



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 del
pericarpio de *Renealmia alpinia***

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

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Autora: Benítez Montaña, Gabriela Saraí

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, día de mes de año

Magister Claudia Teresa Cruz Erazo

Directora de la carrera de Bioquímica y Farmacia

Loja.-

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 del pericarpio de *Renealmia alpinia*, realizado por Gabriela Saraí Benítez Montaña 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: PhD. Omar Malagón Avilés

C.I.: 1725761322

Correo electrónico: omalagon@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Gabriela Saraí Benítez Montaña, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Estudio de composición química y posibles usos del pericarpio de *Renealmia alpinia*, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo uno. Marco teórico, Capítulo dos. Metodología, Capítulo tres. Discusión de resultados, Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones, siendo Omar Germán Malagón Avilés director 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.

.....

Autora: Gabriela Saraí Benítez Montaña

C.I.: 1106055138

Correo electrónico: gsbenitez1@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Al ser superior, dueño de todo lo existente. A la ciencia como contribución para su continuo avance. A mi madre y hermano por ser hincapié en esta aventura académica. Y sobre todo a mi persona, por mi dedicación, determinación y perseverancia.

Agradecimiento

Al ser supremo que me otorgó soplo de vida. A mi madre, Martha, por ser incondicional en mi formación y alentarme a continuar a pesar de las adversidades. A mi alma gemela, mi hermano Ronald, por su inmenso apoyo y ser un ejemplo de superación. A mis abuelos maternos, Dora y José, por ser fuente de amor, y siempre enaltecer mis logros. A mis personas especiales por ser pieza fundamental para no desmayar. A la Universidad Técnica Particular de Loja, por brindarme una academia de excelencia, expandir mis conocimientos y enamorarme de la ciencia. Finalmente, al Dr. Omar Malagón por su acompañamiento en esta etapa final de mi vida universitaria y ser inspiración de erudición.

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 de Zingiberaceae Martinov	5
1.2. Distribución de la familia Zingiberaceae Martinov.....	6
1.3. Género <i>Renealmia</i> L.f.....	7
1.3.1. <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.....	7
1.3.2. Usos tradicionales de <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Mass	9
1.4. Metabolitos secundarios	10
1.4.1. Antocianinas.....	10

1.4.2. Aplicaciones de las antocianinas.....	11
1.5. Métodos de extracción y purificación.....	12
1.5.1. Obtención de extractos	13
1.5.1.1. Maceración	13
1.5.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	13
1.5.3. Cromatografía en columna	14
1.6. Elucidación estructural.....	14
1.7. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	15
1.8. Espectroscopia de masas	16
1.9. Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC-MS acoplada a un detector de arreglo de diodos DAD	16
1.10. Cuantificación de antocianinas por diferencial de pH.....	17
1.11. Prototipos para el desarrollo de productos de materias primas vegetales	17
1.11.1. Desarrollo de productos ricos en antocianinas	17
Capítulo dos	19
Metodología.....	19
2.1. Recolección de la materia prima.....	19
2.2. Obtención del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>	19
2.3. Preparación de extracto del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>.....	19
2.3.1. Deshidratación	19

2.3.2. Trituración	20
2.3.3. Maceración	20
2.3.4. Filtrado y concentrado.....	21
2.4. Estudio cromatográfico para la separación de metabolitos secundarios a través de TLC en fase directa.....	22
2.4.1. Uso de mezcla de solventes y polaridades	22
2.4.2. Cromatografía en TLC preparativa.....	24
2.5. Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar moléculas.....	26
2.6. Análisis mediante cromatografía HPLC-MAS-DAD para la determinación del peso molecular de metabolitos secundarios	26
2.7. Cuantificación por diferencial de pH para la determinación de la cantidad de antocianinas totales en el extracto del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>.....	27
2.8. Propuesta de prototipos para el desarrollo de productos a partir de antocianinas.....	28
Capítulo tres	30
Discusión de resultados.....	30
3.1. Separación de compuestos a través del método cromatográfico TLC en fase directa.....	30
3.1.1. Separación de metabolitos a través del método cromatográfico TLC preparativa.....	32
3.2. Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN)	33

3.3. HPLC-MS-DAD	37
3.4. Cuantificación por diferencial de pH	38
3.5. Desarrollo de la preformulación de prototipos	39
3.5.1. Estandarización del compuesto bioactivo para la formulación de productos....	40
3.5.2. <i>Sérum exfoliante</i>	41
3.5.2.1. Esquematización del proceso de manufactura del sérum exfoliante....	43
3.5.3. <i>Bolsas de té de frutos rojos enriquecidas con Renealmia alpinia</i>	44
3.5.3.1. Esquematización del proceso de manufactura de bolsas de té de frutos rojos con extracto de Renealmia alpinia	45
3.5.4. <i>Suplemento dietético en forma de cápsulas de polvo</i>	45
3.5.4.1. Esquematización del proceso de manufactura de cápsulas de polvo con antocianinas del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>	48
Conclusiones	49
Recomendaciones	51
Referencias	52
Apéndice.....	59
Apéndice A. Mezcla de solventes y polaridades usadas en la separación de metabolitos por TLC	59
Apéndice B. Espectros de HPLC del compuesto 1.....	66
Apéndice C. Espectros de HPLC del compuesto 2.....	66

Apéndice D. Espectro de HPLC del compuesto 3.....	66
Apéndice E. Espectros de HPLC del compuesto 4.....	66

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.....	8
Tabla 2 Mezcla de solventes y polaridades separación de metabolitos	23
Tabla 3 Análisis en RMN de los compuestos aislados.....	26
Tabla 4 Análisis en HPLC-MAS-DAD de los compuestos aislados	27
Tabla 5 Mezcla de solventes y polaridades.....	30
Tabla 6 Rf del recorrido de los metabolitos aislados	31
Tabla 7 Datos obtenidos por HPLC y compuesto al que se asocia.....	38
Tabla 8 Excipientes candidatos para la elaboración de un sérum exfoliante.....	41
Tabla 9 Preformulación propuesta para la elaboración de un sérum exfoliante.....	43
Tabla 10 Preformulación propuesta para la elaboración de bolsas de té.....	44
Tabla 11 Excipientes candidatos para la elaboración de cápsulas de polvo	46
Tabla 12 Preformulación propuesta para la elaboración de cápsulas de polvo.....	47

Índice de figuras

Figura 1 Imagen de cromolitogrado de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	5
Figura 2 Mapa de distribución geográfica de especies de la familia <i>Zingiberaceae</i> Martinov.....	6
Figura 3 <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas., en estado inmaduro	8

Figura 4 Mapa de la distribución geográfica de <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.....	9
Figura 5 Clasificación de las antocianinas	11
Figura 6 Deshidratación del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>	20
Figura 7 Pericarpio deshidratado y triturado	20
Figura 8 Macerado del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>	21
Figura 9 Filtrado y concentrado del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i>	22
Figura 10 Tlc en fase directa	24
Figura 11 Tlc preparativa en fase directa	25
Figura 12 Balones con los compuestos aislados por tlc	25
Figura 13 Separación de tres metabolitos en tlc	30
Figura 14 TLC preparativa bajo luz UV	32
Figura 15 Tlc de cada compuesto aislado.....	33
Figura 16 Espectros del compuesto 1 en acetona.....	34
Figura 17 Espectros del compuesto 2 en ácido trifluoracético, metanol 95:5.....	34
Figura 18 Espectros del compuesto 3 en acetona.....	35
Figura 19 Espectros del compuesto 4 en ácido trifluoracético, metanol 90:10.....	36
Figura 20 Antocianinas identificadas en <i>Vaccinium</i> por HPLC-UV/DAD	37
Figura 21 Esquematización del proceso de manufactura del sérum exfoliante	44
Figura 22 Esquematización del proceso de manufactura de bolsas de té.....	45

Figura 23 Esquematización del proceso de manufactura de cápsulas de polvo 48

Resumen

Las comunidades indígenas de la Amazonía ecuatoriana poseen un gran potencial botánico-silvestre, por lo que nace la necesidad de dar a conocer la importancia de estos recursos con aplicabilidad industrial a través de análisis de laboratorio. En este contexto, el presente trabajo se enfoca en una de estas especies: *Renealmia alpinia*, una planta herbácea de la familia *Zingiberaceae*, cuyo pericarpio color rojo-negro en estado de maduración confiere capacidad tintórea y benéfica para la salud por su contenido en antocianinas. La metodología empleada para caracterizar los componentes bioactivos fue TLC preparativa, HPLC-MAS-DAD, cuantificación por diferencial de pH y RMN, no obstante, este último debido a la indisponibilidad de solventes adecuados según bibliografía no resultó ser un método factible. En cuanto a los resultados, por medio de las técnicas mencionadas, se aislaron tres metabolitos y se determinó que el pericarpio posee una cantidad total de antocianinas de 0.862mg/100g, siendo constituido mayoritariamente por cianidina-3-o-glucosa, cianidina-3-o-galactosa, delphinidina-3-o-glucosa y delphinidina-3-o-galactosa. Por consiguiente, en función a la caracterización, se propuso el prototipo de tres productos: un serum exfoliante, bolsas de té, y cápsulas de polvo con antocianinas.

Palabras clave: antocianinas, pericarpio, prototipo.

Abstract

The indigenous communities of the Ecuadorian Amazon possess a great botanical and wild potential, which gives rise to the need to make known the importance of these resources with industrial applicability through laboratory analysis. In this context, the present work focuses on one of these species: *Reineckia alpinia*, an herbaceous plant of the *Zingiberaceae* family, whose red-black pericarp when ripe has tinctorial and beneficial capacity for health due to its anthocyanin content. The methodology used to characterize the bioactive components was preparative TLC, HPLC-MAS-DAD, quantification by differential pH and NMR, however, the latter, due to the unavailability of suitable solvents according to the literature, did not turn out to be a feasible method. Regarding the results, by means of the mentioned technical quantities, three metabolites were isolated and it was determined that the pericarp [outer layer of the fruit] possesses a total amount of anthocyanins of 0.862 mg/100g, mainly consisting of cyanidin-3-o-glucose, cyanidin-3-o-galactose, delphinidin-3-o-glucose, and delphinidin-3-o-galactose. Therefore, based on the characterization, the prototype of three products was proposed: an exfoliating serum, tea bags, and anthocyanin powder capsules.

Keywords: anthocyanins, pericarp, prototype.

Introducción

En la actualidad, en el marco del debate de la explotación de los recursos renovables y no renovables ha surgido la importancia de generar nuevas fuentes económicas a partir de recursos renovables sustentables. Las comunidades indígenas, especialmente de la Amazonía ecuatoriana tienen un gran potencial en cuanto a botánica silvestre, dado el caso se origina la necesidad de dar a conocer a estas comunidades los recursos presentes en sus territorios a través de análisis de laboratorio, fomentando de esta manera la comercialización de materia prima para su posterior tratamiento y aprovechamiento a nivel industrial (Inabio, 2019) .

Algunas instituciones de educación superior dedicadas a la investigación como las universidades en su afán de apoyar las comunidades indígenas evalúan la actividad biológica de la botánica amazónica y su potencial en el desarrollo de productos sustentables, garantizando la generación de recursos que en primera instancia beneficien a los pueblos originarios, y la vida silvestre involucrada (Inabio, 2019).

Renealmia alpinia nativa de estos pueblos es una planta herbácea perteneciente a la familia *Zingiberaceae*, de contextura vigorosa, con rizomas y vainas estriadas cubiertas distintamente por pelo, hojas elípticas, inflorescencia en su racimo basal, color rojizo, flores amarillas y un fruto globoso generalmente color rojo-negro que en estado de madurez tiene una gran capacidad tintórea brindando una coloración azul oscura duradera al tener contacto (Sandí, 2019).

Generalmente las plantas de este género se encuentran distribuidas ampliamente a lo largo de los trópicos de América y África, con un total de 82 especies, de las cuales 62 se hallan en América, y crecen en alturas comprendidas entre 50 y 1500 msnm (Sandí, 2019). En Ecuador específicamente para el pueblo Shuar, el fruto de esta especie constituye una

valiosa fuente nutritiva y se destaca por su sabor picante, además de ser una importante tintura de color llamativo para matizar sus artesanías (Jiménez, 2017).

A nivel químico, el grupo natural que compone la mayor parte de los compuestos naturales coloreados son los flavonoides, que además de presentar una amplia gama de coloraciones, presenta consigo efectos beneficiosos para la salud como hepatoprotector, antioxidante, colerético, dilatador arterial, entre otros; esto principalmente debido a las sustancias fenólicas formadas por dos anillos bencénicos y unidos por un puente de tres átomos de carbono. Es así como se dividen en antocianinas, isoflavonas, auronas, flavonas, flavononas, flavonoides, chalconas, flavandioles y dihidroflavonoides, diferenciados por sus diversos grupos que se sustituyen alrededor del esqueleto básico, y con coloraciones llamativas, como, azul, rojo y morado (Jiménez, 2017).

Con estos antecedentes, el presente trabajo de integración curricular (TIC), tiene como objetivo estudiar la composición química del pericarpio de *Renealmia alpina* para buscar alternativas de uso sustentable, así como caracterizar químicamente el pericarpio de *Renealmia alpina*, y proponer el uso potencial del pericarpio de la especie, en función de su composición química.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1. Familia de Zingiberaceae Martinov

Con base en la última publicación del APG IV, el orden los *Zingiberales* Griseb. Incluye 8 familias: *Cannaneae* Juss., *Costaceae* Nakai, *Heliconiaceae* Vines, *Lowiaceae* Ridl., *Marantaceae* R.Br., *Musaceae* Juss., *Strelitziaceae* Hutch. & *Zingiberaceae* Martinov (The Angiosperm Phylogeny Group , y otros, 2016).

La familia *Zingiberaceae* fue descrita formalmente por el botánico ruso Iván Martinov en su obra “Техно-ботанический словарь на латинском и русском языках”, tomando como generotipo a *Zingiber Mill* la cual, a su vez, toma como especie tipo al célebre jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, Sinónimo: *Amomum zingiber* L. especificado previamente por el famoso naturalista sueco Carl Von Linnaeus (Martinov, 1820).

Figura 1

Imagen de cromolitograbado de *Zingiber officinale* Roscoe



Nota. Various parts of the ginger plant (*Zingiber officinale*) [Fotografía]. Adaptado de *Phytochemistry and Bioactivities of Quranic Plant, Zanjabil-Ginger*, por (Sarfraz & Shoaib, 2015).

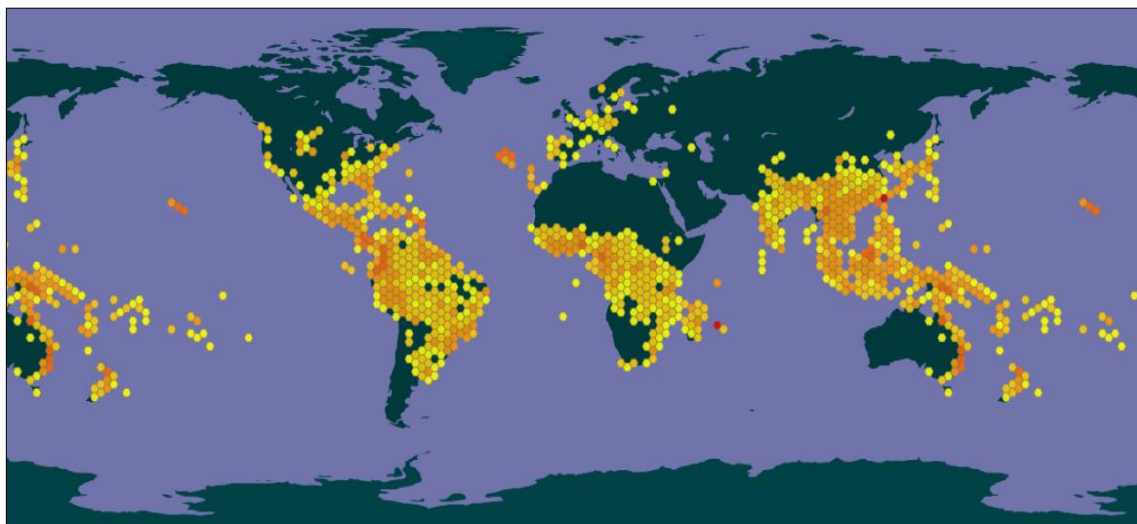
1.2. Distribución de la familia Zingiberaceae Martinov

Principalmente se encuentra en áreas tropicales de América, África y Asia. Empero, se considera al Sudeste asiático como uno de los mayores puntos de distribución de endemismos (Li, Li, Wang, Xu, & Zhu, 2021). Se ubica a los ancestros de la familia a mediados del periodo Cretácico en el norte de lo que actualmente se conoce como África, dispersándose y diversificándose evolutivamente durante el Paleoceno en territorios tropicales asiáticos (Zhao, y otros, 2022).

En Ecuador exclusivamente se reportan la presencia de 6 géneros, las cuales incluyen a 31 especies, donde el género *Renealmia* L. f. abarca la mayoría de las especies (León, 2011).

Figura 2

Mapa de distribución geográfica de especies de la familia Zingiberaceae Martinov



Nota. Adaptado de *Zingiberaceae* in GBIF Secretariat [Fotografía], por (The Catalogue of Life Partnership, 2022).

1.3. Género *Renealmia* L.f.

Descrito por el naturalista sueco Carolus Linnaeus Filius en su obra *Supplementum Plantarum* (Biodiversity Heritage Library, 1782), tomando como especie tipo a *Renealmia exaltata* L.f., incluye 82 especies aceptadas distribuidas en las regiones tropicales de América y África.

En el territorio ecuatoriano se reportan alrededor de 31 especies distribuidas mayormente al noroccidente de la cordillera en elevaciones menores a 2500 m; y hasta el momento, se registra la existen 4 especies endémicas: *R. aurantifera* Maas, *R. dolichocalyx* Maas, *R. oligotricha* Maas y *R. sessilifolia* Gagnep (León, 2011).

1.3.1. *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas

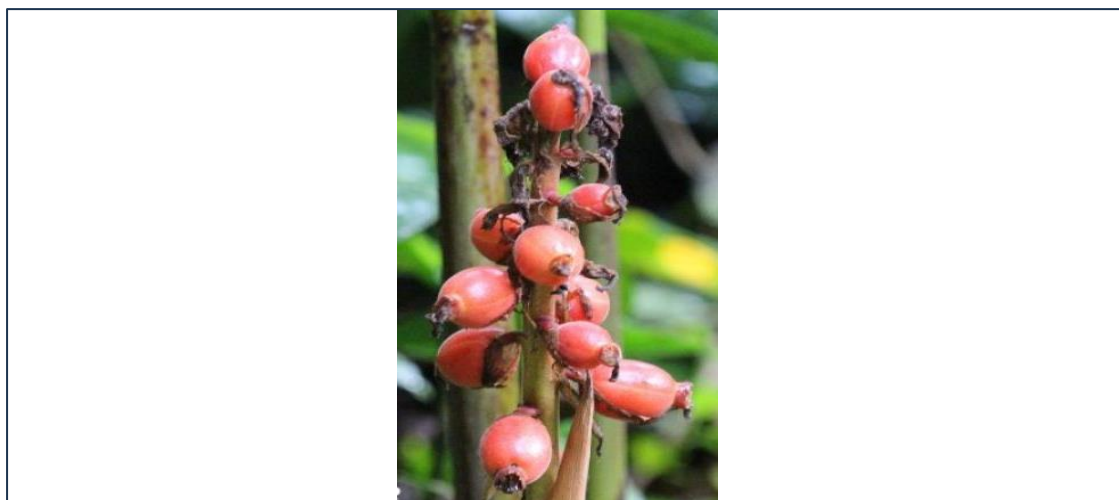
Renealmia alpinia (Rottb.) Mass se cataloga dentro del género *Amomum* Roxb. como *Amomum alpinia* (Rottb.), originalmente descrita por el naturalista danés Christen Rottbøll basado en una muestra de Surinam (Rottbøll, 1775).

Dos siglos después, el botánico neerlandés Paulus Mass (1975) en una publicación del Acta botánica Neerlandica trasladó la especie al género *Renealmia* L.f. Mass.

Se tiene conocimiento que esta especie se distribuye desde México hasta las regiones selváticas del centro-norte de Sudamérica. Crecen en forma de hierbas con tallos subterráneos llamados rizomas y hojas en forma elíptica generalmente sésiles. Su principal característica son sus drupas agrupadas en racimos, cuyos pericarpios presentan tonalidades rojizas a púrpuras muy llamativas (Macía, 2003).

Figura 3

Renealmia alpinia (Rottb.) Maas., en estado inmaduro



Nota. *Renealmia alpinia* [Fotografía]. Adaptado de Ecos de Bosque, por (Tropicos, 2019).

Tabla 1

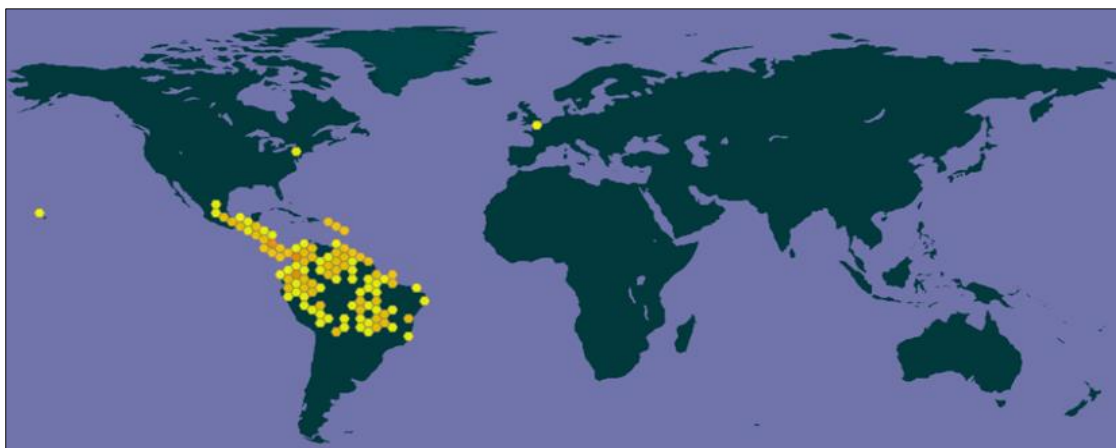
Clasificación taxonómica de Renealmia alpinia (Rottb.) Maas

Reino	Plantae
Clado	<i>Tracheophyta</i>
Clado	<i>Spermatophyta</i>
Clado	<i>Angiospermae</i>
Clado	<i>Monocotyledoneae</i>
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Orden	<i>Zingiberales Griseb.</i>
Familia	<i>Zingiberaceae Martinov</i>
Género	<i>Renealmia L.f.</i>
Especie	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Mass
Autor/es epíteto específico	Christen Rottbøll, 1775; Paulus Mass, 1975
Basiónimo	<i>Amomum alpinia</i> (Rottb.), 1775

Nota. Adaptado de las publicaciones disponibles en (Tropicos, 2019). *Societatis Medicae Havniensis Collectanea* 2: 245–248, t. 1. 1775. *Acta Botanica Neerlandica* 24 (5–6): 474

Figura 4

Mapa de la distribución geográfica de Renealmia alpinia (Rottb.) Maas



Nota. Tomado de *Zingiberaceae* in GBIF Secretariat (The Catalogue of Life Partnership, 2022).

1.3.2. Usos tradicionales de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Mass

En Ecuador, en las comunidades shuar de la Amazonía recibe los nombres tradicionales de “Chiqui” y “Tapioka-Kumpía”, usada tradicionalmente como alimento y para la extracción de colorantes empleado en la decoración de artesanías (Namicela, 2010).

En otros países recibe otros nombres: Colombia (guaiporé, naiku, sictia, sieunka, pintura negra), Guatemala (jazmín o gengibre de monte), México (cargamomo, ixquihit, x’quijit), Panamá (chírca) (Namicela, 2010).

Se registra a que las semillas de *Renealmia alpinia* tienen propiedades antiofídicas, utilizada en infusiones para contrarrestar el veneno (Moreno, 2022), estudios que coinciden con los resultados encontrados por Alarcón *et al.*, (2008) y Fernández *et al.*, (2010) quienes afirman en sus propiedades activas y coadyuvantes, respectivamente, contra el veneno de *Bothrops asper*.

En México, en la etnia Totonaca ubicada en la Sierra Norte de Puebla se emplean sus frutos en la elaboración de una crema que acompaña las tradicionales tortillas, sus hojas se utilizan para envolver tamales y parte de sus vainas foliares envolventes se utilizan en el hoyo donde la planta es sembrada para evitar que los roedores se coman la semillas (Macía, 2003).

1.4. Metabolitos secundarios

Los metabolitos cumplen diversas funciones en los seres vivos, además de tener capacidades diferentes, y normalmente se distingue entre metabolismo primario y secundarios (Quiored, 2002).

Los primeros tienen que ver con los procesos fotosintéticos dando lugar a los ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs de bajo peso molecular y que están ampliamente distribuidos, como: alfa-aminoácidos, carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos implicados en los procesos vitales (Quiored, 2002).

Los metabolitos secundarios por otra parte se sintetizan en concentraciones variables diferentes compuestos químicos, no actúan directamente en el metabolismo de las plantas ni en su función, y se ha demostrado que se actúan como mecanismo de defensa (Verdecía, y otros, 2021).

Estos últimos se clasifican en: terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, tetraterpenos, politerpenos), fenólicos (cumarinas, furanocumarinas, ligninanos, flavonoides, isoflavonoides, taninos), nitrogenados (alcaloides, glucósidos cianogénicos, aminoácidos no protéicos), azufrados (glutatión, glucosinolatos, fitoalexinas, tioninas, defensinas, allininas) (Twajj & Hasan, 2022).

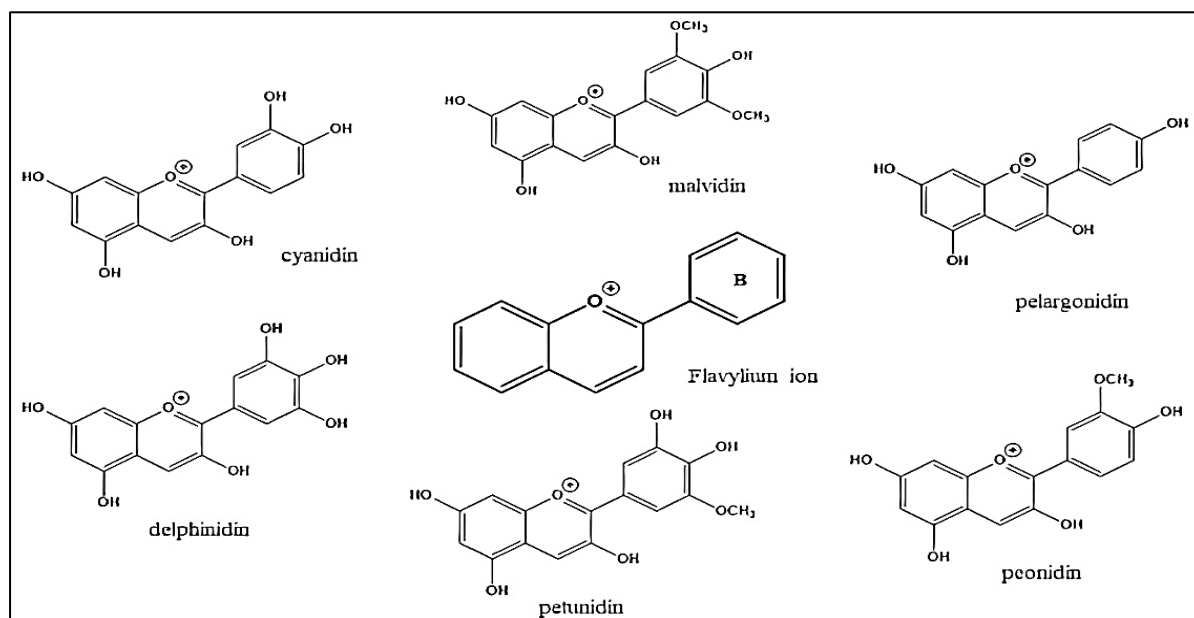
1.4.1. Antocianinas

Las antocianinas son un tipo de compuestos fenólicos, clasificados dentro del grupo de los flavonoides. Su centro tiene un ión flavilium (2-fenilcromenilium), el cual en función de sus sustituyentes R se clasifican en: cianidinas, delphinidinas, pelargonidinas, petunidinas, peonidinas y malvidinas.

Generalmente las antocianinas son las formas 3-O-glicosidadas de las antocianidinas, y su coloración oscila entre rojizo a púrpura azulado en función al valor del pH del medio en el que se encuentren (Mottaghipisheh, y otros, 2022).

Figura 5

Clasificación de las antocianinas



Nota. Adaptado de *The promising therapeutic and preventive properties of anthocyanidins/anthocyanins on prostate cancer*, por Mottaghipisheh et al., 2022, por (Mottaghipisheh, y otros, 2022).

1.4.2. Aplicaciones de las antocianinas

Entre las principales aplicaciones que se les atribuye a las antocianinas es su capacidad tintórea, tanto para proporcionar color a los alimentos como a distintos objetos, es por ello que su aplicación es de relevante utilidad ya que sugieren un reemplazo de colorantes

sintéticos por colorantes naturales; que, además, en base a sus propiedades antioxidantes tiene beneficios funcionales para la salud (Voigt, Bornschein, & Cachaza, 1982).

En la industria, la aplicación de las antocianinas depende principalmente del color que se desea obtener y la matriz en la cual se vaya a aplicar, pues los colores que presentan naturalmente estos compuestos difieren según el medio y la naturaleza de las frutas y vegetales que los contengan (Jibaja & Tuitice, 2021).

Cada antocianina tiene su color singular, este va a depender del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos; por ejemplo, cuando se tiene un incremento en la hidroxilación se produce un color azul, mientras que si incrementa la metoxilación se produce un color rojo (Chen et al., 2018). La acilación es una de las reacciones que ocurren frecuentemente, algunos azúcares pueden estar acilados con los derivados de los ácidos orgánicos como ácido acético, p-cumárico, ferúlico, entre otros (Astrid, 2008). Estos grupos acilo proporcionan cierta estabilidad a las antocianinas en cambios extremos de pH y temperatura (Jibaja & Tuitice, 2021).

Para la producción de productos con antocianinas que mantengan el color y también su capacidad antioxidante es necesario primeramente realizar un estudio bibliográfico en donde se muestren las investigaciones acerca de las aplicaciones actuales que tienen las antocianinas como colorantes, así como las técnicas de extracciones emergentes que puedan disminuir costos, aumentar rendimientos y estudios de la pigmentación que pueden mejorar la idoneidad de estos pigmentos como colorantes naturales rentables e ino cuos (Jibaja & Tuitice, 2021).

1.5. Métodos de extracción y purificación

La literatura indica que la correcta extracción de antocianinas se realiza por una repetida maceración en cantidades mayoritarias de metanol o etanol a temperatura ambiente

o en frío usando ácidos débiles para evitar la degradación del pigmento, conjuntamente, la adición de agua en menores proporciones (10%-15%) en algunos casos permite una extracción completa dependiendo de la planta según Strack y Wray, 1989 (Brenda, 2001).

Por consiguiente, la purificación es un paso trascendental, debido a que en la extracción se arrastran contaminantes que pueden afectar la estabilidad o el análisis del pigmento, por lo cual para este procedimiento se recomienda el uso de una fase sólida para la extracción (PVPP y C18) que permita remover una gran cantidad de compuestos interferentes como azúcares o ácidos (Brenda, 2001).

1.5.1. Obtención de extractos

Para la obtención de extractos de las distintas plantas existen diferentes procesos, tanto, físicos, químicos como microbiológicos, y se realizan a partir de una fuente vegetal y utilizable en cualquier campo de la industria química y médico-farmacéutica (Treybal, 1986).

1.5.1.1. Maceración. La maceración por su parte consiste en un tipo de extracción física que se realiza generalmente a temperatura ambiente (Voigt, Bornschein, & Cachaza, 1982), y se fundamenta en el remojo del material vegetal que ha sido debidamente fragmentado en un solvente como agua, etanol o glicerina para que éste penetre y disuelva las porciones solubles; luego se tapa y se deja en reposo por un período entre 2 a 14 días con agitaciones esporádicas. Posterior, el líquido es filtrado, se extrae el residuo, y se elimina el solvente en un rotaevaporador rotatorio para obtener el extracto (González, 2004).

1.5.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography) es una técnica analítica que consiste en la separación de los componentes de una muestra por su migración diferencial a través de una capa delgada de adsorbente, sostenido por una

superficie plana inerte, en otras palabras, la separación se realiza de acuerdo con los coeficientes de reparto de las moléculas de la muestra.

Esta técnica permite determinar la pureza de un compuesto, identificar y comparar analitos; asimismo, es de fácil comprensión y ejecución, lo que posibilita realizar separaciones en corto tiempo, versátiles y de bajo costo.

1.5.3. Cromatografía en columna

Se trata de un método físico empleado para la separación que se fundamenta en la diferencia de repartición de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, la prima móvil y la segunda estacionaria; donde sus moléculas de soluto son retenidas por la fase estacionaria y luego arrastradas por la fase móvil, de manera que, en caso de que los componentes de la mezcla muestran diferentes acercamientos por alguna de estas fases, sus velocidades medias de avance en el sistema serán distintas, y la afinidad se puede establecer por las fuerzas de *Van der Waals*, puentes de hidrógeno o transferencia de carga.

Aquí, los componentes que sean retenidos con fuerza por la fase estacionaria se moverán más lentamente a lo largo de dicha fase que aquellos que se unen débilmente; como consecuencia de esta diferencia de movilidad los componentes de la mezcla se separan en bandas discretas, que pueden ser analizadas cualitativa o cuantitativamente mediante el uso de los detectores adecuados (Vallejo, Barrios, & Anaya, 2021).

1.6. Elucidación estructural

Esta fase de diagnóstico permite tomar una decisión en cuanto a identificación estructural de las moléculas de aquellos compuestos en estudio. Como apoyo existen algunas técnicas instrumentales para este llevar a cabalidad este objetivo, como: la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Espectroscopia IR, la Espectroscopia UV-VIS y la Espectrometría de Masas (Pretsch, Clerc, Seibl, & Simon, 1970).

La elucidación estructural abarca todas las técnicas y métodos espectroscópicos para describir de forma detallada y concisa una estructura molecular según la información obtenida sobre su estereoquímica, grupos funcionales y peso molecular (Pretsch, Clerc, Seibl, & Simon, 1970).

1.7. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear se fundamenta en el sometimiento de aquellos núcleos con espines distintos de cero, a un campo magnético externo (B_0) generado por un magneto superconductor, recubierto por un 50 criostato compuesto de 2 cámaras al vacío, una superficial de preenfriamiento que contiene nitrógeno líquido a 77 K y una interna de helio líquido a 4 K, cuya estructura que contiene al magneto es soportada por unas fuertes bases anti vibratorias (Ruiz, 2020).

Esta técnica espectroscópica es de tipo no destructivo es útil en la determinación de las estructuras de los compuestos orgánicos, proporciona información acerca de la identificación de moléculas mediante la elucidación de sus estructuras moleculares, con base en las propiedades mecánico-cuánticas, magnéticas de los núcleos atómicos e implementación de radio frecuencias (Ruiz, 2020).

En la fase de preparación, el magneto superconductor causa el ordenamiento de los núcleos analizados en diferentes estados de energía, y en la fase de detección, mediante la Transformada de Fourier (FT) se utiliza el FID para obtener el espectro de RMN, donde el eje de las abscisas corresponde al eje de frecuencias en el cual se observa el desplazamiento químico y el eje de las ordenadas donde se manifiestan la intensidad de las señales (Rifai, Wittwer, & Horvath, 2018).

1.8. Espectroscopia de masas

Potente técnica analítica cualitativa usada en la caracterización de moléculas orgánicas según el peso molecular obtenido de los patrones de fragmentación de sus iones. Los espectros están estructurados por la abundancia relativa vs la relación masa-carga m/z de sus iones.

A diferencia de otras técnicas analíticas, la espectrometría de masas es de carácter destructivo ya que una vez procesado el analito no se puede recuperar. No obstante, su alta sensibilidad le otorga una ventaja al ser únicamente necesaria una pequeña cantidad para llevarse a cabo (Rifai, Wittwer, & Horvath, 2018).

1.9. Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC-MS acoplada a un detector de arreglo de diodos DAD

Se emplea en el análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos orgánicos en mezclas multicomponentes, como extractos vegetales; esta técnica consiste en un sistema totalmente automatizado que contiene una columna, un contenedor y bomba de fase móvil, un inyector y un detector, y se encuentra controlado por un programa informático que registra los cromatográficos y los picos individuales (Waksmundzka & Sherma, 2010).

El detector de fotodiodos UV/VIS (DAD), es el que usa más a menudo, y favorece a la recopilación paralela de cromatogramas en un rango de longitudes de onda, de manera que proporciona más información acerca de la constitución de la muestra. De igual manera el UV de cada pico da la selección de longitud de onda óptima para comprobar la pureza e identidad del pico (Waksmundzka & Sherma, 2010).

1.10. Cuantificación de antocianinas por diferencial de pH

Esta cuantificación sugiere un método espectrofotométrico basado en la transformación de la estructura de las antocianinas en función al cambio de pH (rojizas pH1, incoloros pH 4.5). Para ello, se deben preparar diluciones con el extracto etanólico junto con una solución buffer a un pH de 1 de cloruro de potasio y una solución buffer a un pH de 4.5 de acetato de sodio (Martínez N. , y otros, 2011)

Después de la preparación de las diluciones, se mide las absorbancias de las muestras a la longitud de onda de 500 y a 700 nm, se emplea la fórmula para antocianinas totales: $A.T.(mg/L)=A*PM*FD*1000/\epsilon$, tomando en consideración la concentración molar por la fórmula de Lambert-Beer: $C=A/\epsilon L$, el peso molecular del antociano que se encuentra en casi total proporción como por ejemplo la cianidina, el factor de dilución utilizado, y la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (ϵ), como constante física (Martínez N. , y otros, 2011).

1.11. Prototipos para el desarrollo de productos de materias primas vegetales

El desarrollo de prototipos primordialmente se fundamenta en ensayos in vitro e in vivo obtenidos en investigaciones que sustentan el gran potencial bioactivo de los extractos vegetales para utilizar en la formulación de productos; estas formulaciones podrían ser empleadas en varios campos industriales incluyendo el alimentario, farmacéutico, agroquímico, cosmético, entre otros (Armendáriz, Álvarez, & Galindo, 2016).

1.11.1. Desarrollo de productos ricos en antocianinas

El desarrollo de productos ricos en antocianinas ofrece una alternativa positiva en sosiego a la creciente preocupación de los consumidores por los efectos que traen consigo los colorantes artificiales, siendo así la aplicación de estos compuestos en el mercado comercial como remplazo a los sintéticos (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011).

En la industria alimentaria, se usan en la incorporación de bebidas y alimentos sólidos como por ejemplo en la producción de tortillas, utilizando maíz morado o azul para colorearlas de forma natural; y en bebidas para la elaboración de jugos a partir de extractos frutales y vegetales con alto contenido de antocianinas (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011).

Otra industria que abre paso al empleo de estos compuestos activos como componente principal en sus formulaciones es la farmacéutica que además fomenta el consumo de estos como suplementos alimenticios con efectos realmente favorecedores para la salud (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011).

También, recientemente la industria cosmética se suma a esta iniciativa de reemplazo a los colorantes artificiales, formulando sus productos con extractos concentrados de vegetales y frutas que contengan antocianinas (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011).

Capítulo dos

Metodología

En este apartado se describe a detalle el proceso que se hizo para cumplir con los objetivos planteados.

2.1. Recolección de la materia prima

La recolección de la cumbía o kumpia se llevó a cabo en el centro Shuar Kaank Grande, ubicado en la parroquia San José de Morona del cantón Tiwintza, en la provincia de Morona Santiago, (-3.4832164, -78.5430364) bajo el permiso de investigación MAAE-ARSFC-2021-1233, con el voucher.

2.2. Obtención del pericarpio de *Renealmia alpinia*

Para la obtención del pericarpio se cortaron los frutos maduros de la *cumbía*, y se retiró el pericarpio que corresponde a la parte externa frutal del contenido de la pulpa que sostiene a las semillas.

2.3. Preparación de extracto del pericarpio de *Renealmia alpinia*

2.3.1. Deshidratación

Luego de retirar el pericarpio, se llevó a deshidratación durante 30 horas a 35°C.

Figura 6

Deshidratación del pericarpio de Renealmia alpinia



Nota. Pericarpio de *Renealmia alpinia* deshidratado [Fotografía], por (Benítez, 2022).

2.3.2. Trituración

Para conseguir una materia manejable y reducir el tamaño de las partículas, se trituró con un molino industrial hasta obtener un material pulverizado.

Figura 7

Pericarpio deshidratado y triturado



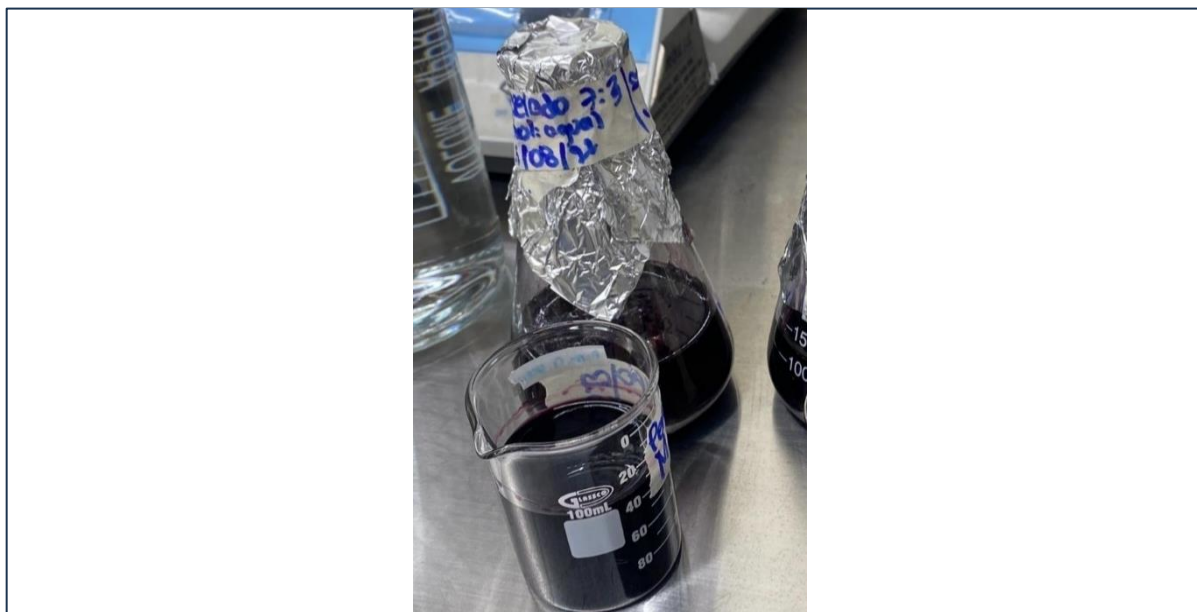
Nota. Pericarpio de *Renealmia alpinia* deshidratado y triturado [Fotografía], por (Benítez, 2022).

2.3.3. Maceración

Para extraer los compuestos químicos de la especie vegetal, se maceró el pericarpio con etanol al 99 % y agua destilada (7:3), cada 48 horas por tres veces.

Figura 8

Macerado del pericarpio de Renealmia alpinia



Nota. Macerado del pericarpio deshidratado de *Renealmia alpinia* [Fotografía], por (Benítez, 2022).

2.3.4. Filtrado y concentrado

Una vez macerado, se filtró con un kitasato y un embudo büchner, y se concentró en un rotaevaporador a 30°C aplicando vacío para eliminar trazar de etanol.

Figura 9

Filtrado y concentrado del pericarpio de Renealmia alpinia



Nota. Macerado del pericarpio de *Renealmia alpinia* filtrado y concentrado [Fotografía], por (Benítez, 2022)

Peso del extracto de 100gramos de cumbía = 20.2g

Rendimiento = (20.2/100)x100

Rendimiento = 20.2%

2.4. Estudio cromatográfico para la separación de metabolitos secundarios a través de TLC en fase directa

Se realizó un análisis cualitativo mediante distintas mezclas de solventes y polaridades con el objetivo de hallar la mezcla adecuada para lograr separar los compuestos contenidos en el extracto del pericarpio de *Renealmia alpinia*.

2.4.1. Uso de mezcla de solventes y polaridades

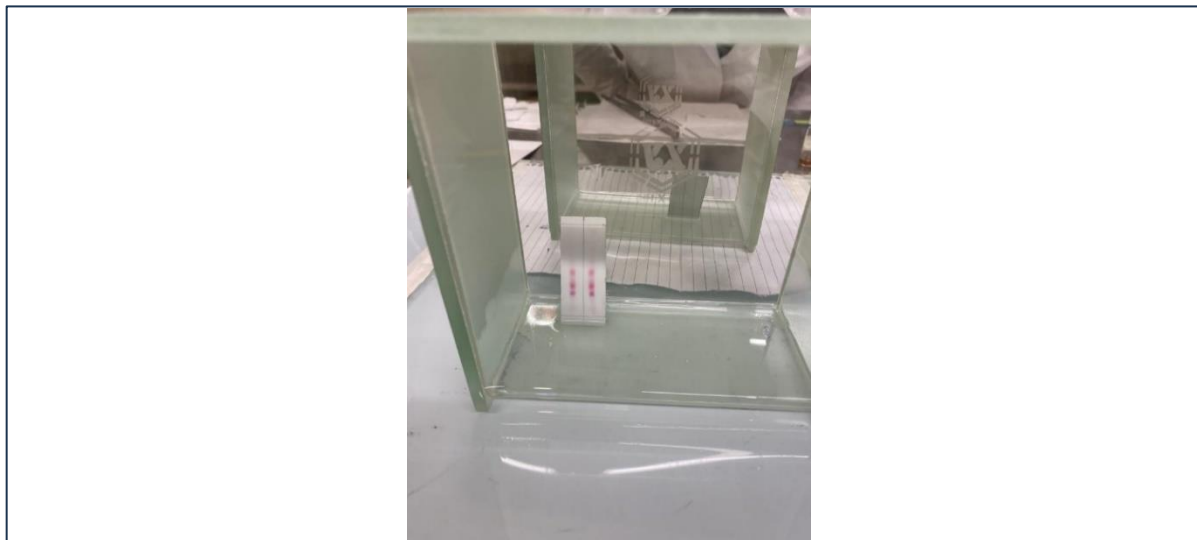
En relación con lo anterior, se probó con los siguientes disolventes y polaridades:

Tabla 2*Mezcla de solventes y polaridades separación de metabolitos*

Fase	Mezcla de solventes	Polaridades
	Etil acetato/ácido fórmico/agua	7:1.5:1.5
	n-butanol/acetato de butilo/ácido fórmico/agua	13:5:2:3
	n-butanol/acetato de butilo/ácido acético glacial/agua	13:5:2:3
	n-butanol/acetato de etilo/ácido fórmico/agua	13:3:2:3
Fase directa	Acetona/acetato de etilo/ácido fórmico/agua	10:11:2:4
		7:1:1:1.5*
	Acetato de etilo/metil-etil- cetona/ácido fórmico/agua*	6.5:1:1:1.5*
		6:1:1:2
	Acetato de etilo/ácido fórmico/agua	14:3:3
	<i>n-butanol/ácido glacial/agua</i> <i>acético</i>	12:3:5

Figura 10

Tlc en fase directa



Nota. Tlc en fase directa [Fotografía], por (Benítez, 2022).

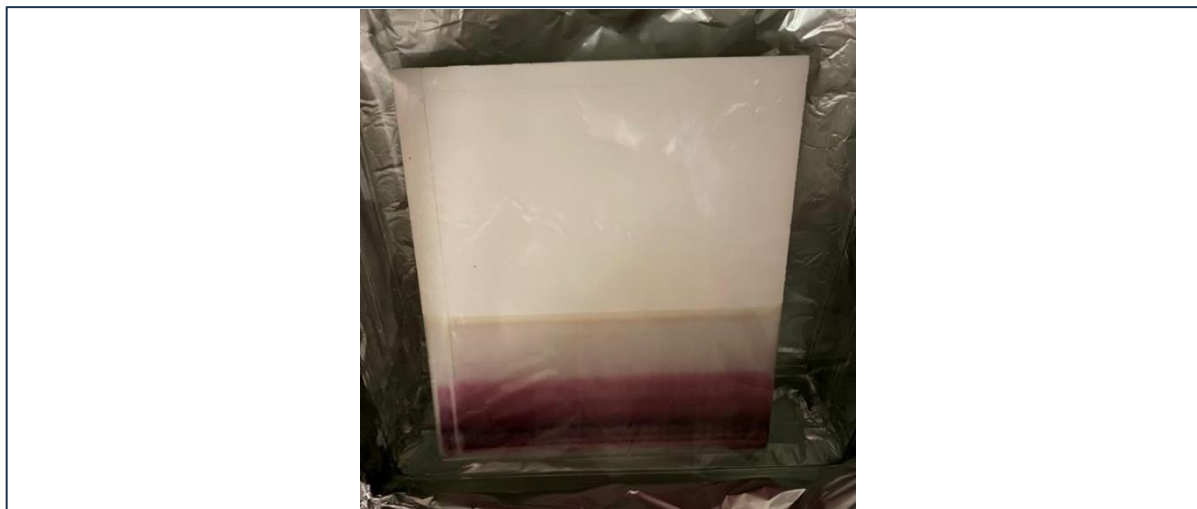
2.4.2. Cromatografía en TLC preparativa

Para la separación de muestras grandes se utilizó la metodología de TLC preparativa.

En una placa de vidrio de 20x10 cm recubierta de gel de sílice en fase directa se sembraron 20 mg del extracto diluidos en 2 ml de etanol, posteriormente, se ingresó a la cámara de TLC preparativa con la mezcla de solventes y polaridad establecida hasta que esta se absorba a lo largo de la placa y la separación de compuestos sea notoria.

Figura 11

Tlc preparativa en fase directa



Nota. Tlc preparativa en fase directa [Fotografía], por (Benítez, 2022).

Una vez terminada la separación de los compuestos, se visualizó bajo luz UV, y se señalaron los compuestos separados para empezar a retirar cada uno de ellos. En secuencia los compuestos ya retirados se filtraron y diluyeron con una mezcla de solventes (metanol 80%/agua 15%/ácido acético5%), en un balón de destilación hasta que el color contenido en la sílica se retiró por completo.

En sucesión cada balón con el compuesto contenido se rota-evaporó para eliminar las trazas de solvente y concentrar cada uno de ellos respectivamente. De la misma manera para asegurar que cada compuesto no contengan trazas se empleó CO₂ y vacío.

Figura 12

Balones con los compuestos aislados por tlc



Nota. Compuestos asilados de los fragmentos separados de la tlc preparativa [Fotografía], por (Benítez, 2022).

Finalmente, para asegurar que el compuesto aislado efectivamente correspondía cada uno de los fragmentos visualizado en la tlc preparativa, se realizó una tlc a cada uno de ellos y se comparó el Rf inicial de todos ellos, con la ecuación:

$$R_f = \frac{\textit{distancia recorrida por el compuesto}}{\textit{distancia recorrida por el disolvente}}$$

2.5. Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar moléculas

El primer análisis que se llevó a cabo es RMN en el equipo Magneto superconductor Bruker 500 MHz, para el experimento de Protón, Carbono, COSY, HMBC, HMQC, con los solventes que se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

Análisis en RMN de los compuestos aislados

Compuesto aislado	Solventes	Experimento
Compuesto 1	Acetona, ácido trifluoracético	Protón, Carbono 13, COSY, HMBC, HMQC
Compuesto 2	(TFA)/metanol 95:5, ácido trifluoracético/metanol	
Compuesto 3	90:10, metanol/agua	

2.6. Análisis mediante cromatografía HPLC-MAS-DAD para la determinación del peso molecular de metabolitos secundarios

Además, se empleó la técnica Cromatográfica Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), más Detector de Arreglo de Diodos (DAD), y detector espectrómetro de masas.

Tabla 4

Análisis en HPLC-MAS-DAD de los compuestos aislados

Análisis HPLC+DAD								
Compuesto Aislado	Equipo	Columna	Fase móvil	Gradiente	Cauda I	Temperatura	Volumen de inyección	Longitud de onda
Compuesto 1	Thermo scientific	BDS HYPERSIL C18.	FASE A: agua 95%/ácido acético 5%	0-10 min	0,8 ml/min	25 °C	10 ul	520 nm
				90% A-10% B				
Compuesto 2	Dionex ultimate 3000	Dim, (mm) 250x4,6	FASE B: metanol 55%/agua 40%/ácido acético 5%	10-20 min				
				70% A-30% B				
				20-30 min				
Compuesto 3				90% A-10% B				
Compuesto 4								

Nota. Representación de las condiciones empleadas para el análisis.

2.7. Cuantificación por diferencial de pH para la determinación de la cantidad de antocianinas totales en el extracto del pericarpio de *Renealmia alpinia*

Para la cuantificación de antocianinas totales se realizó el método diferencial de pH, con el objetivo de conocer la cantidad aproximada contenida en cierto gramaje del extracto para la formulación de productos en base a estos compuestos.

Primero se prepararon diluciones 1 mg del extracto etanólico con una solución buffer pH 1 de cloruro de potasio y con una solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio cada una para un balón de aforo de 25 ml, y con ello seguidamente, se calculó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 500 nm y a 700 nm.

La absorbancia (A) se calculó de la siguiente manera:

$$A = [A500 - A700]_{pH1} - [A500 - A700]_{pH4.5}$$

$$A = [0.254 \text{ nm} - 0.072 \text{ nm}] - [0.105 \text{ nm} - 0.052 \text{ nm}]$$

$$A = 0.129 \text{ nm}$$

En sucesión para calcular el contenido total de antocianinas se usó el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento que se presenta en mayor proporción, la cianidina (PM 449.2), cuya ecuación es:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * 1}$$

$$A.T \text{ (mg/L)} = \frac{0.129 \text{ nm} * 449.2 \text{ g/mol} * 4 * 1000 \text{ mg/L}}{26900 \text{ g/mol} * 1}$$

$$A.T \text{ (mg/L)} = 8.62 \text{ mg/L} \rightarrow 8.62 \text{ mg/kg}$$

Donde, A es la absorbancia obtenida, PM es el peso molecular de la cianidina, FD es el factor de dilución, y ϵ corresponde a la absorbancia molar.

Expresado en porcentaje:

$$8.62 \text{ mg} \rightarrow 1000 \text{ g}$$

$$x \rightarrow 100 \text{ g}$$

$$x = 0.862 \text{ mg}$$

$$\% = 0.862 * 100$$

$$\% = 86.2$$

2.8. Propuesta de prototipos para el desarrollo de productos a partir de antocianinas

Para este apartado se usó como herramienta de primera mano, el buscador “Google academic” y el buscador informático científico “CAS SciFinder” mediante los cuales se localizaron documentos, artículos, libros, e investigaciones acerca de la elaboración de

productos a partir de antocianinas; así como sitios web destinados a la promoción de productos cosméticos e industriales en los que se incluyen estos pigmentos vegetales con potencial de reemplazo a los colorantes sintéticos para la formulación de productos.

Capítulo tres

Discusión de resultados

3.1. Separación de compuestos a través del método cromatográfico TLC en fase directa

En la tabla 5 se muestran los resultados de la tlc en fase directa.

Tabla 5

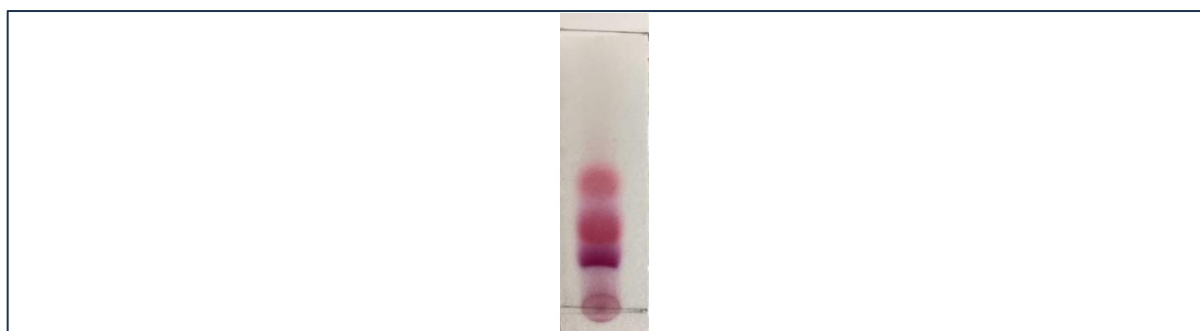
Mezcla de solventes y polaridades

Fuente	Fase	Solventes	Polaridad	Resultado
Extracto liofilizando del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i> (5 mg en 0.5 ml de etanol)	Directa	Etil acetato/metil- etil-cetona/ácido fórmico/agua	7:1:1:1.5*	Separación diferenciada de tres compuestos
			6.5:1:1:1.5*	Separación diferenciada de tres compuestos

Nota. En esta tabla se presenta la mezcla de solventes a dos polaridades distintas con las que se logró una correcta separación de compuestos en placas de gel de sílice.

Figura 13

Separación de tres metabolitos en tlc



Nota. Separación de tres metabolitos en tlc [Fotografía], por (Benítez, 2022).

En la imagen 13 se consigue observar en la tlc la separación diferenciada de tres compuestos, aquí también se tomó en cuenta el compuesto que se posiciona en la base de la lámina para posteriores análisis debido a su interesante coloración.

Las separaciones antes mostradas del extracto liofilizado del pericarpio de *Renealmia alpinia*, respondieron de manera óptima a la mezcla de: etil acetato, metil-etil-cetona, ácido fórmico, agua, tanto en la polaridad de 7:1:1:1.5, como de 6.5:1:1:1.5, según el método empleado por los autores (Vaccari & Pifferi, 1978) en su artículo "*New Solvents for Paper and Silica Gel Thin Layer Chromatography of Anthocyanins*" quienes además propusieron en su artículo otras 8 mezclas más; no obstante dichas mezclas no resultaron ser favorecedoras para la separación de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto.

Tabla 6

Rf del recorrido de los metabolitos aislados

Compuesto	Rf
Compuesto 1	0.4
Compuesto 2	0.25
Compuesto 3	0.1
Compuesto 4	0

En la tabla 6 a continuación se presenta el Rf que representa el recorrido de los metabolitos:

Por lo que en base a esto más adelante ayudó a la comparación entre la primera tlc que se hizo con esta mezcla a esta polaridad, frente a la tlc por separado de cada compuesto aislado.

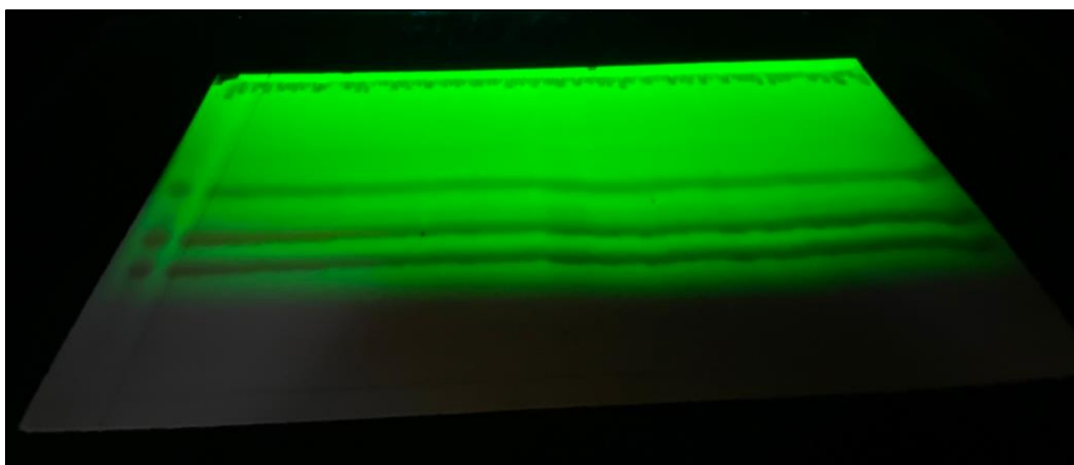
3.1.1. Separación de metabolitos a través del método cromatográfico TLC preparativa

Una vez encontradas las mezclas de solventes y las polaridades adecuadas para separar cada uno de los metabolitos, en la tlc preparativa se empleó la mezcla de etil acetato/metil-etil-cetona/ácido fórmico/agua a una polaridad de 7:1:1:1.5, debido a que esta concedió mayor visualización de las bandas fragmentadas dado el aumento del etil acetato.

A continuación, en la imagen 14 se presenta la tlc preparativa, donde se puede visualizar la separación diferenciada de tres fragmentos.

Figura 14

TLC preparativa bajo luz UV



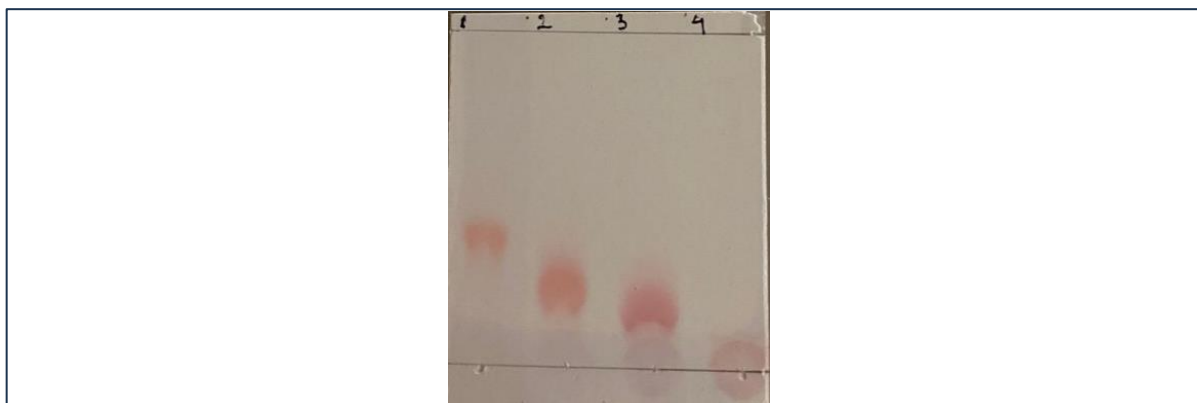
Nota. TLC preparativa con siembra de 20 mg del extracto [Fotografía], por (Benítez, 2022).

En la imagen es posible distinguir cada separación con coloraciones dentro de la gama de violetas, por cuanto efectuando un análisis observativo se puede inferir que se tratan de antocianinas y sus clasificaciones como la bibliografía lo describe (Garzón, 2008), ya que

estos pigmentos son responsables de esta escala de colores que se encuentran contenidas en las vacuolas de algunas frutas, hortalizas y cereales.

Figura 15

Tlc de cada compuesto aislado



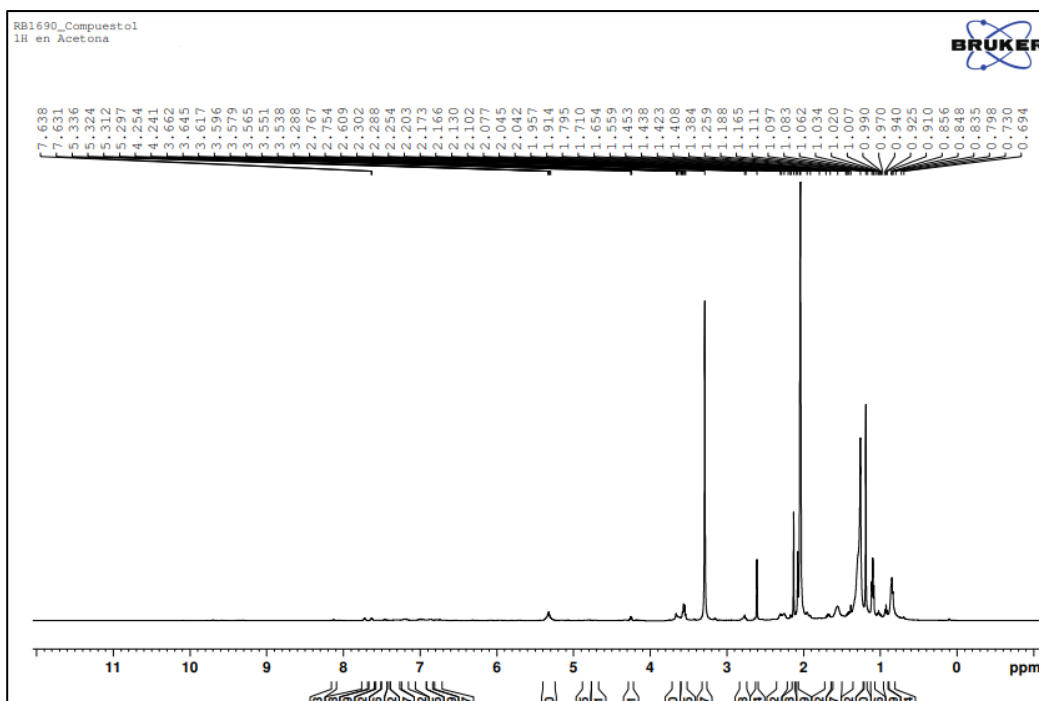
Nota. En la figura 15 se logra visualizar el recorrido de cada uno de los metabolitos aislados; se comparó con el Rf de la tlc modelo para asegurar que cada uno correspondía efectivamente al metabolito [Fotografía], por (Benítez, 2022).

3.2. Análisis en resonancia magnética nuclear (RMN)

Como la literatura lo sugiere en cuanto a la caracterización de antocianinas por RMN (Øyvind & Fossen, 2003), los solventes que han dado buenos resultados para este tipo de metabolitos son el ácido trifluoroacético (TFA) deuterado al 1 % (v/v) en metanol, por lo que, al no disponer de este solvente, y solamente poseer TFA a grado reactivo se utilizó este y otros solventes más en búsqueda de obtener espectros más amplios.

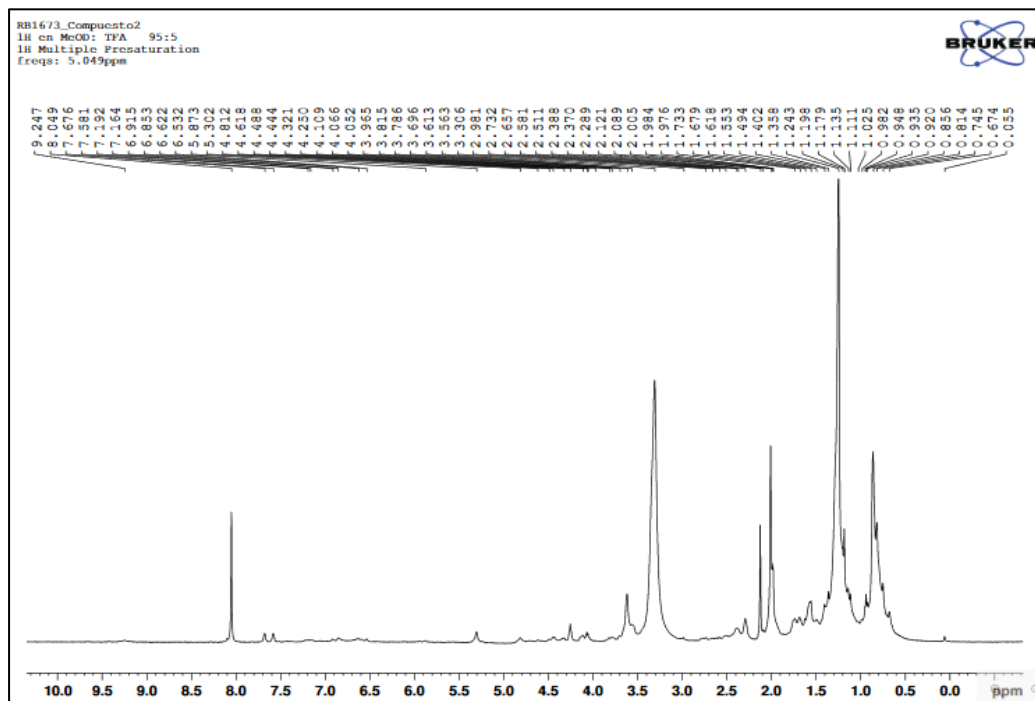
En las siguientes figuras se presentan los resultados obtenidos de los análisis por RMN.

Figura 16
Espectros del compuesto 1 en acetona



Nota. No se logran visualizar los picos del compuesto 1 como se esperaba.

Figura 17
Espectros del compuesto 2 en ácido trifluoracético, metanol 95:5



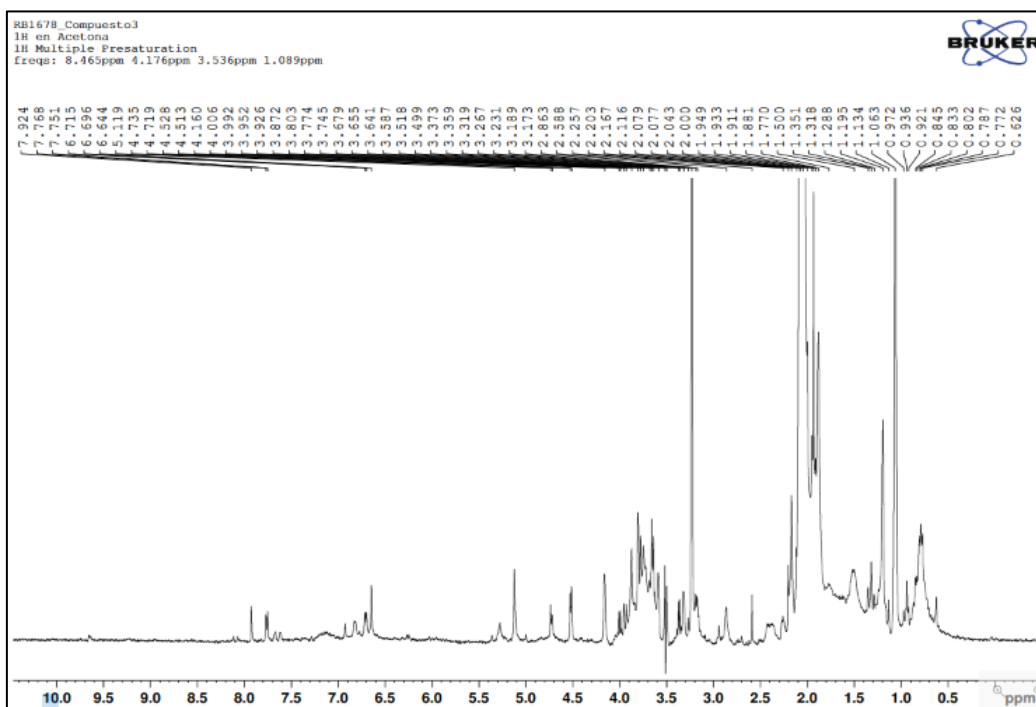
Nota. Se visualiza un pico largo y otros pequeños del compuesto con TFA/metanol.

Es relevante mencionar que además de este solvente, se emplearon otros más con el fin de hallar picos con mejores extensiones, sin embargo, la figura 18 muestra los únicos ligeros picos obtenidos con este disolvente.

De igual forma, para este compuesto se intentó con algunos otros solventes, entre ellos, metanol, acetona, agua, ácido acético, aunque ninguno de ellos otorgó una visualización de estos picos; siendo el ácido trifluoroacético/metanol en proporción 95:5 el único por el cuál se obtuvieron los cortos picos que se muestran la figura 17.

Figura 18

Spectros del compuesto 3 en acetona

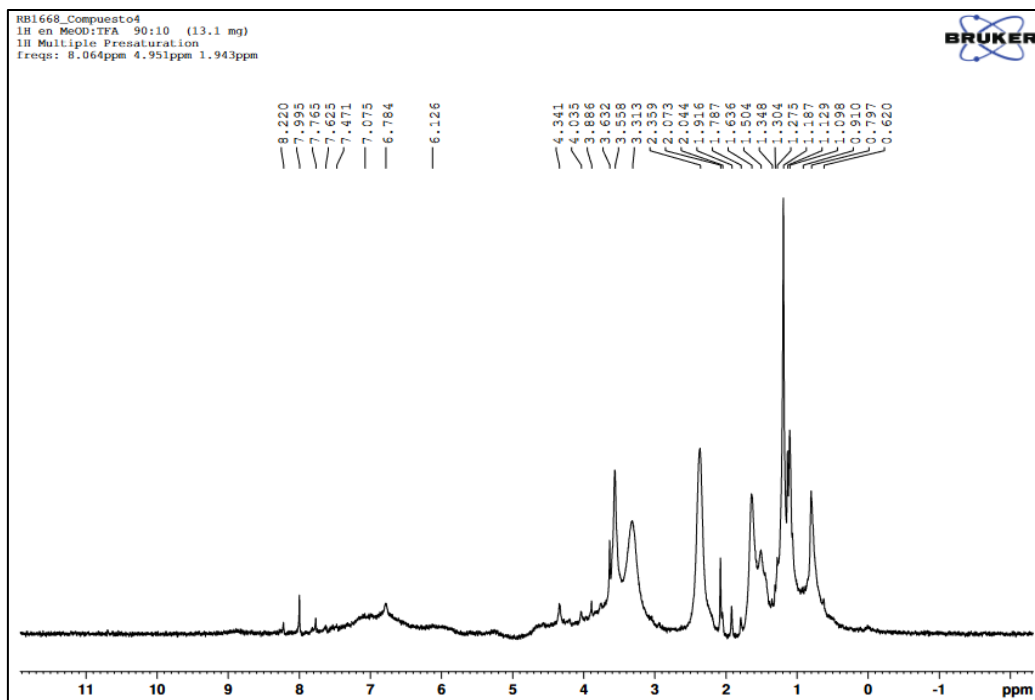


Nota. Se visualiza un pico extendido y otros más pequeños del compuesto 3 con acetona.

También para el compuesto 3 se emplearon algunos otros solventes hasta encontrar el adecuado para los análisis de RMN; en esta exploración, la acetona fue el único medio por el que se pudieron apreciar los pequeños picos que se muestra en la figura 18.

Figura 19

Espectros del compuesto 4 en ácido trifluoracético, metanol 90:10



Nota. Se visualiza un pico levemente extendido y otros más pequeños con TFA/metanol.

Al igual que el compuesto 2, este último logró proyectar picos con el ácido trifluoracético/metanol, pero en proporción 90:10 (y no con ningún otro solvente) como se observan en la figura 19.

La cantidad, el solvente, las condiciones de conservación, el método de extracción e inclusive el equipo son algunos de los factores que pudieron haber sido filtro de esta consecuencia (Øyvind & Fossen, 2003).

Ante las figuras expuesta es evidente que no se cuenta con información suficiente para lograr asignación completa de resonancias de carbono y protones de estos compuestos, por lo que no fue posible la elucidación molecular.

3.3. HPLC-MS-DAD

En la figura 20 se presentan los resultados obtenidos por HPLC-MS-DAD, de la adaptación del método empleado por (Prencipe, y otros, 2014), con fase A: agua 95%/ácido acético 5%, fase B: metanol 55%/agua 40%/ácido acético 5%.

Figura 20

Antocianinas identificadas en *Vaccinium* por HPLC-UV/DAD

Peak number	Compound	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	M^+ (m/z)	MS^2 (m/z)
1	Delphinidin-3-O-galactoside	8.4	277, 525	465	303
2	Delphinidin-3-O-glucoside ^b	9.3	277, 525	465	303
3	Cyanidin-3-O-galactoside	10.1	280, 518	449	287
4	Delphinidin-3-O-arabinoside	10.5	277, 525	435	303
5	Cyanidin-3-O-glucoside ^b	11.2	280, 518	449	287
6	Petunidin-3-O-galactoside	11.8	277, 528	479	317
7	Cyanidin-3-O-arabinoside	12.2	280, 518	419	287
8	Petunidin-3-O-glucoside ^b	12.7	277, 528	479	317
9	Peonidin-3-O-galactoside	13.5	280, 520	463	301
10	Petunidin-3-O-arabinoside	13.9	277, 528	449	317
11	Peonidin-3-O-glucoside ^b	14.6	280, 520	463	301
12	Malvidin-3-O-galactoside	14.8	278, 531	493	331
13	Malvidin-3-O-glucoside ^b	15.7	278, 531	493	331
14	Malvidin-3-O-arabinoside	16.9	278, 531	463	331

Nota. Adaptado de *Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their chemopreventive properties*, por (Prencipe, y otros, 2014).

Acorde a la información obtenida por HPLC-MS-DAD, se compararon con los resultados obtenidos en la identificación de otras antocianinas de extracto de MeOH acidificado de bayas de *Vaccinium* por este mismo método cromatográfico, pero empleando una adaptación distinta en función a los disolventes disponibles para las fases móviles ya que los autores de este trabajo usaron ácido fórmico.

A continuación, en la tabla 7 se muestran los datos arrojados por el equipo de HPLC y se hace contraste con los datos de la figura 20.

Tabla 7

Datos obtenidos por HPLC y compuesto al que se asocia

Compuesto	Compuesto asociado	Tiempo (min)	UV (nm)	M ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)
1	Cianidina-3-O-galactosa Cianidina-3-O-glucosa	18.6	238	449.12	286.99
2	Cianidina-3-O-galactosa Cianidina-3-O-glucosa	19.7	237	449.18	287.14
3	Delfinidina-3-O-galactosa Delfinidina-3-O-glucosa	19.8	235	465.17	303.08

3.4. Cuantificación por diferencial de pH

La cantidad de antocianinas totales varía en torno a varios factores: el origen de la especie vegetal, posición geográfica, factores climáticos, maduración de la especie, luz, método de extracción (Jaakola, 2013), entre otros, por lo que especificar una cantidad exacta de antocianinas totales presentes no resulta ser factible. Autores como (Maltabar, 2020) en su estudio presentado, nos ofrece un claro ejemplo de lo antes mencionado donde se muestra la cantidad de antocianinas totales en ejemplares ricos en antocianinas por cada 100 gramos; la harina morada con un contenido de 69.09 mg, el mortiño 10.62 mg, la flor de jamaica 26.54 mg y la col morada 19.97 mg.

En contraste a lo expuesto, y comparando los resultados obtenidos mediante el mismo método de cuantificación, la cumbía presenta una cantidad de 0.862 mg y aunque como se menciona, algunos factores pueden divergir en las diferentes muestras, de todas maneras es evidente que existe una gran variación entre los resultados por cada 100 gramos obtenidos de esta especie tintoreal por lo que se podría inferir que el método que sugieren (Martínez N. , y otros, 2011) para dar un valor numérico a estos compuestos no es totalmente concreto para determinar la cantidad exacta de antocianinas totales.

3.5. Desarrollo de la preformulación de prototipos

Para cumplir con el objetivo planteado se ha realizado previamente un exhaustivo estudio bibliográfico en donde diversas investigaciones exponen las aplicaciones actuales de las antocianinas por sus característicos y provechosos colorantes, además de métodos de extracción modernos que conducen a aminorar costos, aumentar rendimientos y en conjunto al estudio de pigmentación de cada uno de los tipos de antocianinas mejorar la idoneidad de estos como colorantes naturales (Marina & Alicia, 2021).

La toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos investigados desde hace muchos años genera hasta la fecha una creciente preocupación; autores como (Hallagan, 1991) y (Lauro, 1991) reportan desde hace 12 años que los colorantes rojo No.2 y No.40 se han prohibido en países como Austria, Japón, Noruega y Suecia, debido a que se encuentran ligados a efecto nocivos para la salud, no obstante es importante hacer énfasis que el rojo No.40 en pleno 2023 aún se encuentra en escrutinio y se sigue usando en ciertos países pese a que algunas investigaciones han demostrado que este se encuentra asociado a la hiperactividad y déficit de atención infantil (Dey, 2018).

Los antecedentes expuestos son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales y optar por colorantes naturales como las antocianinas, no obstante, las políticas regulatorias para el uso de dichos colorantes varían según el país (Ottersäater, 1999), por ejemplo, Estados Unidos es el país más condicional, y únicamente permite que estos sean provenientes de la cáscara uva, col morada, rábanos y variedades de bayas (Garzón, 2008). En contraste, la Unión Europea, Corea del Sur, Arabia Saudita, Israel, Irán, Malta, Colombia, Chile, Perú, y los Emiratos Árabes reconocen a todos los colorantes

derivados de las antocianinas como naturales y tienen luz verde para ser usados ampliamente (Ottersäater, 1999).

Para el desarrollo de productos con antocianinas como colorantes naturales y propiedades bioactivas, al igual que otros se dividen en dos grupos: desarrollo de la formulación y desarrollo del proceso de manufactura, aunque al final se realizan a la par. Tras el estudio preliminar de las características fisicoquímicas del principio activo que abarcan la solubilidad, polimorfismo, pH, toxicidad se abre paso a la fase de preformulación, una fase en la que se propone el uso y combinación de excipientes junto con el principio activo para obtener como resultado un producto conforme.

Es por ello por lo que en este capítulo se incluye un análisis de los estudios realizados respecto a la compatibilidad entre el principio activo con los excipientes candidatos para las preformulaciones.

3.5.1. Estandarización del compuesto bioactivo para la formulación de productos

En función a los datos obtenidos de la cantidad total de antocianinas mediante el método de diferencial de pH, siendo el porcentaje 86.2 en cada 100 gramos para la formulación de los productos es necesario establecer la cantidad de principio activo (%) para cada una de las preformulaciones.

En este sentido es importante considerar según lo indican autores como (Marañón, y otros, 2018) que estos compuestos no presentan toxicidad, y por el contrario otorgan valor benéfico para la salud como lo describe el artículo "*Propiedades funcionales de las antocianinas*" escrito por (Ortíz, M. Reza, & Meza, 2015) fundamentado además en otras investigaciones bibliográficas.

Así mismo se ha determinado que el efecto terapéutico de estos compuestos varía según la naturaleza de la especie vegetal de la que se extraigan y que por lo general basta

con cantidades pequeñas para que estas sean favorables, por lo que para las preformulaciones de las bolsas de té y suplemento dietético es posible añadir en cantidades recomendadas de ingesta alrededor desde 60 mg por día de acuerdo a las indagaciones presentadas por (Clifford, 2000). No obstante, debido a su potente porte tintoreal, y puesto que por vía oral los mecanismos de absorción son diferentes que para transporte dérmico en los cosméticos como en este caso el sérum exfoliante se debe tener en cuenta no añadir cantidades grandes para que este no resulte difícil de solubilizar en el proceso de manufactura y se retire con facilidad cuando este se haya aplicado.

3.5.2. Sérum exfoliante

Para el primer prototipo de la preformulación de un sérum exfoliante en la tabla 8 se muestra la función, los excipientes candidatos, y el rango en el que según el “*Handbook of Pharmaceutical Excipients*”, editado por (Sheskey, Cook, & Cable, 2017) en su 8va edición, se deben utilizar.

Tabla 8

Excipientes candidatos para la elaboración de un sérum exfoliante

EXCIPIENTES PARA LA ELABORACIÓN DE UN SÉRUM EXFOLIANTE CON ANTOCIANINAS DEL PERICARPIO DE <i>Renealmia alpinia</i>		
Función	Excipientes candidatos	Rango (%)
Antioxidante	Ácido ascórbico	0.01-0.1%
	Niacinamida	1.25%-2.5%
	Galato de dodecilo	0.001-0.1%
	Ácido edético	0.005-0.1%
	Vitamina E	1-3%
Humectante	Aloe Vera	1%

	Hidrolato de té	1-3%
	Propilenglicol	15%
	Lactato de sodio	2-3%
	Glicerina	5-15%
Tensioactivo	Palmitato de sacarosa	0.5-5%
	Monooleato de glicerilo	4-5%
	Butilhidroxianisol	0.005-0.02%
	Docusato de sodio	0.01-1.0%
	Polisorbato 80	1-5%
Antimicrobiano	Clorocresol	0.075-0.2%
	EDTA	0.01-0.1%
	Etilparabeno	0.4-0.8%
	Metilparabeno sódico	0.02-0.3%
	Cetrimida	0.005% w/v
Espesantes	Ésteres de ácidos grasos de sorbitón polioxietileno	1-15%
Aromatizantes	Uva	
	Mora	0.1%
	Fresa	
	Cereza	
Estabilizante	Alginato de sodio	1-3%
	Estearato de sacarosa	0.2-0.5%
	Arginina	0.1%
	Bentonita	1%
	<i>Goma xantán</i>	0.2-0.5%

Por consiguiente, en la tabla 9 se plantea una tentativa previa a una formulación real.

Tabla 9

Preformulación propuesta para la elaboración de un sérum exfoliante

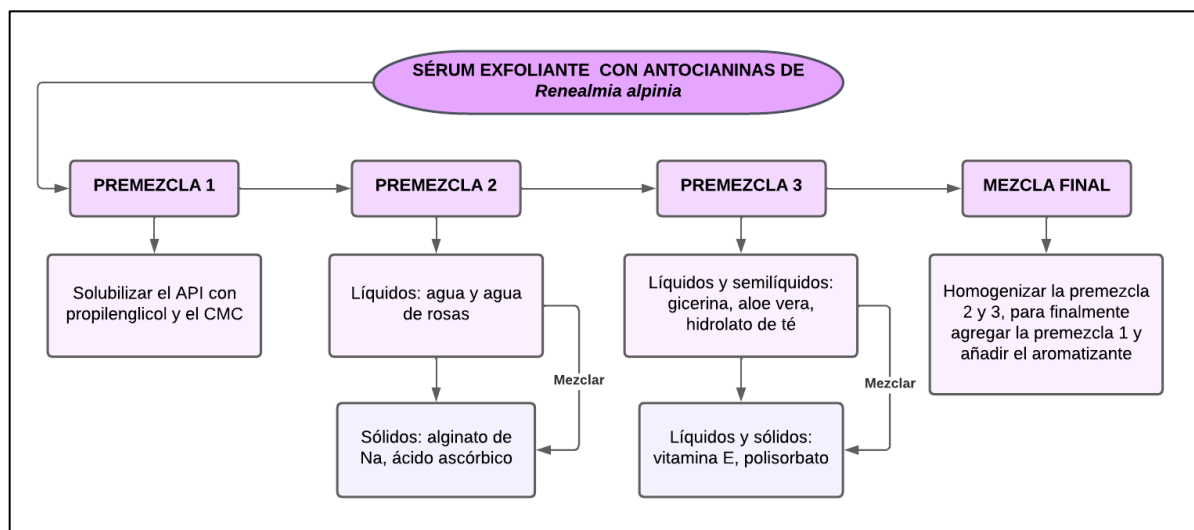
PREFORMULACIÓN PROPUESTA PARA LA ELABORACIÓN DE UN SÉRUM EXFOLIANTE		
CON ANTOCIANINAS DE <i>Renealmia alpinia</i>		
Componente	Función	Porcentaje (%)
Extracto del pericarpio del fruto de <i>Renealmia alpinia</i>	Antioxidante	1%
Polisorbato 80	Tensioactivo	3%
A. ascórbico	Antioxidante/antibacteriano	0.1%
Alginato de Na	Conservante	3%
Propilenglicol	Humectante	9%
Vitamina E	<i>Antioxidante</i>	2.6%
Hidrolato de té	Humectante	2%
Aloe vera	Humectante	1%
Glicerina	Humectante/Control de la viscosidad	5%
CMC	Espesante	1%
Aromatizante de uva	Aromatizante	0.1%
Agua de rosas	Humectante	36.2%
Agua	Humectante	36%

3.5.2.1. Esquematización del proceso de manufactura del sérum exfoliante

En la figura 21, se presenta la esquematización del proceso de manufactura del sérum exfoliante.

Figura 21

Esquematzación del proceso de manufactura del sérum exfoliante



Nota. Proceso de manufactura del sérum exfoliante con antocianinas, por (Benítez, 2022).

3.5.3. Bolsas de té de frutos rojos enriquecidas con *Renealmia alpinia*

Para el segundo prototipo de la preformulación de bolsas de té, en la tabla 8 se muestra la función, los excipientes candidatos, y el porcentaje a añadir según el criterio del formulador.

Tabla 10

Preformulación propuesta para la elaboración de bolsas de té

PREFORMULACIÓN PROPUESTA PARA LA ELABORACIÓN DE BOLSAS DE TÉ DE FRUTOS ROJOS CON EXTRACTO DEL PERICARPIO DE <i>Renealmia alpinia</i>		
Ingredientes deshidratados	Función	Porcentaje (%)
Extracto liofilizado de cumbia (<i>Renealmia alpinia</i>)	Antioxidante	60%
Fresas <i>Fragaria vesca</i>	Antiinflamatorio/desintoxicante/anticoagulante	8%
Cerezas <i>Prunus cerasus</i>	Antioxidante/depurativo/inmunitaria	8%
Arándanos <i>Vaccinium myrtillus</i>	Antioxidante/inmunitaria	8%
Moras <i>Rubus glaucus</i>	Antioxidante/antiinflamatoria	7.95%

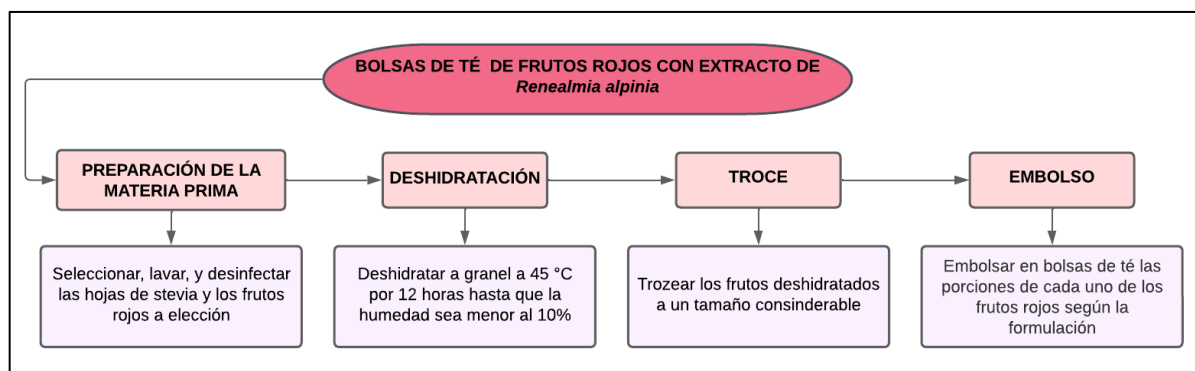
Jamaica <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Antioxidante/antiséptica/diurética/astringente/sedante	8%
Hojas de Stevia <i>Stevia rebaudiana</i>	Endulzante natural	0.05%

3.5.3.1. Esquematzación del proceso de manufactura de bolsas de té de frutos rojos con extracto de *Renealmia alpinia*

En la figura 22 se expone la esquematización del proceso de manufactura de las bolsas de té.

Figura 22

Esquematzación del proceso de manufactura de bolsas de té



Nota. Proceso de manufactura de bolsas de té de frutos rojos con extracto de *Renealmia alpinia*, por (Benítez, 2022).

3.5.4. Suplemento dietético en forma de cápsulas de polvo

Para el último prototipo propuesto para la preformulación de un suplemento dietético en forma de cápsulas de polvo, al igual que el primer prototipo, en la tabla 11 se muestra la función, los excipientes candidatos, y el rango en el que según el “*Handbook of Pharmaceutical Excipients*”, editado por (Sheskey, Cook, & Cable, 2017) en su 8va edición, se deben emplear.

Tabla 11

Excipientes candidatos para la elaboración de cápsulas de polvo

EXCIPIENTES PARA LA ELABORACIÓN DE CÁPSULAS DE POLVO DE ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DE <i>Renalmia alpinia</i>		
Función	Excipientes candidatos	Rango (%)
Desintegrante	Silicato de magnesio y aluminio	2-10%
	Celulosa microcristalina	5-50%
	Croscarmelosa	10-25%
	Goma de guar	0.1-10%
	Almidón de hidroxipropilo	10-70%
Lubricante	Estearato de magnesio	0.25-5% w/w
	Maltodextrina	0.5-1%
	Estearato de polioxietileno	1-2%
	Benzoato de sodio	2-5% w/w
	Cloruro de sodio	10-80%
Antioxidante	Metabisulfito de sodio	0.01-1.0% w/v
	Ac. Ascórbico	0.01-0.1%
	D-manosa	2-4%
	Galato de octilo	0.01-1.0%
	Citrato de tributilo	10-20%
Conservante	Benzoato de Na	0.02-0.5%
	Betadex sulfobutil éter sódico	0.01-0.1%
	Bisulfito sódico	0.1-20%
	Ácido sórbico	0.05-0.2%

Edetato tetrasódico	0.01-0.2% w/v
---------------------	---------------

En derivación, en la tabla 12 se plantea una tentativa de los excipientes y sus porcentajes para una formulación real.

Tabla 12

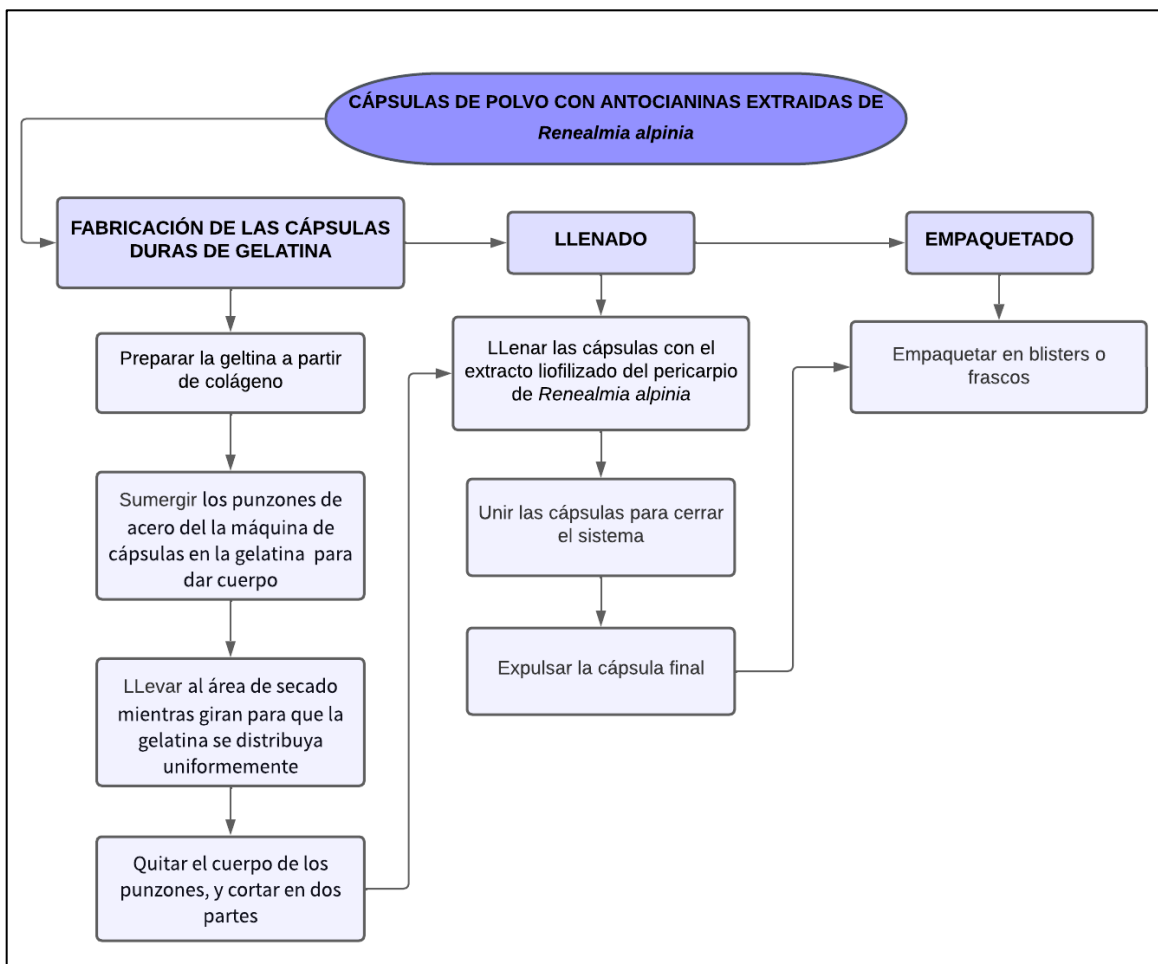
Preformulación propuesta para la elaboración de cápsulas de polvo

PREFORMULACIÓN PROPUESTA PARA LA ELABORACIÓN DE CÁPSULAS DE POLVO CON ANTOCIANINAS EXTRAIDAS DEL PERICARPIO DE <i>Renealmia alpinia</i>		
Componente	Función	Porcentaje (%)
Extracto liofilizado del pericarpio del fruto de <i>Renealmia alpinia</i>	<i>Antioxidante</i>	10%
Celulosa microcristalina	Desintegrante	14.7%
Almidón de hidroxipropilo	Diluyente	70%
Estearato de magnesio	Lubricante	5%
Bisulfito sódico	Conservante	0.30%

3.5.4.1. Esquematación del proceso de manufactura de cápsulas de polvo con antocianinas del pericarpio de *Renealmia alpinia*

Figura 23

Esquematación del proceso de manufactura de cápsulas de polvo



Nota. Proceso de manufactura de las cápsulas de polvo con antocianinas del pericarpio de

Renealmia alpinia, por (Benítez, 2022).

Conclusiones

Tras el desarrollo del presente Trabajo de Integración Curricular, entorno a los resultados obtenidos se logró estudiar a cabalidad la composición química del pericarpio de *Renealmia alpinia* buscando en sucesión alternativas de uso sustentable que beneficien principalmente a los pueblos originarios de manera que estos aprovechen en totalidad lo que esta valiosa especie ofrece.

Mediante el método de TLC, se consiguió develar lo que constituye en gran proporción el exocarpo de la kumpia, siendo las antocianinas los pigmentos astro y el universo de esta investigación; que a primera impresión resaltan distinguidamente por sus atractivas coloraciones. Y aunque anteriormente se describe el método de RMN, este no constituyó un medio eficiente para alcanzar nuestros objetivos debido a la falta de reactivos adecuados para su estudio químico según la bibliografía, por lo que, en alternativa, se logró caracterizar químicamente a través de HPLC-MS-DAD, destacando la cianidina-3-o-glucosa, cianidina-3-o-galactosa, delphinidina-3-o-glucosa y delphinidina-3-o-galactosa como principales variantes presentes. Y en complemento se determinó una cantidad de 0.862mg/100g, por el método de cuantificación por diferencial de pH.

En derivación a esto, proponer el uso potencial del pericarpio que recubre la especie en función de su composición química, aperturó la posibilidad de plantear tres productos a escala industrial que se prototiparon, entre estos, en la industria cosmética un sérum exfoliante, en la industria alimentaria bolsas de té, y en la industria farmacéutica cápsulas de polvo como suplemento dietético, todos ellos con capacidad antioxidante avalada por las distintas investigaciones bibliográficas y de campo desde hace más de un siglo.

Finalmente, cabe destacar que investigaciones como ésta proveen un futuro confortador para incrementar el uso de estos colorantes como alternativas a los pigmentos

sintéticos que traen consigo efectos nocivos para el consumidor, abriendo paso a nuevas investigaciones en donde se pueda utilizar plantas autóctonas de nuestro país como materia de extracción a través de técnicas más eficaces, a menores costos y sobre todo ecológicas.

Recomendaciones

Para investigaciones futuras referentes al estudio de este espécimen u otras especies vegetales compuestas por antocianinas se recomienda intentar realizar otros tipos de cromatografía para la separación de grandes cantidades de compuestos contenidos en el extracto de dichas materias, estos pueden ser por ejemplo cromatografía en columna, para poder obtener mejores resultados en los análisis por RMN.

Conjuntamente para posibilitar la solubilidad de las sustancias aisladas y conseguir espectros con mayor amplitud en RMN para la posterior elucidación molecular, se recomienda emplear ácido trifluoroacético o ácido fórmico grado deuterado según lo emplean (Øyvind & Fossen, 2003).

Por otra parte, en HPLC debido a su pH y su polaridad se sugiere usar el ácido fórmico en las fases móviles como lo han utilizado otros autores que han evaluado antocianinas por este mismo método (Prencipe, y otros, 2014); aunque de no tener disponible dicho solvente para estos ensayos se puede también optimizar el método antes adaptado para obtener datos más exactos.

De igual manera solamente en el caso de que no se logre analizar por HPLC masas-DAD el extracto puro, se aconseja aplicar el método de cuantificación por diferencial de pH con la observación de que este no se trata de un método completamente específico.

Por concluyente, se recomienda de manera especial continuar con las investigaciones pertinentes en cuanto a esta y muchas especies vegetales más que hasta el momento se encuentran inexploradas, esto con el afán de crear nuevas fuentes de explotación renovable para comunidades que tienen por desapercibida la riqueza natural de la que son dueños.

Referencias

- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, *XIII*(2), 16-22.
- Armendáriz, B., Álvarez, R., & Galindo, S. (2016). *Investigación de plantas de importancia médica*. Nuevo León : Monographs. Obtenido de <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/825-1?inline=1>
- Benítez. (2022). Loja, Loja, Ecuador.
- Biodiversity Heritage Library*. (1782). Obtenido de <https://www.biodiversitylibrary.org/page/411040#page/22/mode/1up>
- Brenda, W. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, *126*(2), 485-493. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. *Science of Food and Agriculture*, *7*.
- Dey, R. (octubre de 2018). *Repositorio BUAP*. Obtenido de Consumo de alimentos con el colorante alimenticio rojo 40 y su remoción por enterobacterias de la microbiota intestinal: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/7834>
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, *10*.

- González, Á. (abril de 2004). *Repositorio institucional Universidad Nacional de Colombia*.
Obtenido de Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2800>
- Gonzalez, O. J. (Diciembre de 2017). *BUAP*. Obtenido de Obtención, evaluación de pigmentos microencapsulados a partir de frutos xkijit (*Renealmia alpinia*) e incorporación en una matriz alimenticia: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/648>
- Hallagan, J. B. (1991). The use of certified food color additives in the United States. *PASCAL*, 945-948.
- Inabio. (30 de enero de 2019). *INABIO*. Obtenido de Medidas o acciones: <http://inabio.biodiversidad.gob.ec/2019/01/30/36-programa-intergral-amazonico-de-conservacion-de-bosques-y-produccion-sostenible-proamazonia-proyecto-103568-gcf-promocion-de-instrumentos-financieros-y-de-planificacion-del-uso-de/>
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of. *Trends in Plant Science*, 1-3.
- Jibaja, M., & Tuitice, A. (2021). *Repositorio digital Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de Antocianinas y su aplicación como colorantes naturales para alimentos: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22622>
- Jiménez, Ó. (Diciembre de 2017). *BUAP*. Obtenido de Obtención, evaluación de pigmentos microencapsulados a partir de frutos xkijit (*Renealmia alpinia*) e incorporación en una matriz alimenticia: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/648>
- Lauro, G. (1991). A primer on Natural Colors. *Cereal Foods World*, 949.
- León, S. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (Segunda ed.). (S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa, & H. Navarrete, Edits.) Quito.

Obtenido de https://ddrn.dk/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO_ROJO_de_las_plantas_endemicas_del-1.pdf

Li, D.-M., Li, J., Wang, D.-R., Xu, Y.-C., & Zhu, G.-F. (2021). Molecular evolution of chloroplast genomes. *BMC Plant Biol*, 21(558). doi:<https://doi.org/10.1186/s12870-021-03315-9>

Macía, M. (2003). RENEALMIA ALPINIA (ROTTB.) MAAS (ZINGIBERACEAE): PLANTA COMESTIBLE DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA (MÉXICO). *Anales Jardín botánico de Madrid*, 60(1), 183-187.

Maltabar, Y. (28 de abril de 2020). *Repositorio USFQ*. Obtenido de Extracción y Cuantificación de Antocianinas por Método de pH: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9223/1/131087.pdf>

Marañón, V., Romero, M., Chiu, R., Castañeda, J., Mora, M., & Pérez, H. (2018). *Participación de la mujer en la ciencia*. Obtenido de Estabilización de antocianinas mediante nanoencapsulación de sílice: <https://docplayer.es/64466317-Estabilizacion-de-antocininas-mediante-nanoencapsulacion-de-silice.html>

Marina, J., & Alicia, T. (2021). *Repositorio digital Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de Antocianinas y su aplicación como colorantes naturales para alimentos: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22622>

Martínez, N., Arévalo, K., Verde, M., Rivas, C., Oranday, A., Núñez, M., & Morales, M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltidl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 66-70.

Martínez, N., Arévalo, K., Verde, M., Rivas, C., Oranday, A., Núñez, M., & Morales, M. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltidl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 68.

- Martinov, I. (1820). *Техно-ботанический словарь на латинском и российском языках*.
- Moreno, A. (2022). Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34290/1/t1942mquim.pdf>
- Mottaghipisheh, J., Doustimotlagh, A., Irajie, C., Tanideh, N., Barzegar, A., & Irajie, A. (2022). The Promising Therapeutic and Preventive Properties of Anthocyanidins/Anthocyanins on Prostate Cancer. *National Library of Medicine*. doi:10.3390/cells11071070. PMID: 35406634; PMCID: PMC8997497.
- Mottaghipisheh, J., Hossein, A., Irajie, C., Tanideh, N., Barzegar, A., & Irajie, A. (22 de marzo de 2022). *National Library of Medicine* . Obtenido de Las prometedoras propiedades terapéuticas y preventivas de las antocianidinas/antocianinas en el cáncer de próstata: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8997497/>
- Namicela, I. (2010). ESTUDIO ETNOBOTÁNICO EN LAS COMUNIDADES SHUAR DE TIUKCHA Y SHAKAI DEL CANTÓN EL PANGUI. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5170>
- Ortiz, M., M. Reza, R. C., & Meza, J. (2015). Propiedades funcionales de la antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 19-21.
- Ottersäater, G. (1999). *Coloring of Food, Drugs and Cosmetics* (Primera ed.). CRC Press. doi:<https://doi.org/10.1201/9781482270082>
- Øyvind, A., & Fossen, T. (2003). Characterization of Anthocyanins by NMR. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2, 11.
- Prencipe, F., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their

chemopreventive properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 257-267.

Pretsch, Clerc, Seibl, & Simon. (1970). *Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Uruena: Páramo. Obtenido de <https://www.itwreagents.com/iberia/es/sa-os-disolventes-para-analisis-instrumental-para-elucidacion-estructural>

Quiored. (2002). *Quiored*. Obtenido de <https://www.ugr.es/~quiored/pnatu/metabolitos.htm>

Rifai, N., Wittwer, C. T., & Horvath, A. (2018). *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry Small Molecules, Peptides, and Pathogens*. Utah. Obtenido de Mass Spectrometry: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>

Rottbøll, C. (1775). Observaciones ad genera quadem rariora exoticarum plant. *Societatis Medicae Havniensis Collectanea*, 245-248.

Ruiz, M. (2020). *Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*. Obtenido de <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7989/Gu%C3%ADa%20de%20Espectroscop%C3%ADa%20de%20Resonancia%20Magn%C3%A9tica%20Nuclear.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sandí, D. A. (19 de agosto de 2019). Biología tropical. *Revista de biología tropical*, 2.

Sarfaraz, K., & Shoaib, M. (enero de 2015). *Research Gate*. Obtenido de Phytochemistry and Bioactivities of Quranic Plant, Zanjabil-Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A Review: https://www.researchgate.net/publication/276236589_Phytochemistry_and_Bioactivities_of_Quranic_Plant_Zanjabil-Ginger_Zingiber_officinale_Roscoe_A_Review

Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Cable, C. G. (2017). *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press.

The Angiosperm Phylogeny Group , Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., . . . Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20. doi:<https://doi.org/10.1111/boj.12385>

The Catalogue of Life Partnership. (27 de octubre de 2022). *Royal Botanic Garden*. Obtenido de The World Checklist of Vascular Plants (WCVP): <https://www.gbif.org/es/species/4687>

Treybal, R. (1986). *Operaciones de transferencia de masa* (Segunda ed.). McGRAW-HILL. Obtenido de <https://fenomenosdetransporte.files.wordpress.com/2008/05/operaciones-de-transferencia-de-masa-robert-e-treybal.pdf>

Tropicos. (23 de abril de 2019). *Ecos del bosque*. Obtenido de Renealmia alpinia: <https://ecosdelbosque.com/plantas/renealmia-alpinia>

Twaij, B., & Hasan, N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology*, 13, 4-14.

Vaccari, A., & Pifferi, P. (1978). New Solvents for Paper and Silica Gel Thin-Layer Chromatography of Anthocyanins. En A. Vaccari, & P. Pifferi, *Chromatography* (págs. 193-196). Bologna: Istituto di Tecnologie Chimiche Speciali.

Vallejo, Y., Barrios, L., & Anaya, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de química*, 7.

Verdecía, D., Herrera, R., Torres, E., Sánchez, A., Hernández, L., Herrera, R., . . . López, S. (2021). Metabolitos primarios y secundario de seis especies de árboles, arbustos y

leguminosas herbáceas. *Cuban Journal of Agricultural Science*. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-348020210001000008&script=sci_arttext&lng=es




Voigt, R., Bornschein, M., & Cachaza, A. N. (1982). Tratado de tecnología farmacéutica. *Dialnet*.






Waksmundzka, M., & Sherma, J. (2010). *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. Boca Raton London New York: Taylor & Francis.

Zhao, J.-L., Yu, X.-Q., Kress, J., Wang, Y.-L., Xia, Y.-M., & Li, Q.-J. (2022). Historical biogeography of the gingers and its implications for shifts in tropical rain forest habitats. *Journal of Biogeography*, 49(7), 1339-1351. doi: <https://doi.org/10.1111/jbi.14386>

Apéndice

Apéndice A. Mezcla de solventes y polaridades usadas en la separación de metabolitos por TLC

Fuente	Fase	Solventes	Polaridad	Resultado
Extracto liofilizando del pericarpio de <i>Renealmia alpinia</i> (5 mg en 0.5 ml de etanol)	Indirecta	Metanol/agua	8:2	 No separación
			7:3	 Mínima separación de un solo compuesto
			6:4	 No separación

		5:5	
			No separación
Directa	Hexano/acetato	8:2	
			No separación
		7:3	
			No separación
		6:4	
			Mínimo índice de separación
		5:5	
			No separación

Etanol/ácido fórmico

6:4



No separación

Etanol

10



No separación

Metanol

10



Separación de
un solo
compuesto

Etanol/acetato

5:5







No separación

Etanol/ ácido
fórmico/agua

5:3:2



		No separación
N-butanol/ butil acetato/ ácido fórmico/ agua	13:5:2:3	
		No separación
N-butanol/ ácido acético glacial/ ácido fórmico/ agua	13:5:2:3	
		No separación
N-butanol/ etil acetato/ ácido fórmico/ agua	13:5:2:3	
		No separación
	10:11:3:2	
		No separación

Acetona/ etil acetato/
ácido fórmico/ agua

10:11:2:4



No separación

10:11:4:2



No separación

Etil acetato/ ácido
fórmico/ agua

14:3:3



No separación

N-butanol/ ácido
acético/ agua

12:3:5



Mínima
separación de
un compuesto

Etil acetato/ metil-
etil-cetona/ ácido
fórmico/ agua

7:1:1:1



No separación

7:1:1:1.5*



Separación bien
diferenciada de
tres metabolitos

6:1:1:2



Separación
mínima entre
tres compuestos

6:1:2:1



Separación de
un solo
compuesto

6.5:1:1:1.5*



Separación
diferenciada de
tres compuestos

5:2:2:1



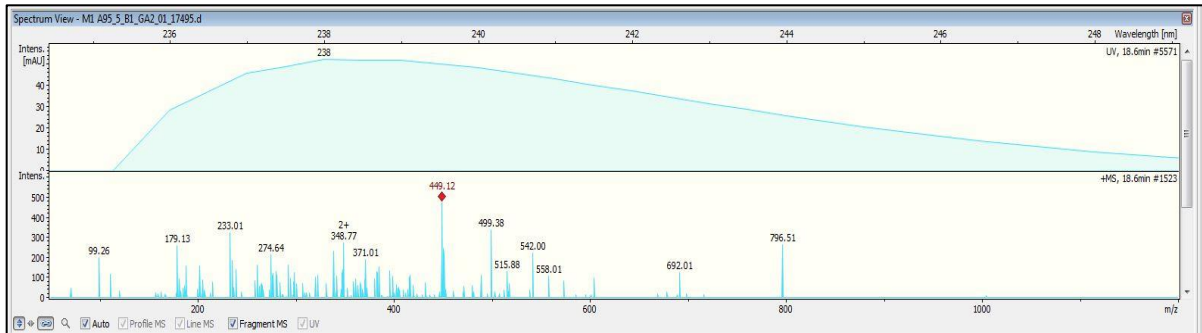
No separación

5:1:2:2

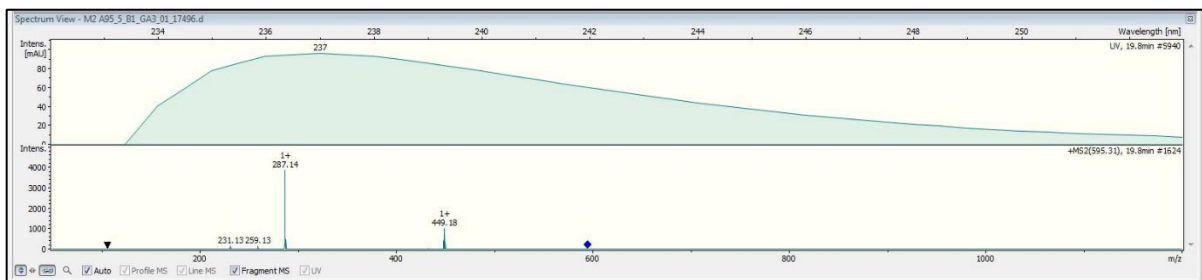


No separación

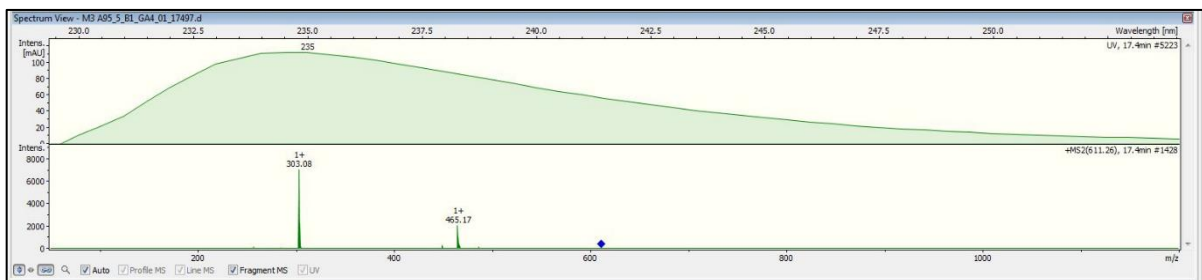
Apéndice B. Espectros de HPLC del compuesto 1



Apéndice C. Espectros de HPLC del compuesto 2



Apéndice D. Espectro de HPLC del compuesto 3



Apéndice E. Espectros de HPLC del compuesto 4

