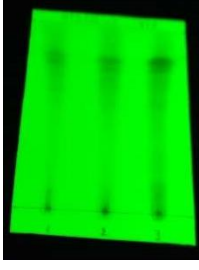
**Diclorometano
100% puro**



Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 100% Diclorometano, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra corre en su mayoría



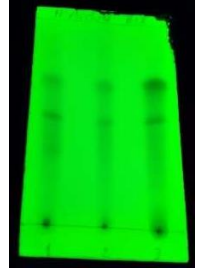
Apéndice L. TLC en fase directa con hexano-acetona

**Hexano: Acetona
7:3**

		
M1 M2 M3	M1 M2 M3	M1 M2 M3

Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 7:3 en Hexano: Acetona, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra se logra separar.

**Hexano: Acetona
8:2**

		
M1 M2 M3	M1 M2 M3	M1 M2 M3

Se realizó una TLC de las tres muestras (M1, M2, M3) a una polaridad de 8:2 en Hexano: Acetona, Fd., tras revelar con ácido sulfúrico y vainillina se puede determinar que la muestra se logra separar un poco.