

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA  
PERUANA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Aislamiento y Caracterización de los Pigmentos Carotenoidales y  
Flavonoidales de las inflorescencias de *Tagetes erecta* (Marigold, Rosa sisa).**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. PAREDES AREVALO, EDDIE POOL**

**Bach. AYALA REYES, JOHN ROBERT**

**ASESOR:**

**Ing.QUIM. CLETO JARA HERRERA**

**Ing.QUIM. JULIO ARCE HIDALGO**

**IQUITOS-2013**

## RESUMEN

El propósito del presente estudio fue el aislamiento de luteína y quercetina de la especie vegetal *Tagetes erecta* (HBK). Se desengrasó en equipo soxhlet con éter de petróleo, luego se destiló para juntar el éter de petróleo. La muestra etanólica de *Tagetes erecta* (HBK) Eichl “marigold, rosa sisa” se trató con ácido sulfúrico al 7% durante 2 horas, la suspensión fue filtrada y sustraída por un largo tiempo con éter dietílico. La solución etanólica sustraída se extrajo con solución de bórax 10% que al reaccionar con ácido clorhídrico, se separó una sustancia amarilla. De la concentración de la solución etérica se extrajo un polvo amarillo con punto de fusión 316-317.5°C, Comparando con los archivos mostrados, el punto de fusión para quercetina es 316-317°C. Las pruebas espectrométricas (UV-Visible, RMN H<sup>+</sup> y C-13), evidencian que los componentes aislados corresponden a luteína y quercetina respectivamente.

## ABSTRACT

The purpose of this study was the isolation of lutein and quercetin of the plant species *Tagetes erecta* (HBK). It was desengrased with petroleum ether by partition of phases. The ethanolic fraction of sample of leaf of the *Tagetes erecta* (HBK) Eichl “marigold, pink sisa”, was treated with sulfuric acid 7% during two hours. The suspension was cooled and extracted several times with diethyl ether. The ethanolic solution is extracted with 10% Borax solution that for reaction with hydrochloric acid is separated a yellow substance. The concentration of the etheric solution gives a yellow powder. The measurement of melting point of both samples give: 316-317.5 °C comparative data show that 316-317 °C is quercetin. The test of spectrometric (UV-Visible, RMN H<sup>+</sup> y C-13), to make evident the both compounds isolated correspond to lutein and quercetin respectively.

**JURADO CALIFICADOR DESIGNADO**

**1. PRESIDENTA:**

-----  
**Q.F.FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr**

**2. MIEMBRO:**

-----  
**Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES**

**3. MIEMBRO:**

-----  
**Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO**

**ASESORES:**

-----  
**ING. QUIM. CLETO JARA HERRERA**

-----  
**ING.QUIM. JULIO ARCE HIDALGO**



"Año de la Inversión para el Desarrollo rural y la Seguridad Alimentaria"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 19 días del mes de Diciembre del dos mil trece, siendo las 18:44 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 106-FFB-UNAP-2013, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr. PRESIDENTE
- Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO MIEMBRO
- Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES MIEMBRO



Se constituyeron en las instalaciones del Colegio Químico Farmacéutico Departamental de Loreto, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulado Titulada "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDALES Y FLAVONOIDALES DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* (Marigold, Rosa sisa)", presentado por los Bachilleres: EDDIE POOL PAREDES ARÉVALO y JOHN ROBERT AYALA REYES, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:


SATISFACTORIAMENTE




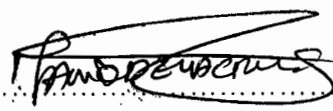
Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADO POR UNANIMIDAD
- 2.- Observaciones NINGUNA

Siendo las 19:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su ACEPTADA SUSTENTACION

  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr.  
Presidente

  
Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO  
Miembro

  
Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES  
Miembro

**RESOLUCIÓN DE COORDINACIÓN N° 106-FFB-UNAP-2013**

Nina Rumi, 02 de mayo del 2013

EL COORDINADOR DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA.

**CONSIDERANDO:**

Que, mediante Oficio N° 070-DEFP-FFB-UNAP-2013, de fecha 30 de abril del año en curso, la Directora de Escuela de Formación Profesional Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS DE REÁTEGUI, solicita a esta Coordinación el cambio de uno de los miembros del Jurado Calificador del Proyecto de Tesis Titulado "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDALES Y FLAVONOIDALES DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* (Magiroid, Rosa sisa)", presentado por los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica **EDDIE POOL PAREDES ARÉVALO** y **JOHN ROBERT AYALA REYES**; debido a que el Q.F. HUGO MIGUEL PINTO GUERRA, se encuentra de Licencia sin goce de haber. Por tal motivo, esta Coordinación considera conveniente reemplazar al docente antes indicado por el Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO, quedando conformado el Jurado Calificador de la siguiente manera: Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr. (Presidenta); Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES (Miembro); y Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO, (Miembro);

Que, por lo expuesto en el presente considerando, es procedente atender lo solicitado por la Directora de Escuela de Formación Profesional;

En uso de las atribuciones que confiere la Ley Universitaria N° 23733 y el EGUNAP;

**SE RESUELVE:**

**ARTÍCULO 1°.- APROBAR**, el cambio de uno de los miembros del Jurado Calificador del Proyecto de Tesis Titulado "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDALES Y FLAVONOIDALES DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* (Magiroid, Rosa sisa)", presentado por los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica **EDDIE POOL PAREDES ARÉVALO** y **JOHN ROBERT AYALA REYES**; debido a que el Q.F. HUGO MIGUEL PINTO GUERRA, se encuentra de Licencia sin goce de haber.

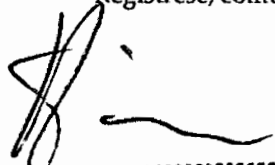
**ARTÍCULO 2°.- EL Jurado Calificador** estará conformado de la siguiente manera:


- |  |            |
|--|------------|
| ➤ Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr.     | PRESIDENTA |
| ➤ Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES      | MIEMBRO    |
| ➤ Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO | MIEMBRO    |

**ARTÍCULO 3°.- RECONOCER**, como Co-Asesor del mencionado Proyecto al ING. JULIO ARCE HIDALGO.

**ARTÍCULO 4°.- Queda sin efecto** la Resolución de Coordinación N° 018-FFB-UNAP-2013, de fecha 23 de enero del 2013, en mérito al considerando de la presente Resolución de Coordinación.

Regístrese, comuníquese y archívese

  
Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ  
Coordinador  
FACULTAD FARMACIA Y BIOQUIMICA



  
Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUIZ  
Secretaria Académica  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



Distrib: DEFP. Jurados (3); Asesor (1); Int..(2) y Archivo.  
LAVA:Lency.

## Dedicatorias

*A mi madre:*

*Todo lo que soy o espero ser, se lo debo a su inmenso cariño y confianza que ella deposito en mi, a tus sacrificios y desvelos, por tenerme paciencia y por su gran apoyo durante toda mi vida y durante mi formacion profesional.*

*A mi hermana y hermano:*

*Por su comprension durante mi vida universitaria, por la confianza y gran apoyo moral recibido por parte de ellos.*

*A dios todopoderoso por darme la vida, salud y fortaleza para seguir adelante y superar todo los obtaculos que se presentaron en el trancurso de mi vida.*

### **Reconocimientos:**

Expresamos nuestro profundo reconocimiento a las personas que hicieron posible esta investigación, en calidad de asesores o de informantes. Todos y cada uno de ellos dedicaron su tiempo contribuyendo de esta manera con sus aportes al enriquecimiento de la presente investigación.

Mi sincero agradecimiento:

- Ing. Químico Julio Arce Hidalgo, Asesor Docente de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; por su guía y orientación constante, dedicar su tiempo y esfuerzo, así como brindar sus valiosos y grandes conocimientos y aportes para la realización de esta tesis.
- Ing. Cleto Jara Herrera, Asesor Docente de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; por su orientación permanente, dedicación y por los aportes para la realización de esta tesis.
- Laboratorio de RMN del departamento de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú; por permitirnos realizar las pruebas de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , mediante el cual se pudo identificar la estructura química de la quercetina.
- Miembros del jurado calificador; por brindarnos su tiempo, orientación y espacio para la corrección y ejecución de la tesis.
- A nuestra alma mater la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por intermedio de la cual realizamos nuestros estudios de pre grado.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>CAPITULO I</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción.	1
1.2 Formulación del problema.	4
1.3 Objetivos.	5
1.3.1 Generales.	5
1.3.2 Específicos.	5
<b>CAPITULO II</b>	<b>6</b>
2.1 Marco teórico.	6
2.1.1 Antecedentes.	6
2.2 Familias de colorantes que posee marigold: carotenoides y flavonoides.	10
2.2.1 Carotenoides.	10
2.2.1.2. Biosíntesis de los carotenoides.	12
2.2.1.3. Clasificación de los carotenoides.	15
2.2.1.3.1. $\beta$ – caroteno.	15
2.2.1.3.2. Licopeno.	16
2.2.1.3.3. Cantaxantina.	16
2.2.1.3.4. Astaxantina.	16
2.2.1.3.5. Zeaxantina.	17
2.2.1.3.6. Luteína.	17
2.2.1.4. Luteína en <i>Tagetes erecta</i> .	18



<b>2.2.1.5. Propiedades Físico-Químicas de los carotenoides.</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Flavonoides.</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1. Biosíntesis de los flavonoles.</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Taxonomía y clasificación de la especie vegetal en estudio</b>	<b>27</b>
<b>2.4.1 Descripción botánica.</b>	<b>27</b>
<b>2.4.2 Distribución geográfica y ecológica.</b>	<b>29</b>
<b>2.4.3 Usos etnobotánicos y etnofarmacológicos.</b>	<b>29</b>
<b>2.4.4 Propiedades Biocidas.</b>	<b>30</b>
<b>2.4.5 Propiedades colorantes.</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Constituyentes Químicos de <i>Tagetes erecta</i>.</b>	<b>30</b>
<b>2.5.1 Quercetina pigmento natural.</b>	<b>31</b>
<b>2.5.1.1 Propiedades biológicas de la quercetina.</b>	<b>31</b>
<b>2.5.2 Kampherol.</b>	<b>33</b>
<b>2.5.2.1 Propiedades biológicas del Kampherol.</b>	<b>34</b>
<b>2.6 Aislamiento e identificación de quercetina y kampherol</b>	<b>34</b>
<b>Según Ikan.</b>	
<b>2.7 Métodos de identificación preliminar de los pigmentos</b>	<b>36</b>
<b>carotenoidales y flavonoidales de <i>Tagetes erecta</i>.</b>	
<b>2.7.1 Separación de los pigmentos carotenoidales.</b>	<b>37</b>
<b>2.7.2 Identificación del carotenoide.</b>	<b>37</b>
<b>2.7.3 Aislamiento del flavonol e identificación.</b>	<b>38</b>
<b>2.8 Aislamiento de quercetina y kampherol según Domínguez.</b>	<b>38</b>

<b>2.8.1 Aislamiento de quercetina y kampherol por extracción con alcohol y separación con Bórax (<math>B_4O_7Na_2 \cdot 10 H_2O</math>).</b>	<b>38</b>
<b>2.8.2 Aislamiento de quercetina y kampherol por cromatografía de capa fina (TLC) según Stahl-Egon.</b>	<b>39</b>
<b>2.9 Propiedades Físico-Químicas de los flavonoles: quercetina y kampherol.</b>	<b>41</b>
<b>2.10 Definiciones operacionales.</b>	<b>43</b>
<b>2.10.1 Identificación.</b>	<b>43</b>
<b>2.10.2 Variables operacionales.</b>	<b>44</b>
<b>2.10.2.1 Variable independiente.</b>	<b>44</b>
<b>2.10.2.2 Variables dependientes.</b>	<b>44</b>
<b>2.10.3. Operacionalización de variables</b>	<b>44</b>
<b>2.10.3.1. Variable independiente</b>	<b>44</b>
<b>2.10.3.2. Variable dependiente</b>	<b>46</b>
<b>CAPITULO III</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Método y diseño de la investigación.</b>	<b>48</b>
<b>3.1.1 Método de estudio.</b>	<b>48</b>
<b>3.1.2 Diseño de investigación.</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Población y muestra.</b>	<b>48</b>
<b>3.2.1 Población vegetal.</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2 Muestra vegetal.</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3 Criterios de inclusión y exclusión.</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3.1 Criterios de inclusión.</b>	<b>49</b>

<b>3.2.3.2 Criterios de exclusión.</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Diseño experimental.</b>	<b>49</b>
<b>3.3.1 Recolección de muestras.</b>	<b>49</b>
<b>3.3.2 secado.</b>	<b>50</b>
<b>3.3.3 Molienda y pulverizado.</b>	<b>50</b>
<b>3.3.4 Tamizado.</b>	<b>50</b>
<b>3.3.5 Desengrasado de la muestra.</b>	<b>50</b>
<b>3.3.6 Aislamiento de luteína.</b>	<b>50</b>
<b>3.3.7 Extracción con alcohol etílico.</b>	<b>51</b>
<b>3.3.8 Desengrasado de la solución etanólica.</b>	<b>51</b>
<b>3.3.9 Tratamiento de la fase etanólica.</b>	<b>51</b>
<b>3.3.10 Aislamiento de quercetina.</b>	<b>51</b>
<b>3.3.11 Cristalización de quercetina para TLC.</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Pruebas Físico-Químicas de los pigmentos: luteína y Quercetina.</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1 TLC de luteína.</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Espectrometría UV-visible de luteína y quercetina.</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1 Espectrometría UV-visible de luteína.</b>	<b>52</b>
<b>3.5.2 Pruebas Físico-Químicas del pigmento flavonoidal.</b>	<b>53</b>
<b>3.5.2.1 Cromatografía de capa fina (TLC) de quercetina.</b>	<b>53</b>
<b>3.5.2.2 Determinación del punto de fusión.</b>	<b>53</b>

<b>3.5.2.3</b>	<b>Determinación del peso molecular de quercetina</b>	<b>53</b>
	<b>Método de Rast.</b>	
<b>3.5.3</b>	<b>Espectrometría UV-visible de quercetina.</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Pruebas de Espectrometría de RMN.</b>	<b>55</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Pruebas de RMN de protones.</b>	<b>55</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Pruebas de RMN de C-13.</b>	<b>55</b>
<b>3.7</b>	<b>Instrumentos, materiales y reactivos.</b>	<b>56</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Instrumentos.</b>	<b>56</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Materiales.</b>	<b>56</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Reactivos</b>	<b>57</b>
	<b>CAPITULO IV</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Pigmentos carotenoidal: luteína.</b>	<b>57</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Cromatografía de capa fina (TLC).</b>	<b>57</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Espectrometría de UV-visible.</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Pigmento flavonoidal: quercetina.</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Discusiones.</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Conclusiones.</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Recomendaciones.</b>	<b>66</b>
<b>5.3</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>
<b>5.4</b>	<b>Anexos.</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Quercetagetina otro compuesto encontrado en <i>Tagetes erecta</i> tiene un grupo OH en posición 6.	9
<b>Figura 2.</b>	Cuando la quercetagetina se deshidroxila en la posición 6 se convierte en quercetina.	9
<b>Figura 3.</b>	Derivados de la quercetagetina como la quercetagetinahexametil-éter.	10
<b>Figura 4.</b>	Pentametil éter flavona.	10
<b>Figura 5.</b>	Biosíntesis de los carotenoides.	12
<b>Figura 6.</b>	Flavano.	22
<b>Figura 7.</b>	Biosíntesis de los flavonoles.	24
<b>Figura 8.</b>	Acomplejamiento del cadmio por quercetina.	32
<b>Figura 9.</b>	Kampherol.	33
<b>Figura 10.</b>	Robinina.	33
<b>Figura 11.</b>	Quercetina.	43
<b>Figura 12.</b>	3, 5, 7,4' tetra oxhidril flavona.	43

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b>	Propiedades de las diferentes clases de flavonoides.	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b>	Identificación de compuestos flavonoidales.	<b>35</b>
<b>Tabla 3.</b>	Aislamiento por TLC de quercetina y Kampherol.	<b>40</b>

## **DATOS GENERALES.**

Título:

“Aislamiento y Caracterización de los Pigmentos Carotenoidales y Flavonoidales de las inflorescencias de *Tagetes erecta* (Marigold, Rosa sisa)”.

Autores:

Bach. PAREDES AREVALO, EDDIE POOL.

Bach. AYALA REYES, JOHN ROBERT

Asesores:

Ing. QUÍM. Cleto Jara Herrera FFBQ.

Ing. QUÍM. Julio Arce Hidalgo FIQ.

**Colaboradores:**

-Laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales de la Facultad de Ingeniería Química UNAP.

-Laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNAP.

-Sección Química de la pontificia Universidad Católica del Perú.

## CAPITULO I

### 1.1. INTRODUCCIÓN.

Los colorantes naturales se perfilan como los obligados sustitutos de los colorantes sintéticos, los que muy a pesar de su toxicidad y de los efectos colaterales que producen en el organismo humano, aun se siguen usando en la tinción de alimentos y bebidas. Por la falta de producción de pigmentos naturales a gran escala para su utilización en la industria alimentaria; aún no se ha eliminado los colorantes artificiales cocarcinogénicos, mutagénicos, y teratogénicos a saber: amaranto, rodamina, tartrazina y eosina etc.

El color aportado intencionalmente por los colorantes sintéticos solo sirve para simular la frescura de las carnes, hortalizas y frutas y darle presentación a los aceites, grasas, frutas y bebidas <sup>(1)</sup>; enmascarando las propiedades reales de los alimentos.

Por eso la atención actual del mundo se orienta hacia la utilización de colorantes naturales extraídos de frutas, flores, hojas, raíces, bulbos, etc. de los vegetales <sup>(1)</sup>

En estos órganos pueden encontrarse pigmentos flavonoidales hidrosolubles tales como: antocianinas, flavonas y flavonoles que poseen actividad biológica ya que actúan en diferentes partes del organismo como complemento de la vitamina C, como principio activo frente a numerosos problemas: de la visión, como anticancerígeno, desintoxicante, antioxidante, entre otros. Por ejemplo la Quercetina se acompleja con el cadmio y actúa contra la nefrotoxicidad que este metal produce. Colorantes tipo carotenoides o xantofilas liposolubles como el  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, luteína, etc.

Se transforman en el organismo humano en vitamina A, además se usa también para protegerse de la luz solar en forma de cremas bloqueadoras. También



existen colorantes Quinonicos, de naturaleza animal como señala Fritz M. (1950) refiriéndose al ácido carmínico aislado de cochinilla (*Coccus cacti*) que se desarrolla sobre especies de cactus y se usa como pigmentos de belleza <sup>(2)</sup>.

En la actualidad se trata de ampliar el uso de los colorantes naturales, al campo medicinal porque constituyen sustancias activas pro-vitamínicas; mejorando la visión, son hipoglucemiante, diuréticos, antioxidantes, equilibran la función de los órganos endocrinos, depuran la sangre, realzan la memoria y tienen acción anti hemorroidal al fortalecer los venas anales<sup>(3)</sup>.

En el presente estudio se ha desarrollado el aislamiento y la caracterización de los colorantes contenidos en las inflorescencias de la especie vegetal conocida como rosa sisa, marigold (*Tagetes erecta*). Por las pruebas preliminares que se han realizado contiene en la fracción éter dietílica colorantes liposolubles, y en la fracción alcohólica colorantes de naturaleza flavonoidal. *Tagetes erecta* es una especie vegetal promisoría en el aporte de colorantes que corresponden a dos familias químicamente diferentes, pero a la vez complementarias en su actividad biológica.

Los carotenoides que se hallan en la fracción liposoluble cumplen el papel de pigmentos accesorio de la clorofila en la fotosíntesis porque protegen a los tipos de clorofila(a, b, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, d) de la intensa radiación solar quemante. Los carotenoides por su color entre amarillo y naranja, captan energía correspondiente a una longitud de onda entre 435-480 nm.<sup>(3)(4)</sup>, longitudes que corresponden a valores energéticos superiores al que requieren las clorofilas, que se hallan a un rango de longitud de onda (630-688 nm) valor de baja energía, lo que explica claramente que los carotenoides son filtros de energía luminosa para las clorofilas.<sup>(5)</sup> mientras los pigmentos flavonoidales cumplen también el papel de anti-oxidantes, acomplejantes de sustancias venenosas,

contra el estrés metabólica, contra la formación de ateromas en la arteria aorta y atractantes de insectos polinizadores o constituyen mecanismos de defensa de la planta contra depredadores. Las flavonas absorben luz a longitudes de onda (250-430) región ultra violeta y violeta del espectro, más corta que las antocianinas (475-560) <sup>(6)</sup>, pero todos ellos contribuyendo en proteger la vida de los efectos de la alta radiación solar.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Es posible aislar y caracterizar (elucidar) los colorantes carotenoidales (tipo luteína) y flavonoidales (tipo flavonol) de las inflorescencias de *Tagetes erecta*?

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. Generales.

- Aislar y caracterizar los pigmentos flavonoidales (flavonol) y carotenoidales (luteína) de las inflorescencias de *Tagetes erecta*.

#### 1.3.2. Específicos.

- Preparar los extractos: éter dietílico para el aislamiento de los colorantes carotenoidales y el extracto alcohólico para el aislamiento de los colorantes flavonoidales.
- Aislar y purificar el colorante carotenoidal.
- Aislar y purificar el colorante flavonoidal.
- Determinar la estructura del colorante carotenoidal por UV-Visible.
- Determinar la estructura del colorante flavonoidal por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

## CAPÍTULO II

### 2.1. Marco teórico.

#### 2.1.1. Antecedentes.

La F.D.A. (Food and Drugs Administration), de los E.E.U.U, organismo de control de alimentos y drogas de repercusión mundial, ha señalado desde la década del 60 del siglo XX la toxicidad de los colorantes artificiales, por la que se restringió su uso, con la finalidad de lograr su eliminación progresiva como aditivo alimentario. Sin embargo estas sustancias se usan con normalidad en toda América Latina para las fabricaciones de bebidas, tinción de productos cárnicos, grasas, lácteas y farináceas; cuyo monopolio se halla en manos de industrias transnacionales estadounidenses pero que operan fuera de E.E.U.U.

Estos colorantes de naturaleza azoica o diazoica: amaranto, rodamina, tartrazina, eosina, etc. Tienen propiedades cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas<sup>(2)</sup>

Martínez A. (2005), señala que los glucósidos de Kampherol inhiben la infección por el Virus del VIH-1<sup>(14)</sup>.

Wisegeeck. (2010), señala que el kampherol es un polifenol que protege al organismo contra las enfermedades cardíacas y el cáncer fundamentalmente de ovario en mujeres postmenopáusicas y contra cáncer de mamas<sup>(15)</sup>.

Según Morales Martín (2004), señala que la quercetina tiene actividad quelante (complejante) con el cadmio y esta actividad se usa para eliminar el Cd<sup>++</sup> de los riñones cuando se produce nefrotoxicidad<sup>(20)</sup>.

Álvarez E. (2003), señala que los flavonoides más estudiados in- vivo, son: quercetina y genisteina han demostrado ser activos por vía tópica y oral frente a oncomas inducidas por diferentes tipos de agentes<sup>(21)</sup>.

Benavente García O. (2008), señala acerca de los usos y propiedades de los flavonoides de los cítricos que poseen actividad anti cáncer y antiinflamatoria. Ha quedado demostrado mediante ensayos in- vivo la capacidad inhibitoria que tiene la quercetina en la colonización del pulmón con la línea celular B16-BL6 de melanomas<sup>(22)</sup> y el mismo autor señala que la quercetina tiene actividad antiangiogénica que evita la formación de vasos sanguíneos que impiden la infiltración de las células tumorales y significativamente la proliferación de neoplasmas.

Pérez G. (2003) señala que la quercetina elimina la citotoxicidad del agua oxigenada<sup>(23)</sup>.

T. P. Tim Custinie; Andrew J. Lamb, (2005), señalan que la actividad antimicrobial de la quercetina ha sido parcialmente atribuida a la inhibición del DNA girasa, en pruebas hechas contra *Escherichia coli*<sup>(34)</sup>.

Williarson et.al, 1996; M, Ebisawa Et al. (2008), señalan que los flavonoles (clasificado como flavonoides) pueden presentar propiedades antioxidantes como la quercetina<sup>(34)</sup>.

Numerosas investigaciones han demostrado que estas sustancias poseen propiedades benéficas a la salud entre los que se encuentran: protección contra los estados inflamatorios, prevención enfermedades cardiovasculares y reducción del riesgo de diversos tipos de cáncer. Particularmente útil para las personas diabéticas, los flavonoides son sustancias que poseen varios efectos benéficos. Entre éstas, está el hecho de que ayudan a mejorar la sensibilidad de las células beta que producen la insulina. Por otra parte, también protegen la retina de los ojos. Los extractos de semilla de uva, y el de *Tagetes erecta*, contienen una buena cantidad de proantocianidinas. Se ha encontrado que las

proantocianidinas reducen los niveles de glucosa en los pacientes de diabetes tipo 2.

*Tagetes erecta* HBK (marigold rosa sisa) contiene varios principios activos, tiene una extensa diversidad de usos, sus hojas contienen aceites esenciales tales como: d-limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, dipenteno, ocimeno, linalol, geraniol, mentol, tagetona, nonalol, tuyona, linalilacetato. <sup>(8)</sup>.

Las flores contienen tiofeno en asociación con poliacetilenos, cumarinas, alcaloides pero la que es visible en sus pétalos por su color amarillo naranja o amarillo claro se debe a pigmentos carotenoidales: luteína, esteres de luteína, Zeaxantina, estos pigmentos son utilizados como colorante en alimentos cocidos al horno, bebidas, cereales para desayuno, goma de masticar, productos a base de huevo, grasas y aceites, productos lácteos, sopas, frutas procesadas y jugos de frutas, etc. y como suplemento nutricional. <sup>(9)</sup>

Otros colorantes importantes que posee Marigold en las flores son de tipo flavonoides: quercetina, kampherol y quercetagetina como glucósidos y como agliconas que complementan la función de los carotenoides.

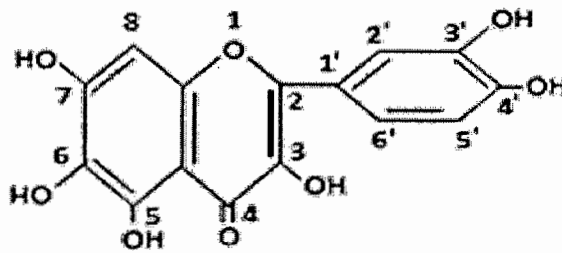
La quercetina es un colorante hidrosoluble que además de la propiedad de colorear los alimentos tiene efecto antioxidante y antiinflamatorio. Posee actividad relajante de la musculatura lisa vascular <sup>(10)</sup>, posee actividad antimicrobial atribuida a la inhibición del DNA girasa en pruebas realizadas con *Echerichia coli* <sup>(11)</sup>.

El kampherol es un flavonoide dietético ampliamente distribuido en frutas y verduras, estudios epidemiológicos han demostrado un efecto protector contra el riesgo de cáncer de ovario, es efectivo en la reducción del factor de crecimiento

vasculó endotelial en células de cáncer de ovario. Posee actividad antioxidante y protege la mucosa gástrica para evitar la formación de úlceras <sup>(12)</sup>.

Además el kampherol es el responsable de inducir actividad osteoblástica para formar células óseas cuando se trata con plantas que poseen kampherol después de una fractura, el callo óseo se forma con rapidez, kampherol también actúa como fitoestrógeno.

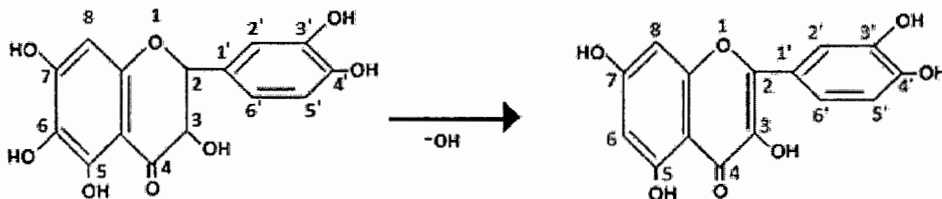
La quercetagina es otro compuesto encontrado en *Tagetes erecta* tiene un grupo OH en posición 6 Fig.01



Quercetagina

3, 5, 6, 7,3',4'Hexahidroxiflavona.

Cuando la quercetagina se deshidroxila en la posición 6 se convierte en quercetina. Fig. 02



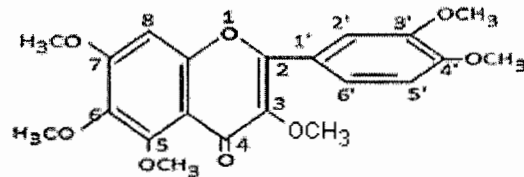
Quercetagina

Quercetina

3, 5, 6, 7,3',4' Hexadihidroxiflavona. 3, 5, 7,3',4' Pentahidroxiflavona.



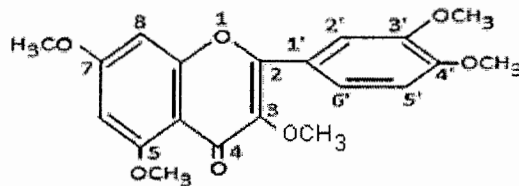
También se conocen derivados de la quercetina como la quercetinahexametil éter. Fig.03



Quercetinahexametil éter.

La quercetinahexametil éter se forma por metilación de los oxhidrilos en posiciones 3, 5, 6, 7, 3', 4'.

La quercetina pentametil éter se forma por metilación de los oxhidrilos en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4'.



Pentametil éter flavona.Fig.04

## 2.2. Familias de colorantes que posee marigold: carotenoides y flavonoides.

Marigold posee 2 colorantes naturales un carotenoide tipo luteína y un flavonoide clase flavonol (quercetina).

### 2.2.1. Carotenoides:

Son poliisoprenoides con 40 átomos de carbono (tetraterpenos), muchos de ellos se encuentran formando parte de las estructuras fotosintéticas como pigmentos

accesorios, pero también en organismos no fotosintéticos como hongos y bacterias y en organismos animales aunque en estos proviene generalmente de la dieta.

Los carotenoides van desde estructuras acíclicas hasta estructuras bicíclicas, pueden contener también un número elevado de dobles enlaces carbono-carbono (C=C) hasta 15 en algunos casos, esto explica el intenso color que suele caracterizarlos.

Muchos de los carotenoides son hidrocarbonados sin grupos funcionales y reciben el nombre de carotenos tales como: licopeno, neurosporeno,  $\alpha$ -caroteno, (+)- $\xi$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno<sup>(7)</sup>.

El nombre de xantofilas suele reservarse en cambio para aquellos tetraterpenos que poseen funciones oxigenadas, hidroxilos o carbonilos principalmente tales como:  $\beta$ -criptoxantina de la *Carica papaya* y  $\alpha$ -doradexantina de *Carassiu sauretus* y Zeaxantina muy difundida en plantas como el maíz y en crustáceos que lo asimilan de los alimentos marinos.

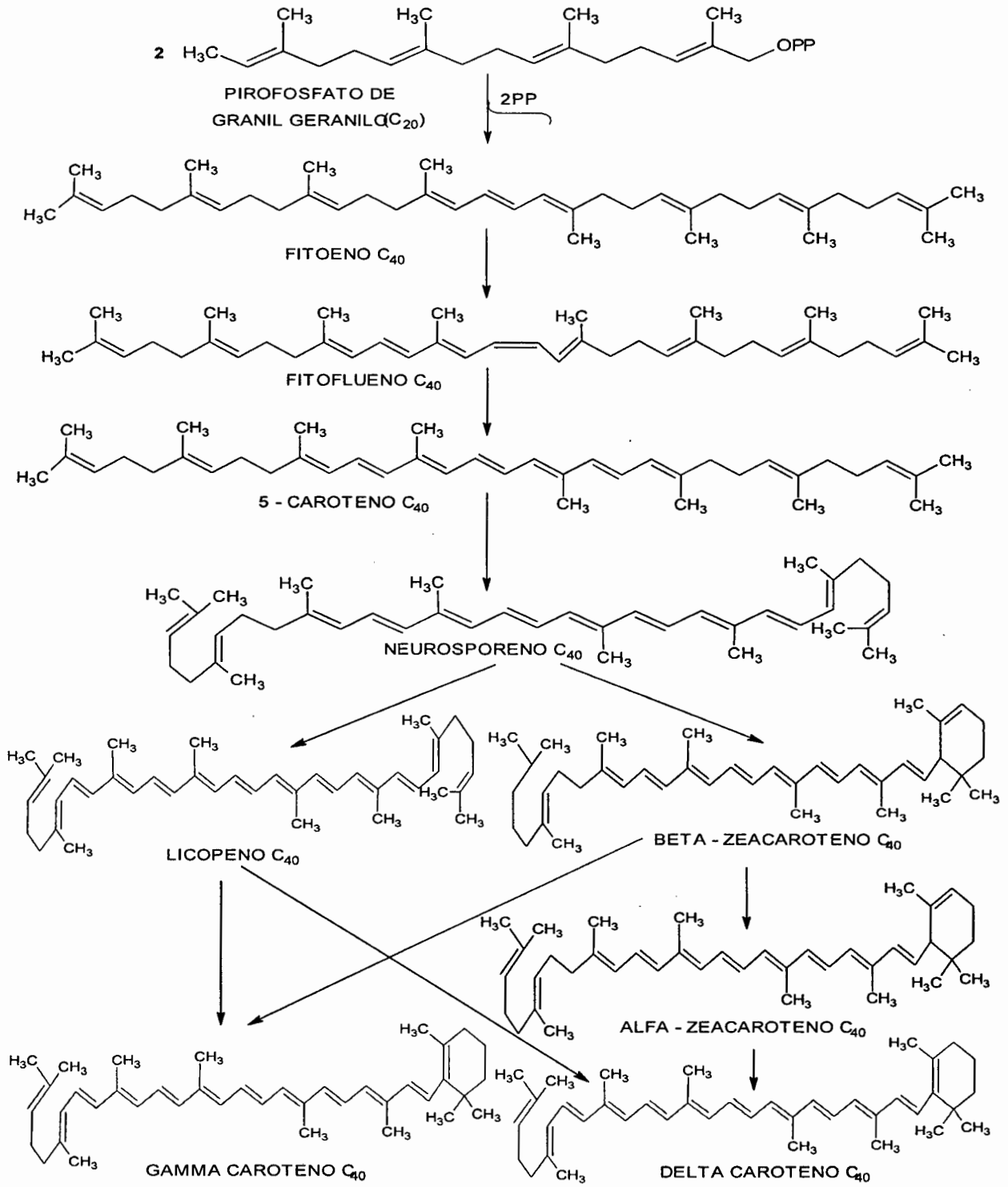
Algunos carotenoides poseen menos de 40 átomos de carbonos, como consecuencia de algún truncamiento oxidante y suele denominárselos apocarotenos tales como:  $\beta$ -Ionona (C<sub>13</sub>), Grasshoppers Ketone C<sub>13</sub> presente en *Romalae microptera* y ácido trisporico (C<sub>18</sub>) sintetizado en hongos, la Vitamina A<sub>1</sub> (C<sub>20</sub>), crocetina C<sub>20</sub>, norbixina de *Bixa orellana* (C<sub>24</sub>)<sup>(15)</sup>.

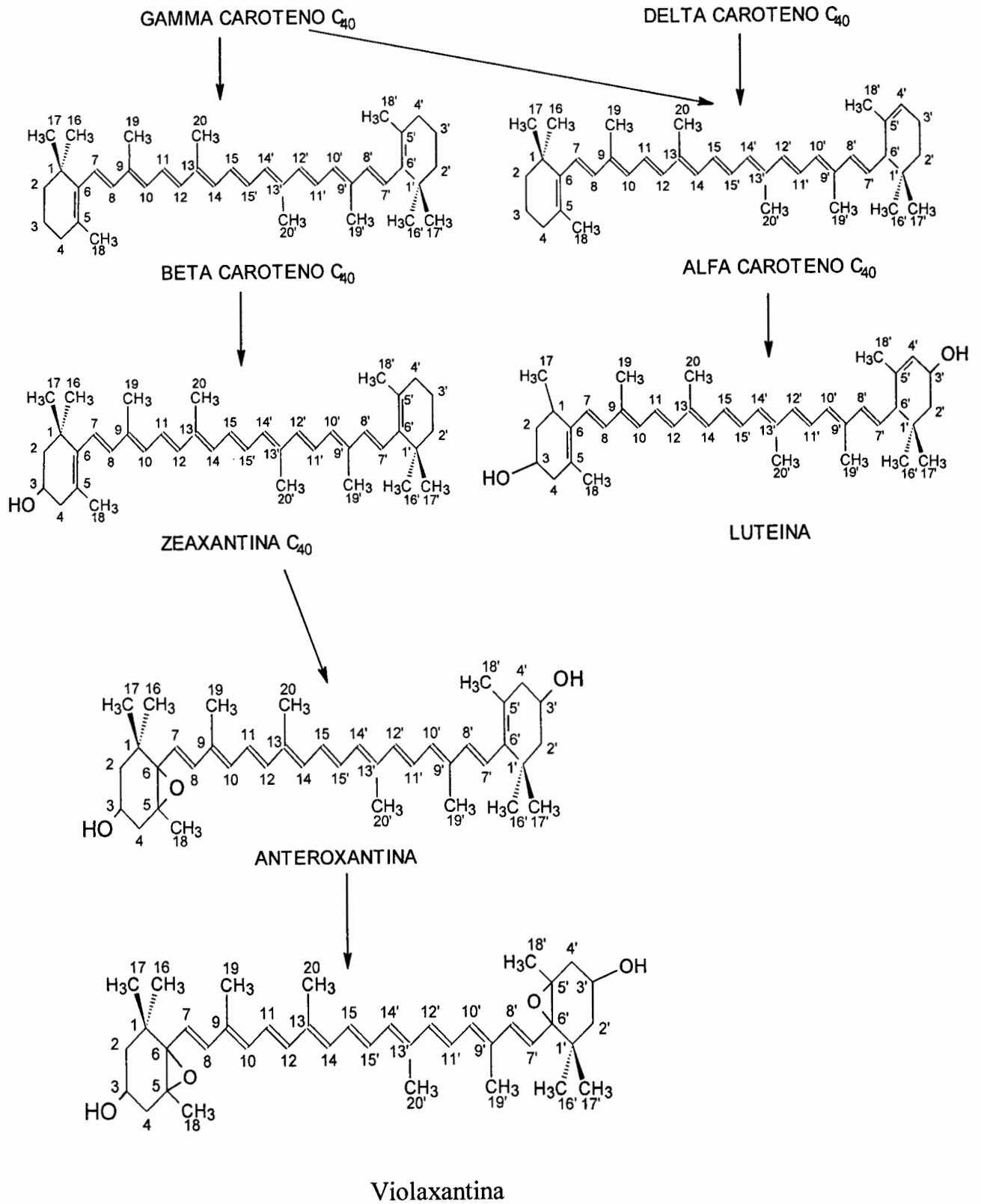
Los carotenoides provienen biosintéticamente del fitoeno (hidrocarburo poliinsaturado) que se forma por dimerización reductora del pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP).

### **2.2.1.2. BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES.**

Los carotenoides provienen biosintéticamente del fitoeno (hidrocarburo poliinsaturado) que se forma por dimerización reductora del pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP), es decir siguiendo la biosíntesis de los terpenoides vía el ácido mevalónico. (Ver figura 08) <sup>(16)</sup>

Figura 05.- biosíntesis de los carotenoides.





Hay una línea de carotenoides derivados del  $\beta$ -caroteno como se puede observar en la figura 07 y son  $\beta$ -criptoxantina, anteroxantina y violaxantina.

La luteína presente en marigold es un derivado de  $\alpha$ -caroteno.

### **2.2.1.3 Clasificación de los carotenoides.**

#### **2.2.1.3.1. B-caroteno**

El beta caroteno fue el primer carotenoide purificado. En 1831, Wackenroder lo aisló en forma cristalina a partir de la zanahoria, dándole el nombre que lleva, derivado de la denominación latina de este vegetal (*Daucus carota*).

Aunque su valor vitamínico es solamente de alrededor de un sexto del valor del retinol (la “vitamina A” en su forma metabólicamente activa), su abundancia en los vegetales y también en algunos alimentos animales, como la leche, hace de él una fuente fundamental de vitamina A para muchísimas personas. Incluso en dietas relativamente pobres en productos vegetales, los carotenoides representan alrededor del 30% de la ingesta total de vitamina A. Son ricas en beta caroteno la zanahoria, que contiene entre 70 y 140 mg/kg, los vegetales verdes como la espinaca y algunas frutas. En los vegetales verdes el beta caroteno se encuentra en los cloroplastos, junto con xantofilas, y suele ser el carotenoide mayoritario.

El beta-caroteno se emplea mucho como colorante alimentario. Al ser insoluble en agua, no es fácil de utilizar, por ejemplo para colorear bebidas refrescantes, una de sus principales aplicaciones. En este caso, se utiliza en forma de polvo extremadamente fino, en partículas de alrededor de 0.4 micras de diámetro, que se puede dispersar en el agua, con la ayuda de un polisacárido como la goma arábica.

#### **2.2.1.3.2. Licopeno**

El licopeno es el carotenoide más abundante en el tomate. Aunque el contenido depende mucho del grado de maduración (aumenta con ella), exposición a la luz (también aumenta).

Una diferencia fundamental entre la estructura del licopeno y la del beta-caroteno es que los anillos de los extremos se encuentran abiertos. De hecho, el licopeno es el precursor biosintético del b-caroteno en el tomate. El licopeno no tiene actividad como la vitamina A, pero es un antioxidante muy eficiente frente al oxígeno singlete.

#### **2.2.1.3.3. Cantaxantina.**

La cantaxantina se encuentra en la seta *Cantharelluscinna barinus*, de donde se extrajo por primera vez, y de cuyo nombre latino procede el del carotenoide.

La cantaxantina se utiliza extensamente como aditivo en los piensos destinados a los salmónidos, para dar color a su carne, y en el destinado a las gallinas y pollos, para dar color a la yema del huevo, a la piel y carne. El color se obtiene por depósito directo o por transformación de la cantaxantina en otros carotenoides.

La cantaxantina se utiliza como “bronceador químico”, dado que se deposita en la piel y permite obtener un tono dorado sin necesidad de sol.

#### **2.4.1.3.4 Astaxantina.**

La astaxantina es el carotenoide más común en los animales. Es el principal pigmento responsable del color rosa de la carne del salmón o de la trucha, y también de los huevos de algunos peces. El músculo del salmón del Atlántico

contiene entre 4 y 10 mg de astaxantina por kilogramo, mientras que el salmón del pacífico, más intensamente coloreado, contienen entre 14 y 40 mg/ kg.

Como los demás animales, estos peces no pueden sintetizar los carotenoides “del novo”, por lo que dependen de los contenidos de la dieta, que si pueden transformar unos en otros, con ciertas limitaciones.

#### **2.2.1.3.5 Zeaxantina.**

La zeaxantina se encuentra bastante distribuida entre los vegetales, acompañando a otros carotenoides. Es el carotenoide típico del maíz, y de ahí procede su nombre. También se encuentra en muchas bacterias.

#### **2.2.1.3.6. Luteína.**

La luteína se encuentra en muchos vegetales, como las judías verdes, las espinacas o el brócoli, aunque su color esta enmascarado por la clorofila. Junto con la zeaxantina, es el carotenoide responsable del color de la yema de huevo.

Se utiliza precisamente para colorear la piel, la carne y los huevos; no solo para darles frescura y buena presentación sino también por su bioactividad en la retina.

La luteína tiene dos grupos hidroxilo, pero en los alimentos se encuentra generalmente en forma no esterificada. Es abundante en los pétalos de, *Tagetes erecta* (marigold, rosa sisa), se encuentra como mono o di ésteres de los ácidos palmítico o mirístico.



#### **2.2.1.4 Luteína en *Tagetes erecta*.**

*Tagetes erecta*, marigold, rosa sisa posee unas flores (inflorescencias), con un elevado contenido de luteína en sus pétalos, aunque luteína no tiene actividad como vitamina A, se ha señalado que justo con la zeaxantina se encuentran presentes en la retina humana, donde absorben la luz de la zona azul del espectro, y protegen el órgano de la visión de la enfermedad conocida como degeneración de la macula. La macula y la porción de retina responsable de la mayor agudeza visual, esta enfermedad da lugar a la pérdida de la visión severa en E.E.U.U, y Europa en personas mayores de 55 años y por eso se vende extensamente como “suplemento dietético”, en las casas biológicas de E.E.U.U, Francia, Alemania, España etc.<sup>(29)</sup>

#### **2.3 Propiedades físico-químicas de los carotenoides.**

Los carotenoides son compuestos lipídicos, aunque existen algunas excepciones, por lo que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, éter de petróleo, éter dietílico, hexano, cloroformo y piridina, entre otros.

Debido a su carácter hidrofóbico se encuentran normalmente en ambientes lipófilos, como en membranas, si bien su asociación con proteínas o reacciones de glicosilación les permiten también estar presentes en medios acuosos.

En relación con el papel de los pigmentos carotenoides en membranas de distinta naturaleza, cabe señalar que los carotenos permanecen en el interior de las mismas, mientras que las xantófilas pueden encontrarse en otras

localizaciones en las que interaccionan a través de sus grupos hidroxílicos con moléculas de fosfolípidos.

La asociación con proteínas permite además a los carotenoides permanecer en una posición correcta con respecto a otras moléculas, siendo ejemplos claros de este hecho los complejos pigmento-proteína que mantienen a carotenoides y clorofilas en posiciones adecuadas para los procesos de transferencia de energía que tienen lugar durante la fotosíntesis.

Los carotenoides ácidos pueden formar sales sódicas o potásicas solubles en agua por tratamiento con álcali, como es el caso de bixina, astaceno o metiloxantina.

Las carotenoproteínas son también solubles en agua y muy estables. El color de estos complejos es estable durante años a temperatura ambiente y en contacto con el aire, por lo que tienen un gran interés como posibles colorantes.

El carácter hidrofóbico de la mayoría de los carotenoides hace que tiendan a la agregación y cristalización en medio acuosa, siendo un ejemplo típico los cristales de licopeno en los cromoplastos de los tomates.

Los puntos de fusión son elevados, generalmente comprendidos en el rango 130-220°C. La solubilidad de los cristales generalmente pequeña, siendo mejor en disolventes orgánicos clorados y en benceno.

El color se debe concretamente a la oscilación de los electrones a lo largo de la cadena hidrocarbonada insaturada. La absorción de luz produce el paso de la molécula de su estado energético basal a otro de mayor energía llamado estado excitado. En el caso de los carotenoides, la transición electrónica se produce de orbitales p enlazantes a orbitales p antienlazantes.

La asociación de carotenoides con proteínas estabiliza a los pigmentos además de extender el rango de colores a verde, azul y púrpura. Así, el máximo de absorción de astaxantina en acetona es 478 nm, mientras que el de la  $\alpha$ -crustacianina es 632 nm, de ahí su coloración azulada.

Analíticamente, el color de los carotenoides es de gran importancia, ya que un cambio de color durante el análisis es indicativo de degradación o de modificación estructural de los pigmentos. De igual forma, el color permite monitorizar su separación mediante cromatografía en columna y en capa fina.

El espectro de absorción UV de los carotenoides es de interés para aclarar su estructura. Normalmente aparecen tres máximos cuyas longitudes de onda ( $\lambda$ ) dependen del disolvente empleado para la medida, si bien el máximo de absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de los carotenoides *in vivo* aparece a longitudes de onda unos 10 nm mayores en comparación con los máximos en hexano o etanol, debido a su presencia en un ambiente proteico o lipídico.

Independientemente del disolvente, las  $\lambda_{\text{máx}}$  aumentan con la longitud del cromóforo, de forma que los dobles enlaces no conjugados no afectan significativamente al espectro.

El espectro de los carotenoides cíclicos en los que el cromóforo no se extiende a los anillos presenta también bandas de absorción persistentes, aunque cuando la conjugación se extiende a anillos existen impedimentos estéricos entre el grupo metilo en el carbono 5 del anillo y el átomo de hidrógeno del carbono 8 de la cadena poliénica, que hacen que los dobles enlaces de los anillos no sean coplanares con los de la cadena poliénica.

Como consecuencia se produce un desplazamiento hipsocrómico (a  $\lambda$  menores) de las  $\lambda$  máx, un efecto hipocrómico (disminución de la absorción) y una pérdida de estructura fina.

Así, la primera banda de absorción de carotenoides con dos anillos  $\beta$ , como  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina, se reduce a una mera inflexión. Cuando existen grupos carbonilos conjugados con la cadena poliénica, se produce un desplazamiento batocrómico (a  $\lambda$  mayores) de los máximos, además de una pérdida de estructura fina, de forma que el espectro de estos compuestos, como astaxantina, cantaxantina o capsorrubina, entre otros, se reduce a una curva simétrica o a una banda principal con inflexiones a uno y otro lado. <sup>(29)</sup>

### **2.3 Flavonoides.**

Son sustancias que elaboran las plantas durante su metabolismo secundario para actuar como mecanismo de defensa contra depredadores, dan vistosidad a los órganos fotosensibilizadores de la atracción de insectos polinizadores y cumplen tres funciones con las que la especie vegetal afirma su supervivencia.

Químicamente un flavonoide posee una estructura  $C_6-C_3-C_6$  que pueden sufrir modificaciones y adiciones de grupos funcionales hasta constituirse en una

familia muy diversa de compuestos donde todos los productos finales pueden ser polifenoles solubles en medio acuoso.

Los flavonoides son todos estructuralmente derivados de una sustancia progenitora la flavona cuya estructura es la siguiente: Fig.09

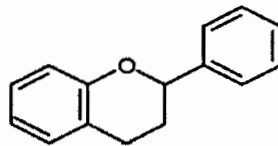


Fig. 06.- flavano (2-fenil venzo pirona o 2-fenilcromano)

Harborne.J.B. (1973), señala que existen 10 clases de flavonoides reconocidos, a continuación describiremos las propiedades de cada una de ellas:<sup>(6)</sup>

Tabla 1. Propiedades de las diferentes clases de flavonoides.

CLASES DE FLAVONOIDES	DISTRIBUCIÓN	PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS
Antocianinas.	Constituyen los pigmentos escarlata, rojo, púrpura, azulejo pálido y azul de las flores, también de las hojas y otros tejidos.	Solubles en agua pueden observarse en el aparato de espectroscopia UV-visible a longitudes de onda entre 515 a 545 nm. En cromatografía de papel son móviles, en el sistema BAW (n – butanol-ácido acético – agua, proporción 4: 1: 5). Capa superior.
Leucoantocianidinas.	Principalmente incoloros, presentes	Se transforman en antocianidinas (coloridas)

	en el duramen de las maderas y en las hojas de las plantas maderables.	extractable en alcohol amílico cuando se calientan los tejidos vegetales durante media hora en HCl 2M.
Flavonoles.	Principalmente copigmentos incoloros tanto en flores ciánicas o aciánicas ampliamente distribuida en las hojas.	Después de la hidrólisis acida los spots (forestales) toman el color amarillo brillante en luz UV, las longitudes de onda máxima espectral está entre 350 a 386 nm.
Flavonas.	Como los flavonoles.	Después de la hidrólisis acidas, los spots se vuelve marrón sobre cromatograma forestal a longitud de onda máxima espectral de 330 a 350 nm.
Glycoflavonas.	Como los Flavonoles	Contienen azúcares ligados en uniones C – C a la molécula precursora móviles en agua, diferentes a flavonas normales
Biflavonilos	Incoloro, casi siempre enteramente reducidos a los gimnospermas.	Sobre cromatogramas corridos en BAW los spots se desplazan a muy altos valores de RF
Chalconas, Auronas.	Pigmentos de flores amarillas ocasionalmente presentes en otros tejidos	Da color rojo al contacto con amoníaco, el color del combinado puede ser observado in-vitro a un valor de longitud de onda visible de 370 a 410 nm

Flavanonas.	Incoloros en hojas y frutas (especialmente en cítricos)	Da intensa coloración roja con Mg/HCl ocasionalmente muestra un intenso sabor amargo
Isoflavonas.	Incoloros, siempre en raíces está presente en leguminosas y verbenáceas.	Móvil sobre papel en agua, las pruebas de color no son específicas.

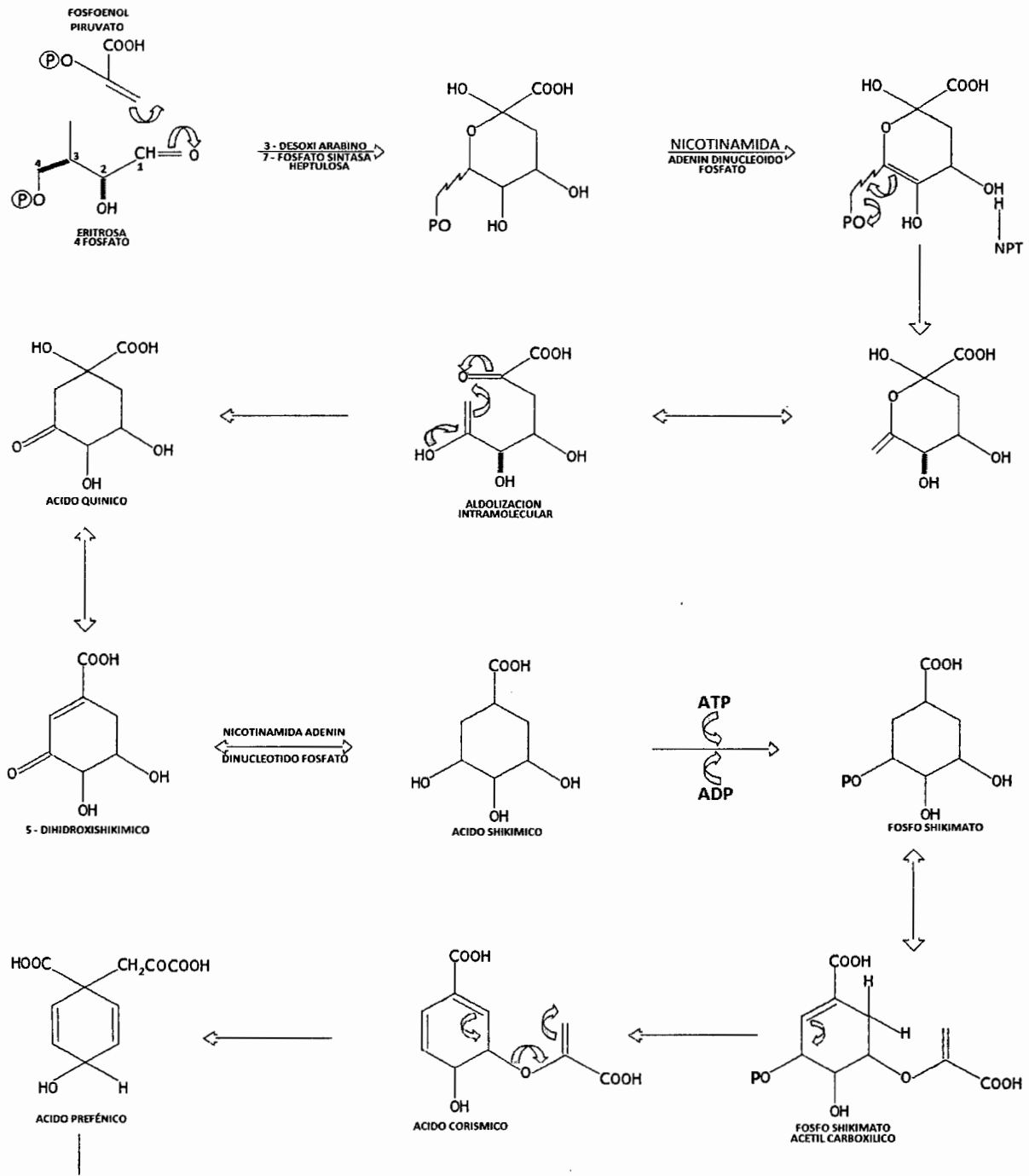
La literatura señala que los flavonoides presentes en *Tagetes erecta* son fundamentalmente flavonoles, tales como: kampherol, quercetina, quercetagetina, etc. <sup>(2)</sup>.

La búsqueda de principios activos en flavonoides desde el punto de vista farmacológico tiene algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales, quizá la más importante sea la uniformidad de la configuración química de toda la familia de modo que las relaciones entre estructura y su actividad son más fáciles de establecer.

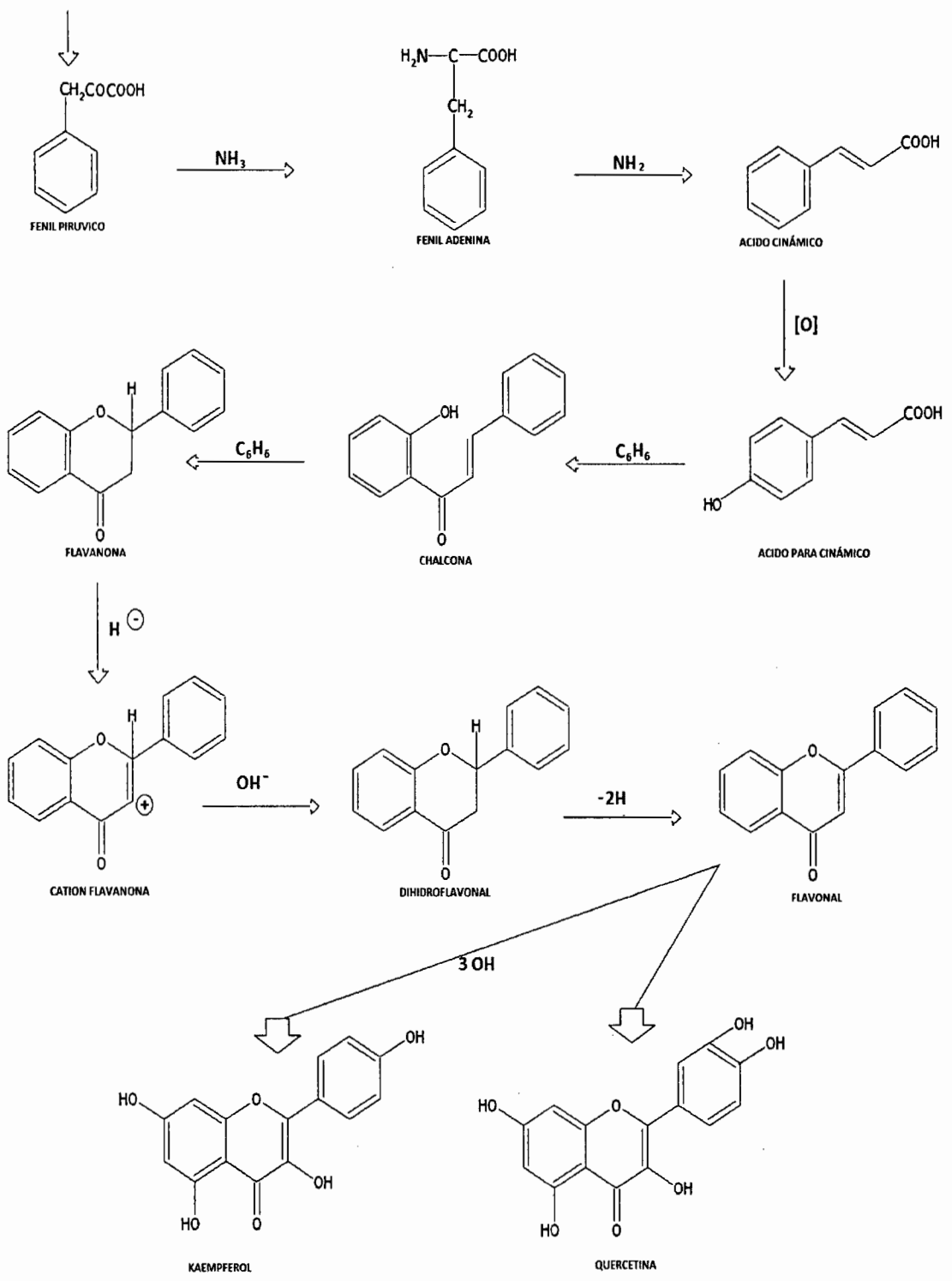
### 2.3.1 Biosíntesis de los flavonoles.

Sería muy largo señalar la biosíntesis de todos los flavonoides a través de la ruta de los shikimatos por esto solo seguiremos la líneas críticas que nos conduce a la biosíntesis de los flavonoles, con el esquema que señala BU'LOCKJOHN en su libro: Biosíntesis de Productos Naturales por condensación de dos productos foto sintéticos, la eritrosa 4-fosfato con el fosfoenolpiruvato <sup>(17)</sup> (Ver FIG.10).

Fig. 07.- Biosíntesis de los Flavonoles siguiendo la ruta del ácido shikimato.







## 2.4 Taxonomía y clasificación de la especie vegetal en estudio.

La especie vegetal ha sido clasificada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) usando como patrón de comparación exicatas debidamente clasificadas y teniendo en cuenta los actuales criterios filogenéticos<sup>(19)</sup>, responden a la jerarquización siguiente:

- Reino : Plantae
- División : Magnoliophyta
- Clase : Magnoliopsidae
- Orden : Asterales
- Familia : Asteraceae
- Sub familia : Asteroideae
- Género : *Tagetes*
- Especie : *Tagetes erecta*
- Nombre vulgar : rosa sisa, cempasúchil, cempaxóchitl, cempoal, flor del muerto, clavel chino y también conocido como marigold.

### 2.4.1 Descripción Botánica.

**Hábito y forma de vida:** Planta erecta.

**Tallo:** Estriado, a veces acostillado, glabro o pubescente.

**Hojas:** Opuestas en la parte inferior, alternas en la parte superior; de hasta 20 cm de largo, pinnadas, de 11 a 17 foliolos, lanceolados a linear-lanceolados, de

hasta 5 cm de largo y 1.5 cm de ancho, agudas a acuminadas, aserrados a subenteros, los inferiores de cada hoja frecuentemente setiformes (en forma de hilos), los superiores reducidos, a veces completamente setiformes; con glándulas redondas abundantes.

**Inflorescencia:** Cabezuelas solitarias o agrupadas por varias, sobre pedúnculos de hasta 15 cm de largo, provistos de brácteas pinnadas con segmentos cerdiformes en el ápice.

**Cabezuela/Flores:** Cabezuela con involucre campanulado, de 13 a 20 mm de alto y 9 a 25 mm de ancho, con 5 a 11 brácteas, glabras y de ápices triangulares, con dos hileras de glándulas. Flores liguladas: 5 a 8, o más frecuentemente numerosas, amarillas a rojas, sus láminas oblanceoladas a obovadas de 1 a 2 cm de largo. Flores del disco: 150 a 250 en las cabezuelas sencillas, en las "dobles" muestra diferentes grados de transformación en lígulas, corolas amarillas a anaranjadas, de 8 a 10 mm de largo.

**Frutos y semillas:** Aquenios lineares de 7 a 10 mm de largo, glabros o hispídulos en los ángulos, vilano de 1 o 2 escamas acuminadas de 6 a 12 mm de largo y 2 o 3 escamas romas de 3 a 6 mm de largo, más o menos unidas entre sí.

**Raíz:** Fibrosa.

**Características especiales:** Muy aromática al estrujarse. En algunas regiones también se encuentran formas rellenas asilvestradas<sup>(18)</sup>.

#### **2.4.2 Distribución geográfica y ecológica**

Probablemente nativa de México. Amplia mente distribuida en América tropical y en los países de Colombia, Ecuador, Panamá, Perú.

Se le encuentra en huertos familiares o terrenos de cultivo. *Tagetes erecta* rara vez ya no se le localiza en forma silvestre por haberse iniciado su domesticación desde épocas prehispánicas. Sin embargo hay especies emparentadas que se les puede observar creciendo asociadas a distintos tipos de selva tropical caducifolia, subcaducifolia, bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino y pino.

#### **2.4.3 Usos etnobotánicos y etnofarmacológicos.**

**Medicinales.** Se le recomienda para dolor de estómago, parásitos intestinales, empacho, diarrea, cólicos, afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión, dolor de muelas, lavados intestinales y para expulsar gases.

El tratamiento consiste en el cocimiento de las ramas, con o sin flores, en sahumero o fritas para aplicar de manera oral o en la parte afectada; otras formas de uso son en baños, untada, en fomentos o inhalada, a veces mezclada con otras plantas. Se dice, además, que sirve para enfermedades de tipo respiratorio como tos, fiebre, gripe y bronquitis.

El aceite muestra actividad antimicótica, para el tratamiento de la candidiasis y para atacar las infecciones de hongos en las plantas de los pies.

Desde épocas prehispánicas es una tradición que esta planta de flor amarilla, se utilice como parte de la ofrenda del día de los muertos, los días 31 de octubre, 1º y 2 de Noviembre, se llevan flores al panteón y también adornan las hermosas y ricas ofrendas que se ponen en las casas junto con alimentos, pues se tiene la

creencia de que su color encendido iluminará el camino de las almas que vienen a visitarnos los primeros días de noviembre. También es usada como símbolo del amanecer.

**2.4.4. Propiedades Biocidas.** La raíz contiene tiofeno, que tiene un efecto inhibitor sobre los nématodos y aléurodos y frente la invasión de ciertas malezas. Actúa como repelente de los áfidos y hormigas cortadoras. Por estas propiedades se siembra asociado a otros cultivos y además puede usarse como biofumigante.

**2.4.5. Propiedades Colorantes.** Los mexicanos señalan que en épocas precortesianas (antes de la llegada de Hernán Cortez) la flor se utilizaba para teñir las prendas de vestir y algunas fibras textiles.

Los pigmentos de la inflorescencia anaranjada carotenoides (tipo luteína) sirven como colorantes vegetales en alimentos para humanos (huevo con yema amarilla, coloración de sopas de pasta, piel y grasa amarilla de aves y reses) y para medicamentos humanos (cápsulas de luteína)

## **2.5. Constituyentes químicos de *Tagetes erecta***

Contienen aceites esenciales tales como:

Linalol, carvona, cineol, ocimeno, eugenol, anetol, dextralinoleno, tuyona, quercetagina.

Sustancias colorantes como: quercetagetina, quercetagitrina, tagetiina, quercetina y Kampherol.

Insecticidas como: piretrinas, bitienilacetilino, helenio

Flavonoides, piretrinas, bitienilacetileno, helenio, y derivados del selenofeno.

Ácidos grasos: mirístico, palmítico, esteárico, laúrico, oleico <sup>(20)</sup>.

### **2.5.1 Quercetina, pigmento natural:**

Por su estructura química es un flavonoide pentahidroxílico que se aísla como cristales amarillos, punto de fusión 316-317°C, soluble en alcohol-acetona y ácido acético (Handbook and Physics and Chemistry CRC- Press 1988).

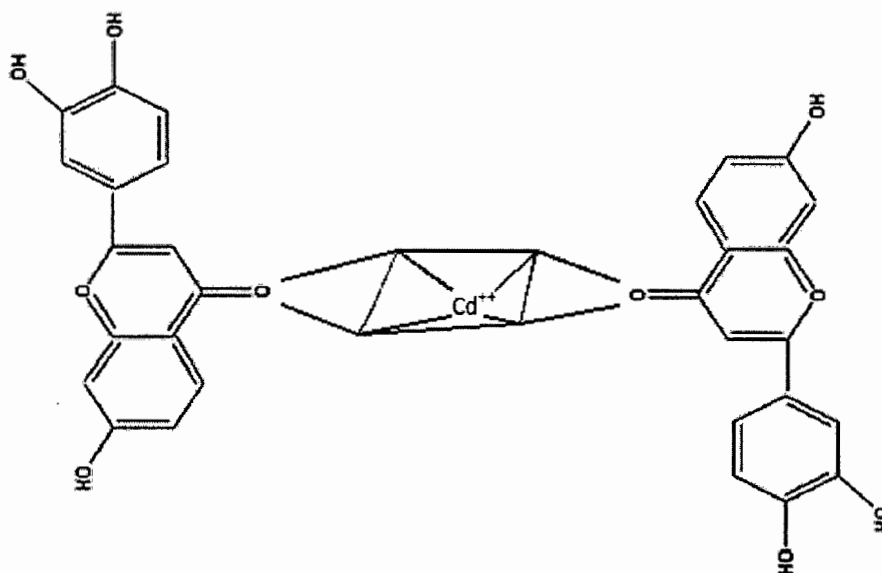
#### **2.5.1.1 Propiedades biológicas de la quercetina.**

La quercetina tiene propiedades cardiotónicas actúa potenciando el músculo cardiaco mejorando la circulación sanguínea y la fragilidad capilar evitando que se rompan los capilares por lo que se usa para prevenir el sangrado.

La quercetina asociada con la apigenina eliminan las dolencias digestivas relacionados con enfermedades hepáticas tales como: sensación de plenitud y vómitos, quercetina, rutina, kampherol, tiene propiedades anti- ulcerosas porque protegen la mucosa gástrica <sup>(9)</sup>.

El cadmio con la quercetina forma un complejo bidentado híbrido Sp<sup>3</sup>, donde los electrones del oxígeno de la quercetina están desapareados en la esfera interna de coordinación y de esta forma se elimina dando lugar a un decremento de proteínas séricas de bajo peso molecular en la orina. (Ver fig. 04).

Fig. 08.- Acomplejamiento del cadmio por quercetina cuando forma el complejo bis quercetinato cadmiato II.



La quercetina es una de los flavonoides más abundantes en la dieta humana que se ha descrito como un potente recolector de basura (scavenger) que constituyen radicales libres del oxígeno ( $\text{o}^-$ ) y un buen quelante de metales, además posee un efecto citoprotector del riñón, preserva el daño tubular y la inflamación intersticial, previene la peroxidación lipídica en la obstrucción biliar y disminuye la deposición de colágeno y de fibrogénesis. La dosis administrada puede ser de 50 mg /Kg/Día (un hombre de 70 Kg recibirá una dosis diaria de 3,5 gramos).

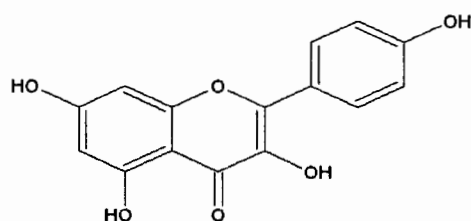
Los mecanismos por los cuales la quercetina reduce la nefrotoxicidad producida por el cadmio, se debe a las propiedades siguientes:

Actúa como antiinflamatorio, relajante vascular a través del mecanismo del ácido araquidónico, los productos finales de la cascada del ácido araquidónico

pueden ser considerado como agentes homeostáticos implicados en el mantenimiento de la integridad de los procesos inflamatorios del sistema cardiovascular y del sistema renal. Un desequilibrio en la síntesis de prostaglandinas puede provocar alteraciones cardiovasculares, los flavonoides han demostrado ser inhibidores de la síntesis de eicosanoides al actuar sobre la actividad de la lipooxigenasa y de la ciclooxigenasa.

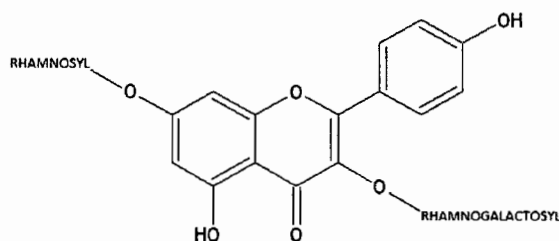
### 2.5.2 Kampherol

Por su estructura química es un flavonoide tetrahidroxilo, la denominada: 3, 5, 7,4' tetrahidroxiflavona.Fig.09.



Kampherol (3, 5, 7,4'tetrahydroxyflavona) se presenta como agujas amarillas, punto de fusión 276-278.

Fritz M.Da cuenta que se halla como glicósido en la robina (kampherol 3-O – robinosido 7 – O - RHAMNOSIDO).Fig.10



Robinina



Se presenta en forma s de agujas amarillas p.f. 196 – 197 y se aísla de Robinapseudo acasia. El kampherol se encuentra en Rosa multiflora como multiflorina en Delphynium consolida, Prunus spinosa, Crocus asturicus, etc.

Como kampherido o kampherol 4-metil éter se encuentra en la raíz de galanga, rizomas de Alpinia officinarum, aislado como agujas amarillas p.f. 227 – 229 (2).

El kampherol presente en las inflorescencias protege a la flor de la luz ultravioleta.

#### **2.5.2.1. Propiedades Biológicas del Kampherol.**

Wikipedia la enciclopedia de flavonoides señala que el kampherol protege la mucosa gástrica y tiene propiedades anti – ulcerosas <sup>(25)</sup>.

En mejoras del potencial nutricional, de las plantas por ejemplo en el tomate se ha logrado introducir unos genes del maíz que aumentan la biosíntesis del kampherol en más de un 60% principalmente en la pulpa.

La lespidina un bi-rhamnósido del kampherol es un estimulante de la eliminación renal.

#### **2.6. Aislamiento e Identificación de quercetina y kampherol según Ikan.**

Ikan Raphael (1976) en su libro Natural Products Laboratory<sup>(26)</sup> Guide señala que el aislamiento y la identificación de flavonoles agliconas y de flavonoides glucosídicos puede realizarse mediante cromatografía de papel (descendente) usando cromatocabinas; el procedimiento consiste en cortar tiras de papel filtro Whatman N°1 en dimensiones de 50 x 50 cm, estas tiras son spotados con solución alcohólicas de la muestra flavonoidal y secado (secador de cabello), a

8 cm de un extremo de la tira cercana a la parte que será colocada en una artesa que contiene el solvente de resolución.

Los solventes de resolución son los siguientes:

- a) Acetato de etilo saturado con agua
- b) Fenol saturado con agua
- c) 60% de isopropanol y 40% de agua

Las tiras preparadas son colocadas en las artesas y por acción del solvente empieza a desplazarse hacia abajo del origen del spot, se espera que el spot corra 35 cm hacia abajo en ese momento se sacan las tiras y se deja secar luego se reconoce por el color y por el RF x 100 a simple vista luego usando un revelador UV con el que da un color característico, también se reconoce a los flavonoides revelando con  $AlCl_3$  a simple vista y en revelador UV según los índices de RF X 100 ácido acético igual 0.3 quercetina y kampherol 0.4 y del color que toma por visualización normal un color amarillo.

Por revelado UV y usando reactivo cromatográfico ( $AlCl_3$ ) tanto en forma normal como en el equipo UV, se pueden obtener los siguientes resultados: (ver tabla 2).

TABLA 2. Identificación de compuestos flavonoidales.

Tomando de Ikan R: Natural Products. Laboratory Guide.

COMPUESTO	Rf x 100 C/ sistema			Color no tratado con revelador $AlCl_3$			
	ACoE t sat con agua	PhOH sat con agua	60% isopropanol 40% agua	visible	UV	visible	UV

Agliconaflavonoides:	90	74	77	Amarillo	Verde Amarillo	Amarillo	Verde Amarillo
1. kampherol							
2. quercetina	81	42	67	amarillo	amarillo	Verde amarillo	Verde amarillo
Glucósidos flavonoides	50	56	79	Amarillo pálido	marrón	Amarillo	Amarillo

Cortando con tijera cada spot se extrae en alcohol absoluto; se saca y se obtiene kampherol, quercetina y sus glucósidos que se cristalizan utilizando nuevamente etanol.

El producto cristalizado se pasa por espectrofotometría UV-Visible y debe dar los resultados de longitudes de onda máxima siguientes:

-Kampherol en MeOH ( $\lambda$  max nm) 253 sh, 266, 294 sh, 322 sh, 367.

-Quercetina en MeOH ( $\lambda$  maxnm) 255, 269 sh, 301 sh, 370<sup>(26)</sup>.

### 2.7. Métodos de identificación preliminar de los pigmentos carotenoidales y flavonoidales de *Tagetes erecta* (marigold, rosa sisa).

600g de *Tagetes erecta* (marigold, rosa sisa) con 60% de humedad se secan, luego se muele y se pasa por tamiz 80 ASTM.

### 2.7.1 Separación de pigmentos carotenoidales.

Se toma 300g de muestra para trabajar en el aislamiento de carotenoides. Se preparan cartuchos de papel de filtro con 60g de muestra y se ubica en el vaso de Soxhlet para su desengrase con n-Hexano; se hace funcionar el equipo por 75 horas.

El extracto éter de petróleo se destila a 70°C para recuperar el éter de petróleo y el residuo contiene el pigmento carotenoidal.

### 2.7.2 Identificación del carotenoide.

Se procedió a realizar cromatografía de capa fina (TLC) en un cromatofolio 20 x 20cm usando como adsorbente silica gel F<sub>254</sub>.

Se preparó el cromatofolio y se aplicó el residuo n-Hexánico disuelto en cloroformo extendiendo los puntos en una raya a un margen de 2cm del borde inferior, se corrió hasta 16cm cerca al borde superior por 60 minutos. Usando una mezcla de solventes: éter de petróleo (60-80): acetato de plomo: dietilamina (58: 30: 12) y el valor HRF debe ser 42.

$$\text{HRF} = \frac{\text{Distancia de corrido del soluto}}{\text{Distancia de corrido del solvente}} \times 100$$

$$\text{HRF} = \frac{6.72}{16} \times 100$$

$$\text{HRF} = 42$$

Se raspa la placa y se eluye con éter de petróleo, se filtró en embudo de buchner, se concentró y se obtiene luteína.

### **2.7.2. Aislamiento del flavonol e identificación.**

El extracto alcohólico se concentra y se diluye en éter dietílico y se espolea sobre un cromatofolio que contiene sílica gel G, llevando los puntos a formar una raya, se usa como solvente de resolución tolueno: cloroformo: acetona (40: 25: 35) se obtiene un valor  $h_{rf}=27$ ; semejante al que reporta la bibliografía.

$$h_{rf} = \frac{\text{Distancia de corrido del soluto}}{\text{Distancia de corrido del solvente}} \times 100 = \frac{4.32}{16} \times 100$$

$$h_{rf} = 27$$

Se cristaliza en éter dietílico hasta lograr su pureza.

Otra técnica de identificación del flavonol consta en tratar el extracto alcohólico de pétalos de marigold con el reactivo de SHINODA, se adiciona el extracto alcohólico una pequeña tira de magnesio y una gota de ácido clorhídrico concentrado, el color amarillo del extracto hace un viraje a un color rosado con el que se identifica la presencia del flavonol

### **2.8. Aislamiento de Quercetina y Kampherol según X. Domínguez.**

#### **2.8.1. Aislamiento de kampherol y quercetina por extracción con alcohol y separación con bórax ( $B_4O_7Na_2 \cdot 10 H_2O$ ).**

Domínguez X. 1979. En su libro “métodos de investigación Fitoquímica”. Señala que una de las técnicas para el aislamiento de quercetina y kampherol

consiste en extraer la muestra con etanol caliente, el extracto se evapora a presión reducida (rota vapor), el residuo se extrae varias veces con éter de petróleo (desengrase) y después se lava con solución acuosa y etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 7% durante 2 horas, la suspensión enfriada se extrae varias veces con éter dietílico, se juntan los extractos etéricos y se extraen en pera de decantación con solución acuosa de bórax al 10% (tetaborato de sodio), el bórax disuelve la quercetina y se recupera al añadirle ácido clorhídrico diluido.

Al destilar la fase etérea queda el kampherol como residuo, si es que lo hay. Tanto quercetina como kampherol se recristalizan por separado.

La quercetina en alcohol absoluto y el kampherol en éter dietílico.

En alto estado de pureza se realizarán las pruebas físico-químicas y espectrométricas <sup>(27)</sup>.

### **2.8.2. Aislamiento de Quercetina y Kampherol por Cromatografía de capa fina Según Stahl-Egon.**

Stahl-Egon. (1969). En su libro *Thin Layer Chromaography. A Laboratory Handbook*, señala que es posible aislar polifenóles con anillos fusionados usando los adsorbentes y solventes siguientes :(ver Tabla 3).

Tabla 3. Aislamiento por TLC de quercetina y kampherol tomando de Stahl-Egon. Thin Layer Chromaography.

SUSTANCIA	Adsorbentes y Solventes y Valores de Rf x 100			
	I	II	POLIAMIDA	
			III	IV
Quercetina	38	27	8	8
Kampherol	71	39	20	8

Condiciones Experimentales:

(I): El adsorbente es celulosa, los solventes son: cloroformo: Ácido acético: agua (50 + 45 + 5)

(II): El adsorbente es sílica gel, los solventes son: Tolueno: cloroformo: acetona (60 + 20 + 20)

(III): El adsorbente es poliamida los solventes son: Benceno: butanona: metanol (60 + 20 + 20)

(IV): El adsorbente es poliamida los solventes son: Agua: butanona: metanol (40 + 30 + 30)<sup>(28)</sup>.

Mabry T.J. (1970) en su libro TheSystematicIdentificación of flavonoids, cita que Johnston, Sterryways, han descrito un procedimiento para la separación de flavonoides tanto agliconas y glucósidos sobre sephadex LH – 20 usando como

soportes columnas de vidrio y usando metanol como solvente de resolución, previamente se disuelve la muestra de flavonoides en una mezcla de dioxano – MeOH (1:1) para ilustrar la efectividad del procedimiento.

Se realizó la separación de una mezcla de 166 mg de rutina de ruda y 75 mg de quercetina de cebolla.

Estos flavonoides fueron disueltos en 22 ml de MeOH y se pasó a una columna (2.5 x 33 cm) se prepara 40 gramos de Sephadex LH-20 (previamente hinchado en metanol).

Con metanol como eluyente y con un flujo de velocidad de caída del eluyente de 4ml/ min se recupera la rutina en la fracción 190 – 250 ml y la Quercetina en la fracción 390 – 460 ml.

El autor sugiere que el grado de adsorción de las agliconas flavonoides sobre sephadex depende generalmente del número de grupos hidroxilos, pero no de su acidez, mientras que los glucósidos flavonoidales con más peso molecular por lo largo de sus cadenas, tanto los tamices de gel así como la adsorción son aspectos de importancia. El sephadex puede ser eficiente y de alta capacidad en el medio <sup>(29)</sup>.

## **2.9. Propiedades fisicoquímicas de los flavonoles: quercetina y el kampherol**

El flavonol presente en *Tagetes erecta* es la quercetina pero en ciertas ocasiones ambas están juntas y es necesario conocer sus propiedades para una mejor distinción y caracterización.



### Propiedades fisicoquímicas de la quercetina:

- a) Los cristales son de color amarillo.
- b) El punto de fusión es de 316 – 317 °C.
- c) Solubilidad: soluble en MeOH, etanol.
- d) En el espectro UV visible la quercetina en MeOH muestra una banda (banda I) a 370 nm al producirse un incremento en los patrones de oxidación de los anillos A y C y B de los grupos OH en posición 3,5,7, 3', 4'

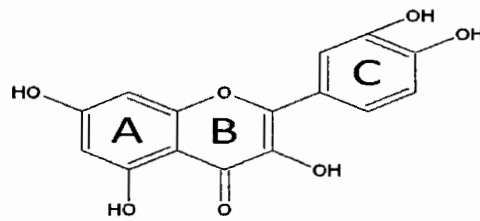
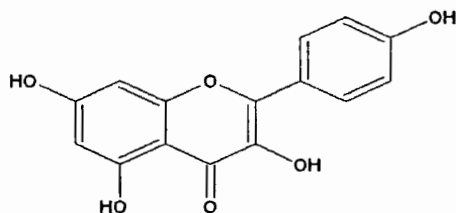


FIG 11. Quercetina

### Propiedades fisicoquímicas del kampherol.

- a) Los cristales son agujas de color amarillo
- b) Punto de fusión 276-278° C
- c) Soluble: MEOH, EtOH,
- d) El espectro UV-visible del Kampherol muestra una banda (Band I) a 367 nm al producirse un incremento en los patrones de oxidación de los anillos A y C y B de los grupos OH en las posiciones,3,5,7 y 4'



3, 5, 7,4'tetra oxhidril flavona

FIG 12. Kampherol

## 2.10. Definiciones operacionales.

### 2.10.1 Identificación

“Aislamiento y caracterización de los pigmentos Flavonoidales y Carotenoidales de las inflorescencias de *Tagetes erecta* (Marigold, rosa sisa)”. Se trata de separar de las inflorescencias de *Tagetes erecta* 2 tipos de colorantes naturales; uno de naturaleza flavonoidal(quercetina) y la otra de naturaleza carotenoidal(luteína) mediante extracción con solventes apolares(éter de petróleo, n-Hexano) y polar(alcohol etílico), seguido de purificación e identificación del grado de pureza por cromatografía de capa fina(TLC) y usando sus propiedades físicas y espectrométricas: UV-visible, RMN de protones y de C-13 asignarle la estructura química que les corresponda (elucidación).

## 2.10.2 Variables operacionales

### 2.10.2.1 Variable independiente

Aislamiento del pigmento carotenoidal y del pigmento flavonoidal de las inflorescencias de *Tagetes erecta* (marigold, rosa sisa).

### 2.10.2.2 Variables dependientes

Caracterización de los colorantes aisladas utilizando sus propiedades físicas (espectrometría de uv-visible y RMN).

## 2.10.3. Operacionalización de variables

### 2.10.3.1. Variable independiente

Variable independiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Índice
Aislamiento del pigmento carotenoidal y del pigmento flavonoidal de las inflorescencias de <i>Tagetes erecta</i> (marigold, rosa sisa)	Se trata de separar de las inflorescencias de <i>Tagetes erecta</i> 2 tipos de colorantes naturales – uno de naturaleza carotenoidal liposoluble (luteína) y otro de naturaleza flavonoidal	Se secan y muelen las inflorescencias luego se tamizan en malla 80 ASTM hasta obtener granulometría fina.  Se separan por desengrase los carotenoides,	Componentes flavonoidales: quercetina.  Componentes Carotenoidales: luteína	Polaridad de los solventes.

	<p>(flavonol) de propiedades hidrosolubles para lo cual se requiere utilizar 2 tipos de solventes uno de baja polaridad n-hexano o éter de petróleo para arrastrar el pigmento carotenoidal y el otro de alta polaridad como el alcohol o mezcla alcohol agua 80: 20 para arrastrar el componente flavonoidal.</p>	<p>el extracto alcohólico sirve para aislar el flavonol por partición de fases.</p>		
--	--	---	--	--

### 2.10.3.2. Variable dependiente

Variable dependiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	índice
Determinación de la estructura química de los colorantes: carotenoidales y flavonoidales mediante espectrometría de uv-visible y RMN.	<p>Después de purificar tanto el colorante carotenoidal como el colorante flavonoidal, se procede a la determinación de su estructura química.</p> <p>Para el colorante carotenoidal se requiere pasar por un aparato pelkin elmer de espectrometría uv-visible y comparar sus valores de longitudes de onda máxima <math>\lambda_{\text{máx}}</math> con los valores de la literatura. El compuesto flavonoidal aislado y purificado se</p>	<p>Longitud de onda.</p> <p>Bandas de desplazamiento</p> <p>Señales, multiplicidad y constantes de desplazamiento</p> <p>El pigmento flavonoidal pasara por un aparato UV-Visible y luego por un espectrómetro BRUKER AC-300</p>	<p>El pigmento carotenoidal pasa ser corrido en aparato uv-visible.</p> <p>El pigmento flavonoidal pasa ser corrido en un Bruker AC-300.</p>	<p>Para el compuesto carotenoidal valores de <math>\lambda_{\text{máx}}</math> en nm.</p> <p>Para el compuesto flavonoidal valores de desplazamiento en ppm.</p> <p>Señales de multiplicidad y constantes de acoplamiento.</p>

	pasará con espectro de RMN de protones y de carbono-13 en el laboratorio de la PUCP.			
--	--	--	--	--

## CAPITULO III

### 3.1 Método y diseño de la investigación.

#### 3.1.1 Método de estudio.

El presente estudio está referido al aislamiento y caracterización de los pigmentos Flavonoidales y Carotenoidales de las inflorescencias de *Tagetes erecta* (Hbk) (Marigold, rosa sisa).

#### 3.1.2 Diseño de investigación.

**Experimental** porque toma en cuenta todo el proceso que permite aislar forma selectiva cada familia de pigmentos en función de su polaridad el estudio se realizará con las inflorescencias de *Tagetes erecta* (marigold, rosa sisa) donde se halla presente dos familias de pigmentos:

- A) Flavonoidal: (flavona) quercetina, que se aísla con solventes polares.
- B) Carotenoides: luteína que se aísla con solventes de baja polaridad.

**Descriptivo**, porque se describe la secuencia lógica que se sigue hasta separar alta pureza, con los cuales se procederá a caracterizar los pigmentos aislados por espectrometría de UV-Visible, y RMN de  $H^+$  y de  $C-13$ .

### 3.2 Población y muestra.

#### 3.2.1 Población vegetal

Estuvo constituido por un sembrío de 1 Ha de *Tagetes erecta* en plena floración en el Km 56 de la carretera Iquitos-Nauta de propiedad del Sr. Domingo Ríos

Valderrama que lo usa con carácter experimental para alimentar a sus gallinas de postura con el propósito de obtener huevos con yemas anaranjadas.

### **3.2.2 Muestra vegetal.**

Se recolectó 2 Kg de inflorescencias de cabezuelas para desarrollar la parte experimental del estudio.

Se tomó de un tronco una rama conteniendo hojas, flores para la identificación botánica.

### **3.2.3 Criterios de inclusión y exclusión.**

#### **3.2.3.1 Criterios de inclusión.**

- Flores desarrolladas con pétalos de color amarillo-naranja, indesmayable.
- Flores recogidas a las 6 pm antes de la salida del sol.

#### **3.2.3.2 Criterios de exclusión**

- Flores con pétalos deteriorados.
- Se evitó mezclar con otras variedades.

### **3.3 Diseño experimental.**

#### **3.3.1 Recolección de muestra.**

Se recogió 2 Kg de inflorescencias frescas.

Una rama con hojas y flores fueron llevadas al Herbarium Amazonense de la UNAP, para su correspondiente clasificación botánica.



### **3.3.2 Secado.**

Se secó la muestra hasta obtener 800g, esto nos indica que tenía 60% de humedad.

### **3.3.3 Molienda y pulverizado**

Se llevó a cabo con molino de disco.

### **3.3.4 Tamizado.**

El pulverizado se pasó por un tamiz malla 80ASTM.

### **3.3.5 Desengrasado de la muestra.**

600g de polvo se desengrasó en equipo Soxhlet con éter de petróleo. Luego se destiló para juntar el éter de petróleo y se obtuvo 5g de una sustancia líquida aceitosa, amarilla viscosa que contiene luteína (0.83% de la muestra).

### **3.3.6 Aislamiento de luteína.**

Se tomó un cromatofolio de sílica gel F<sub>254</sub>, se esplotó en raya la sustancia aceitosa disuelta en éter de petróleo, luego se usó como solventes de resolución una mezcla de éter de petróleo (60-80°C)-acetato de etilo-dietil amina (58: 30: 12).

Se observó una raya leve que probablemente corresponda a violaxantina.

Se raspó la banda y se eluyó con éter de petróleo, dio una sustancia amarilla a la cual se le pasó por espectrometría de UV-Visible en el equipo SHUMDALZU 160 A.

### **3.3.7 Extracción con alcohol etílico.**

590g del polvo desengrasado se extrae con 2.5L de alcohol etílico absoluto en caliente, se filtró y se obtuvo una solución amarillo naranja; se concentró a presión reducida a 1/5 de un volumen (1/2L).

### **3.3.8 Desengrasado de la solución etanólica.**

Se desengrasó con éter de petróleo por partición de fases en pera de decantación para eliminar los remanentes de grasas. Se separa la fase alcohólica, se calienta para eliminar trazos de éter de petróleo.

### **3.3.9 Tratamiento de la fase etanólica.**

La fase alcohólica se concentra a sequedad en baño de arena, luego se hierve con una solución de  $H_2SO_4$  al 7% durante 2 horas; la suspensión enfriada se extrae varias veces con éter dietílico.

### **3.3.10. Aislamiento de la quercetina.**

Se juntan los extractos etéreos y se extrae con una solución de bórax al 10% para formar el quelato quercetinato tetraborato.

Se separa la fase acuosa y se hace reaccionar con ácido clorhídrico y se recupera la quercetina que se diluye en acetona y se agrega norita (carbón activado), se filtra y precipita unos cristales amarillo-naranja. Se pesa en balanza analítica OHAUS.

### **3.3.11 Cristalización de quercetina para TLC.**

La quercetina aislada en 3.3.10. Se disolvió la acetona y se espoteo en raya sobre un cromatofolio de sílica gel F<sub>254</sub>, se resolvió en cámara cromatográfica con una mezcla tolueno, cloroformo, acetona (40: 25: 35 v/v/v), se raspo la franja y se eluyó con acetona, se filtró, el filtrado precipito unos cristales amarillos.

## **3.4 Pruebas físico-químicas de los pigmentos: luteína y quercetina.**

### **3.4.1 TLC de luteína.**

Se disolvió la muestra aceitosa en cloroformo y se spoteo en raya sobre una placa de vidrio preparado en sílica gel-hidróxido de calcio (1: 6), se corrió usando como solvente cloroformo-acetato de etilo (80: 20v/v).

Se raspó la banda y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cuando se revela en UV aparece una banda amarilla característica de luteína <sup>(13)</sup>.

## **3.5 Espectrometría UV-visible de luteína y quercetina.**

### **3.5.1 Espectrometría UV-visible de la luteína.**

Se diluyó 10µl de luteína en etanol y se pasó por un espectrómetro UV-visible SHIMADZU 160 A.

### **3.5.2 Pruebas físico-químicas del pigmento flavonoidal.**

#### **3.5.2.1 Cromatografía de capa fina (TLC) de quercetina.**

Se realizó en cromatofolio de sílica gel F<sub>254</sub> de 10 x 5cm, se spoteo en raya a 2cm del borde inferior y se corrió en una mezcla de solventes; tolueno, cloroformo, acetona (40: 25: 35v/v/v).

#### **3.5.2.2 Determinación del punto de fusión.**

Se determinó en el aparato de Fisher Johns (fijatom), un pequeño cristal de quercetina se introdujo en la platina del aparato y se observó por el ocular el momento en que empezó su fusión; se observó en el termómetro que lleva adjunto.

#### **3.5.2.3 Determinación del peso molecular de la quercetina.**

##### **Método de Rast.**

Se utilizó el método de Rast al no contar con un espectrómetro de masas para identificar el pico molecular de los compuestos a elucidar. Este método consiste en medir la depresión del punto de fusión D-L-Canfor natural.

##### **Procedimiento**

Se preparó un tubo de vidrio de las dimensiones siguientes: 8 x 50 mm. Cerrado en una de sus extremos, se limpió a chorro con agua destilada y se dejó secar, se

pesó (3550g). Se colocó en el tubo 50mg (peso exacto del flavonoide) que supuestamente es quercetina.

Se añadió 500mg de D-L-Canfor natural y se pesó el tubo nuevamente.

El contenido del tubo se fundió hasta obtener un líquido transparente utilizando una llama suave del mechero de Bunsen pero tomando la precaución de calentar demasiado tiempo.

Después que se enfrió a temperatura ambiente se secó y se colocó en una luna de reloj limpia, el material se pulverizo en un mortero limpio, se llenó en tubo capilar y se midió el punto de fusión en el aparato thiele.

#### **Calculo del peso molecular**

Peso del compuesto	50mg
Peso del D-L-Canfor Natural	500mg
Punto de fusión del D-L-Canfor	177°C
Punto de fusión de la disolución	163.85°C
Depresión en el punto de fusión $\Delta T$	13.15
Constante de depresión molar de D-L-Canfor (K)	39.7

Aplicando:

$$M = \frac{K \times P \times 1000}{T \times p'}$$

### **3.5.3 Espectrometría UV-visible de quercetina.**

Se tomó 50mg de quercetina y se disolvió en metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) se pasó por un espectrómetro SHIMADZU 160 A, el espectrograma registro 4 picos correspondientes a las longitudes de onda máxima.

Si a la disolución en metanol se le agrega metanoato de sodio se observa 2 picos. El espectro de un flavonol cambia después de varios minutos ya que se descompone en presencia de un grupo sensitivo a los ácidos.

### **3.6 Pruebas de Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.**

#### **3.6.1 Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear de protones.**

La quercetina purificada fue enviada al laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú; se preparó una muestra de 5mg que se disolvió en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y en el equipo Bruker AC 300 de 300,13 MHz, se realizó un total de 16 adquisiciones utilizando un pulso de 2.7 micro segundos y un ajuste de ancho espectral  $\text{sw} = 6024, 10\text{Hz}$  de 20,00 ppm.

#### **3.6.2 Pruebas de Resonancia Magnética Nuclear de C-13.**

Se realizó en el equipo Bruker AC 75,47MHz, en una solución de 20mg de muestra disuelta en 1ml de DMSO (Dimetil Sulfoxido), con 20,600 adquisiciones utilizando un pulso de 8,6 micro segundos y un ancho espectral de 245,38ppm ( $\text{SW} = 18518,52\text{Hz}$ ).

### **3.7 Instrumentos, materiales y reactivos.**

#### **3.7.1 Instrumentos.**

- Equipo de Soxhlet, Hot plate regulable de 0 a 35°C con agitador, Rota vapor Buchi R 3000, Balanza analítica, Lámpara reveladora UV-visible, Estufa, Aparato Fischer Johns para punto de fusión (FIJATOM), Espectrómetro UV, Espectrómetro de RMN de protones y de  $^{13}\text{C}$  Bruker AC 300.

#### **3.7.2 Materiales.**

Vasos de precipitado de 500 ml, peras de decantación de un litro de capacidad, embudos, cristalizadores, matraces, probetas, baguetas, balón, cámara cromatográfica para TLC, desecador al vacío, tamices, malla 80 ASTM, soporte universal, anillos, pinzas, tijeras, embudo de buchner, mortero, pilón, mandiles, mascarillas, lentes protectores, guantes quirúrgicos n° 7.

#### **3.7.2 Reactivos.**

- Alcohol etílico, Éter de petróleo, N-butanol, Cloroformo, Acetona, Tolueno, Metanol, Bórax, Difenilamina, Éter dietílico, DMSO, Ácido sulfúrico, Agua destilada, Cromatofolio de sílica gel, Carbón activado, Metanoato de sodio.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Pigmento Carotenoidal: luteína.

-El valor del Rf x 100 en Cromatografía de capa fina (TLC) experimental = 35

-El valor de la Espectrometría de UV-visible experimental = 420, 8, 445, 472.5nm.

-Rendimiento de luteína.

$\% = \frac{\text{Peso de la luteína aislada}}{\text{Peso de las flores secas}} \times 100$

$\% = \frac{5}{600} \times 100$

$\% = 0, 83$

#### 4.2 Pigmento flavonoidal: Quercetina.

-El valor del Rf x 100 en cromatografía de capa fina (TLC) experimental = 26,85

-El valor experimental del punto de fusión es = 316-317.5°C.

-El valor del Peso molecular por el método de Rast experimental = 301,90.



$$M = \frac{K \times P \times 1000}{T \times P} = \frac{39.7 \times 0.05 \times 1000}{13.15 \times 0.5} = \frac{1.985}{6.575}$$

M= 301.90

-Los valores  $\lambda$  máx. del espectro UV-visible experimental = 254, 269 sh, 301 sh, 371.

-Los valores de las señales experimentales de la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de protones de Quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ), son:

Molécula	Señales experimentales ver espectro de RMN $H^+$ .	Interacciones.
Quercetina $C_{15}H_{10}O_7$	$\delta$ . 6.220 ppm doblete H-6.	Resuenan con los OH, 5 y 7.
	$\delta$ . 6.472 ppm doblete H-8.	
	$\delta$ . 6.861 ppm doblete H-5.	Resuena con el OH de 4'.
	$\delta$ . 7.611 ppm singlete H-2'.	
	$\delta$ . 7.750 ppm doblete H-6'.	Resuena con el protón H-5'.

-Los valores de las señales experimentales de la Espectrometría de RMN de C-13, fueron:

Molécula.	Número de carbonos	Señales experimentales del espectro RMN <sup>13</sup> C (ppm)
Quercetina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> .	C-4	δ. 157, 70 ppm
	C-7	δ. 163, 90 ppm
	C-5	δ. 160, 70 ppm
	C-9	δ. 156, 20 ppm
	C-4	δ. 147, 60 ppm
	C-2	δ. 146, 50 ppm
	C-3	δ. 145, 00 ppm
	C-3	δ. 135, 60 ppm
	C-1	δ.122, 00 ppm
	C-6	δ.120, 00 ppm
	C-5	δ.115, 60 ppm
	C-2	δ.115, 30 ppm
	C-10	δ.103, 00 ppm
	C-6	δ.98, 20 ppm
	C-8	δ.93, 40 ppm

Rendimiento de Quercetina

$\% = \frac{\text{Rendimiento de quercetina}}{\text{Peso de las flores secas}} \times 100$

$$\% = \frac{3,00}{600} \times 100$$

$$\% = 0,50$$

## 5. DISCUSIONES.

-Estudiando los pigmentos naturales de *Tagetes erecta* se separó dos clases de pigmentos que corresponden a dos clases de familias químicamente diferentes por su composición, un pigmento carotenoidal liposoluble que se separó por desengrase con éter de petróleo de los pétalos secos de *Tagetes erecta*, después se eliminó el solvente y se identificó por cromatografía analítica (TLC), los valores de  $R_f \times 100$  fue de 35.00, usando un sistema de elusión diclorometano: acetato de etilo (80:20v/v) y como adsorbente (sílica gel F<sub>254</sub>), se comparó con el  $R_f \times 100$  de la literatura<sup>(28)</sup> encontrándose que los valores fueron idénticos.

-Al realizar las pruebas de Espectrometría de UV-visible (EtOH), se obtuvieron los valores lambda max (nm) siguientes: 420, 8 – 445 y 472, 5nm. Se comparó con los valores de la literatura: 421 – 445 y 473<sup>(15)</sup> y se encontró que estos fueron similares.

Molécula	UV-Visible experimental corrido en etanol.	UV-Visible corrido en etanol <sup>(15)</sup>
Luteína	420,8 – 445 y 472,5nm	4210, 445, 473nm

-El pigmento flavonoidal hidrosoluble fue aislado en un solvente de alta polaridad como el alcohol y acomplexado con bórax siguiendo el método de Domínguez<sup>(27)</sup>.

-Al identificar por cromatografía analítica (TLC), los valores de  $R_f \times 100$  fue de 26, 85 usando los solventes tolueno: cloroformo: acetona (40: 25: 35) y como adsorbente (sílica gel F<sub>254</sub>), se comparó con  $R_f \times 100$  y es idéntica al de la literatura<sup>(28)</sup>.

Molécula	TLC experimental en silica gel F <sub>254</sub> . Rf x 100. Solventes tolueno: cloroformo: acetona (40: 25: 35v/v/v).	TLC de la literatura <sup>(28)</sup> en silica gel F <sub>254</sub> . Rf x100. Solventes tolueno: cloroformo: acetona (40: 25: 35v/v/v).
Quercetina	26.85	27

-Las pruebas de determinación de punto de fusión fue de 316-317.5°C que comparado con el valor de la literatura <sup>(5)</sup>, resultaron idénticos para un flavonol que es la quercetina.

Molécula	P.f experimental	P.f literatura <sup>(5)</sup> .
Quercetina	316-317.5°C	316-317°C

-La determinación del peso molecular por el método de Rast se basó en la depresión del punto de fusión del D-L-Canfor que fue de 301.90.

$$\%ERROR = \left( \frac{302.24 - 301.90}{302.24} \right) \times 100 = \frac{0.34 \times 100}{302.24} = \frac{34}{302.24}$$

$$\%ERROR = 0.112$$

El valor experimental es muy cercano a la de la literatura, con un porcentaje de error de 0,112%.

Molécula	Peso molecular experimental	Peso molecular literatura
Quercetina	301.90	302.24

-La espectrometría de UV-Visible de los cristales amarillos diluidos en metanol y corridos en un espectrómetro SHIMADZU 120A dio los siguientes valores de lambdas: 254, 269sh, 301sh, 371 estos valores experimentales coinciden plenamente con el valor de la literatura<sup>(29)</sup>.

Molécula	$\lambda$ max nm en etanol experimental	$\lambda$ max nm en etanol literatura
Quercetina	254, 269sh, 301sh, 371	255, 269sh, 301sh, 370

-La muestra corrida en un aparato de espectrometría de RMN <sup>1</sup>H Bruker 300 AC señaló las siguientes señales moleculares.

Molécula	Señales experimentales ver espectro de RMN <sup>1</sup> H.	Interacciones.
Quercetina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	$\delta$ . 6.220 ppm doblete H-6.	Resuenan con los OH, 5 y 7.
	$\delta$ . 6.472 ppm doblete H-8.	
	$\delta$ . 6.861 ppm doblete H-5.	Resuena con el OH de 4'.
	$\delta$ . 7.611 ppm singlete H-2'.	
	$\delta$ . 7.750 ppm doblete H-6'.	Resuena con el protón H-5'.

-La señal que está dado por el protón H-6 y H-8 está cercano a los protones apantallados por el átomo del oxígeno que se hallan en las posiciones 5 y 7.

-La RMN de  $^{13}\text{C}$  como se podrá observar fue realizado en un aparato Bruker 75,47 MHz, se observan quince señales que corresponden a quince átomos de carbono no equivalentes a los de la molécula de quercetina. El desplazamiento más bajo corresponden al grupo carbonilo en posición C-4 que corresponde a un híbrido  $\text{sp}^2$ .

<b>Molécula.</b>	<b>Número de carbonos</b>	<b>Señales experimentales del espectro RMN <math>^{13}\text{C}</math> en ppm</b>
Quercetina $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ .	C-4	$\delta$ . 157.70 ppm
	C-7	$\delta$ . 163.90 ppm
	C-5	$\delta$ . 160.70 ppm
	C-9	$\delta$ . 156.20 ppm
	C-4	$\delta$ . 147.60 ppm
	C-2	$\delta$ . 146.50 ppm
	C-3	$\delta$ . 145.00 ppm
	C-3	$\delta$ . 135.60 ppm
	C-1	$\delta$ .122.00 ppm
	C-6	$\delta$ .120.00 ppm
	C-5	$\delta$ .115.60 ppm
	C-2	$\delta$ .115.30 ppm
	C-10	$\delta$ .103.00 ppm
	C-6	$\delta$ .98.20 ppm
	C-8	$\delta$ .93.40 ppm

El rendimiento de luteína 5,76g (0,96) es un valor de cierta consideración tratándose de un pigmento carotenoidal, que las industrias alimentarias no solo lo usan para la tinción de huevos, sino también para la tinción de quesos, yogures, carnes, leches y tiene un valor inestimable frente a la bixina, norbixina y otros colorantes de baja calidad.

## 5.1 CONCLUSIONES.

-Al preparar los extractos etereos para el aislamiento de los colorantes carotenoidales y el extracto alcohólico para el aislamiento de los colorantes flavonoidales, se pudo aislar y purificar los colorantes carotenoidales y flavonoidales.

-Del compuesto carotenoidal aislado y purificado de las inflorescencias de la especie botanica *Tagetes erecta* por UV-Visible se determino por comparacion de los espectros la estructura del colorante luteina.

- Del compuesto carotenoidal aislado y purificado de las inflorescencias de la especie botanica *Tagetes erecta* se determino la estructura del colorante flavonoidal por Resonancia Magnetica Nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que fue identificado como: quercetina (3, 5, 7,3',4' Pentahidroxi flavona).



## **5.2 RECOMENDACIONES.**

Se debe incrementar los sembríos de *Tagetes erecta* en la región Amazónica para utilizarlo como complemento de alimentación de ave de corral. Ya que una mejor alimentación avícola con lleva a una mejor alimentación humana.

Para cubrir la demanda insatisfecha de los mercados internacionales. Su alta producción permitiría cubrir la alta demanda de países demandantes (Japón, México y E.E.U.U).

Para introducir un nuevo tipo de agricultura en la Región. Un cultivo que hasta hoy tiene un carácter marginal porque se lo utiliza en la medicina natural como planta ornamental y en arreglos florales.

### 5.3 BIBLIOGRAFIA

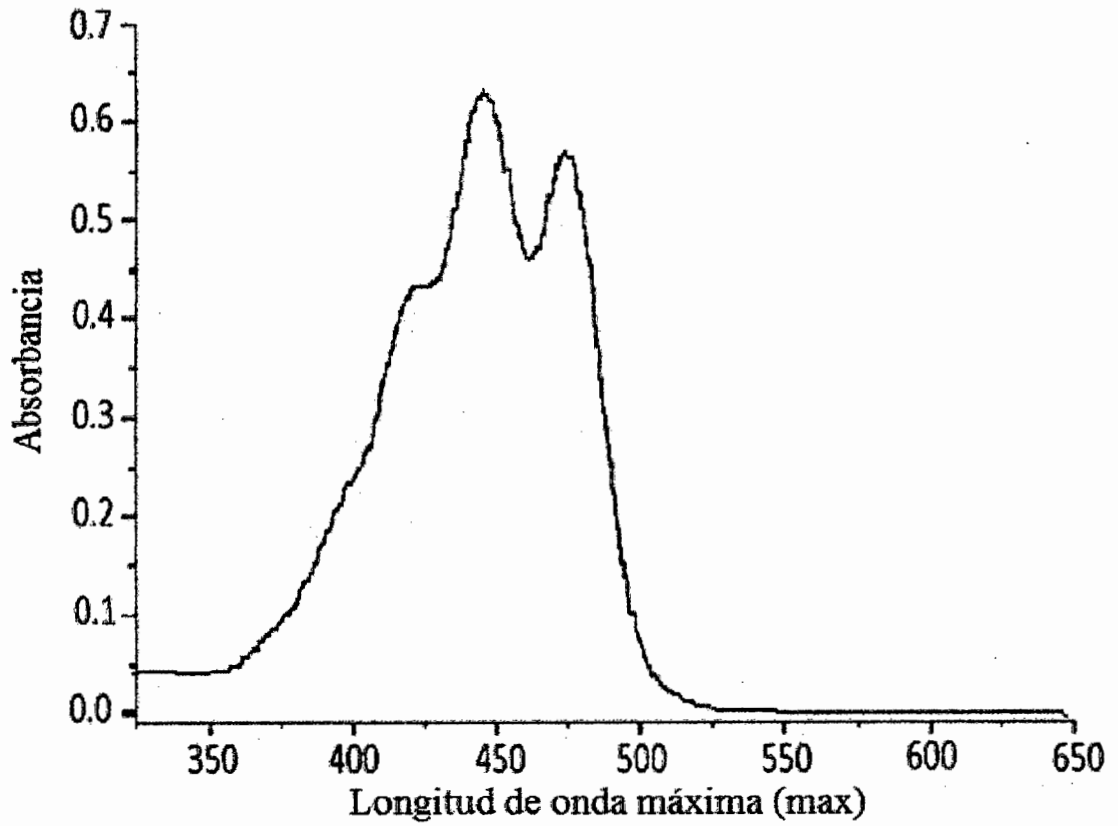
- 1) Leslie Hart F. 1971. Análisis moderno de los alimentos. Ed. Acribia. España.
- 2) Fritz Mayers. 1950. La química de las materias colorantes naturales. Ed. Aguilar. S.A. de ediciones Madrid, España.
- 3) Vega M. y Cárdenas Jacobo 1983. La bioconversión de la energía. Ed. Pirámide. España.
- 4) Willard Habort H. Merritt Lynne L, Dean John A.1976. Métodos instrumentales de análisis. Ed. Cecs. México.
- 5) Goodwin and Mercer. 1983. Introduction to Plant Biochemistry. Ed. Pergamon Press. Ltd. U.K.
- 6) Harborne J.B. and Mabry T.S. 1988. The Flavonoids advances in research. Ed. Chapman and Hall. UK and New York. Inglaterra –USA.
- 7) Garzen Gloria A. 2008. Acta biológica colombiana Vol. 13, N° 3. COLOMBIA.
- 8) Leigh Haddenw, Watkins Ruth, Levy Luis W, Regalado E, Rivadeneira D, Van Brecman B, Schwartz Steven J. 1999. Carotenoid composition of Marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement.
- 9) Cantrill R. 2004. Chemical and Technical Assessment. Pag. 1-5. USA.
- 10) [http: Herbolaria. Wikia.com/viko/Quercetina.](http://Herbolaria.Wikia.com/viko/Quercetina)
- 11) [http: //www.conabio.gob.mx/asteraceae/Tagetes erecta/fichas.hm.](http://www.conabio.gob.mx/asteraceae/Tagetes erecta/fichas.hm)
- 12) Alvares E. 2003. Bioquímica Actividad Biológica de los Flavonoides (I).
- 13) Acción frente al cáncer. Vol.22 N° 10.
- 14) Martínez A. 2005. Flavonoides.
- 15) Wisegeek. 2010.com/what is / Kampherol.htm.

- 16) Marco. J.A. 2006. Química de los Productos Naturales. Ed. Síntesis. España.
- 17) Bu'Lock John D. 1969. Biosíntesis de Productos Naturales. Ed. URMO. España.
- 18) Olabiyi, T. I. and E. E. A. Oyedunmade. (2007). Marigold (*Tagetes erecta L.*) as interplant with cowpea for the control of nematode pests. African Crop Science Conference Proceedings Vol 8. 1075-78.
- 19) Judd Campbell, Kellogg, Stevens, Donoghne. 2002. Plant Systematics. A phylogenetic Approach, Ed. Sinauer Associates Inc. Publics. USA.
- 20) <http://jardindelasalud.blogspot.com/2008/10/flor-de-muerto-cempasuchil.html>.
- 21) Morales AI. Vicente Sánchez Santiago Sandoval C, Fernández José María. López JM. Pérez Barrio Conel F. (2004). Efectos de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio, Revista de Toxicología, Asociación Española de Toxicología – España.
- 22) Álvarez E. Ambitofarmacéutico – Bioquímica. Vol. 22 N° 10 Actividad biológica de los flavonoides (I) acción frente al cáncer. Universidad de Santiago. CHILE.
- 23) Benavente García O. (2008) en Journal of Agriculture and Food Chemistry.
- 24) Pérez G. 2003. Revista Cubana de Investigación Biomédica.
- 25) <http://es.wikipedia.org/wiki/flavonoide>.
- 26) Ikan Raphael 1976. Natural's products a laboratory guide. Ed. Academia Press, ine, Londres LTD. UK.

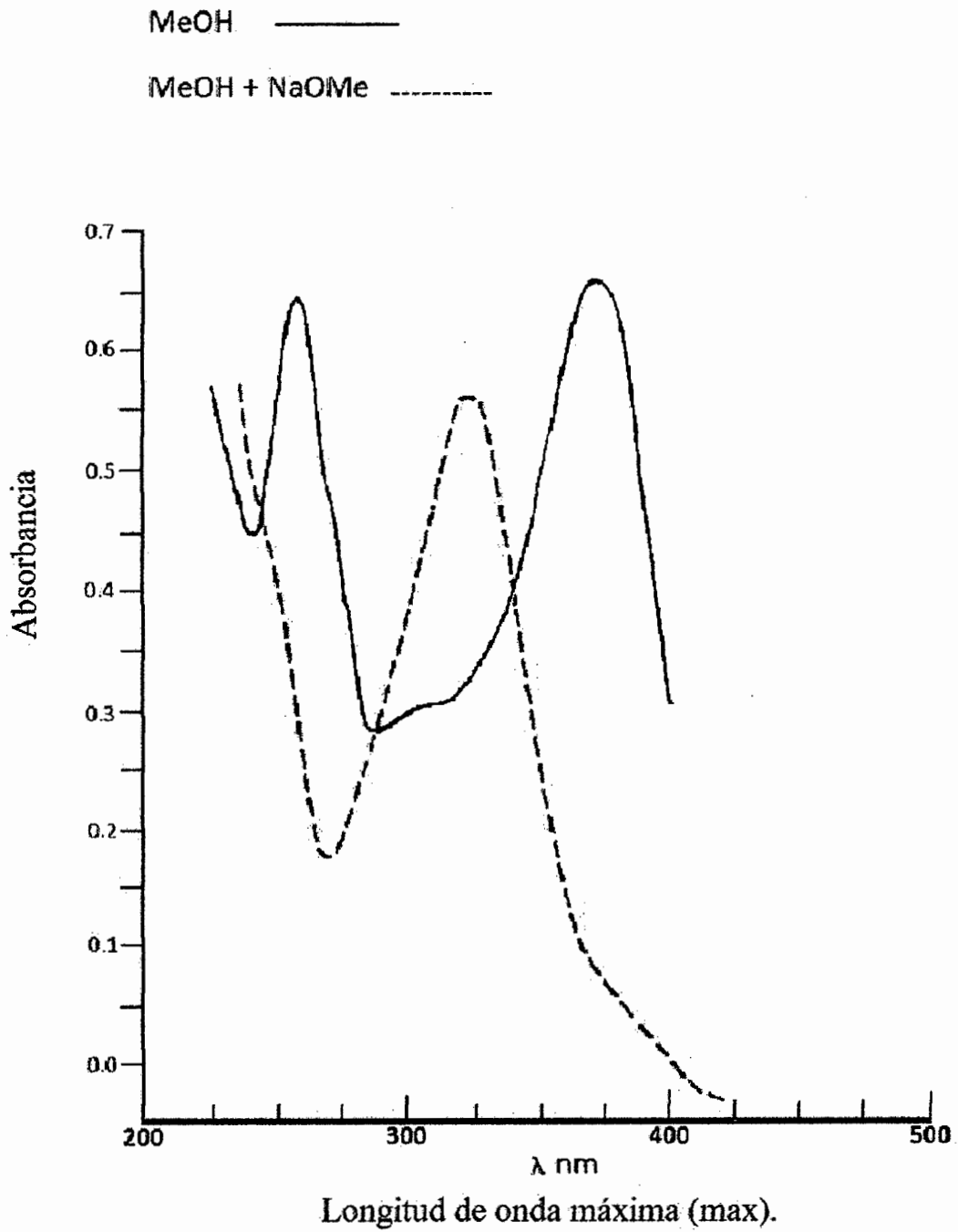
- 27) Domínguez X. 1975. Métodos de investigación Fitoquímica E.d. LIMUSA S.A. México.
- 28) Stahl Egon 1969. Thin layer chromatography. A laboratory Guide. Ed. Springer -verlog. Berlin, Heideiberg, New York.
- 29) Mabry T.J. Markham K.R. and Thomas M.B. 1970. Systematic Identification of flavonoids. Ed Springer- verlog, NEW YORK, Heidelberg berlin, Germany.
- 30) Antonio J. Meléndez-Martínez, Isabel M. Vicario, Francisco J. Heredia Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla, España.
- 31) USDA.ARS.<http://www.ars.usda.gov/sp2userfiles/place/12354500/data/orac/orac07.pdf>.
- 32) Bill Gottlub. 2003. Curas alternativas. Editorial Proule. U.S.A.
- 33) Mercadente AZ. Em. 2008. Colorantes Alimentarios, propiedades químicas y funcionales. Ed. CRC-Press New York. USA.
- 34) <http://www.buenastareas.com/ensayos/Cuantificación-De-Quercetina-Presente-En-Tagetes/338849.hotmail> 2010.

## 5.4 Anexos.

### Anexo 01. Espectro de UV-Visible de Luteína.



**Anexo 02. Espectro de UV-visible de quercetina.**

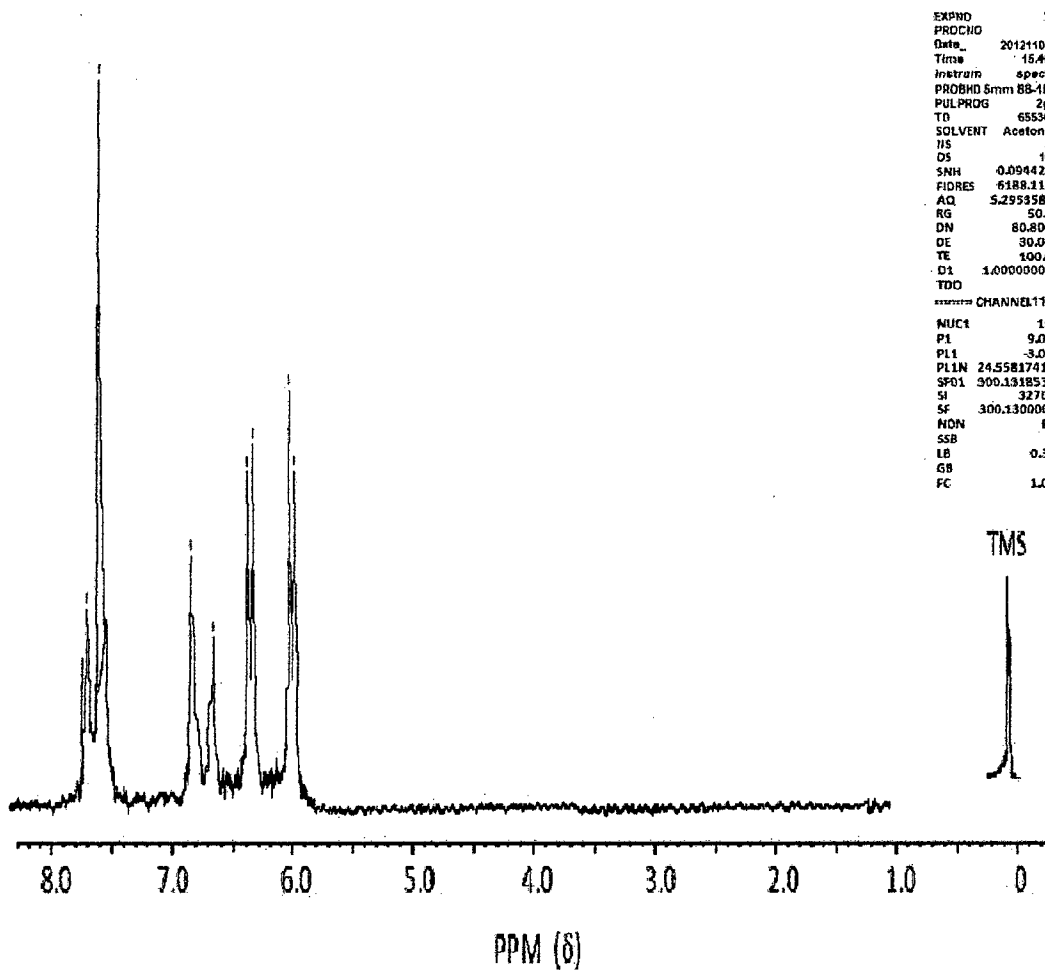


### Anexo 03. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de quercetina en CCL<sub>4</sub>.

<sup>1</sup>H Quercetin en CCL<sub>4</sub>  
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
 Bach. John Ayala



7.699  
 7.603  
 6.887  
 6.503  
 6.430  
 6.320



Laboratorio de RMN  
 Sección Química

```

EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20121101
Time 15.46
Instrum spect
PROBHD 5mm BB-1H
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 2
DS 16
SNH 0.094423 Hz
FIDRES 6188.119 Hz
AQ 5.2953587 sec
RG 50.8
DN 80.800 usec
DE 30.00 usec
TE 100.0 K
D1 1.00000000 sec
TDD 1
===== CHANNEL1 =====
NUC1 1H
P1 9.00 usec
PL1 -3.00 dB
PL1N 24.55817419 N
SFO1 300.1318534 MHz
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
NON EN
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
FC 1.00
    
```

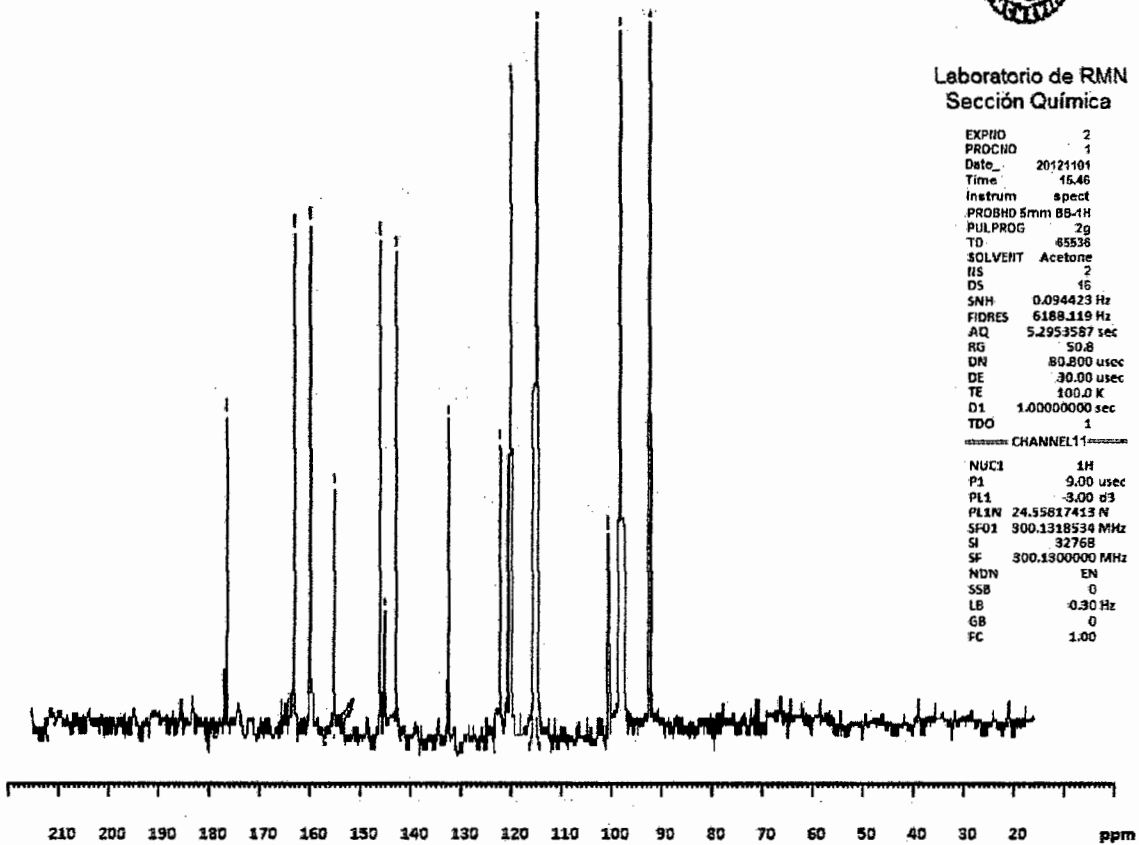
TMS

# ANEXO04. Espectrode RMN de <sup>13</sup>C de quercetina en DMSO.

13C Quercetin en DMSO-d6  
 Universidad Nacional de la Amazonía Peruana  
 Bach. John Ayala



175.7  
 168.9  
 160.7  
 156.2  
 147.8  
 146.9  
 135.0  
 135.6  
 120.0  
 118.0  
 115.6  
 115.3  
 99.0  
 98.4

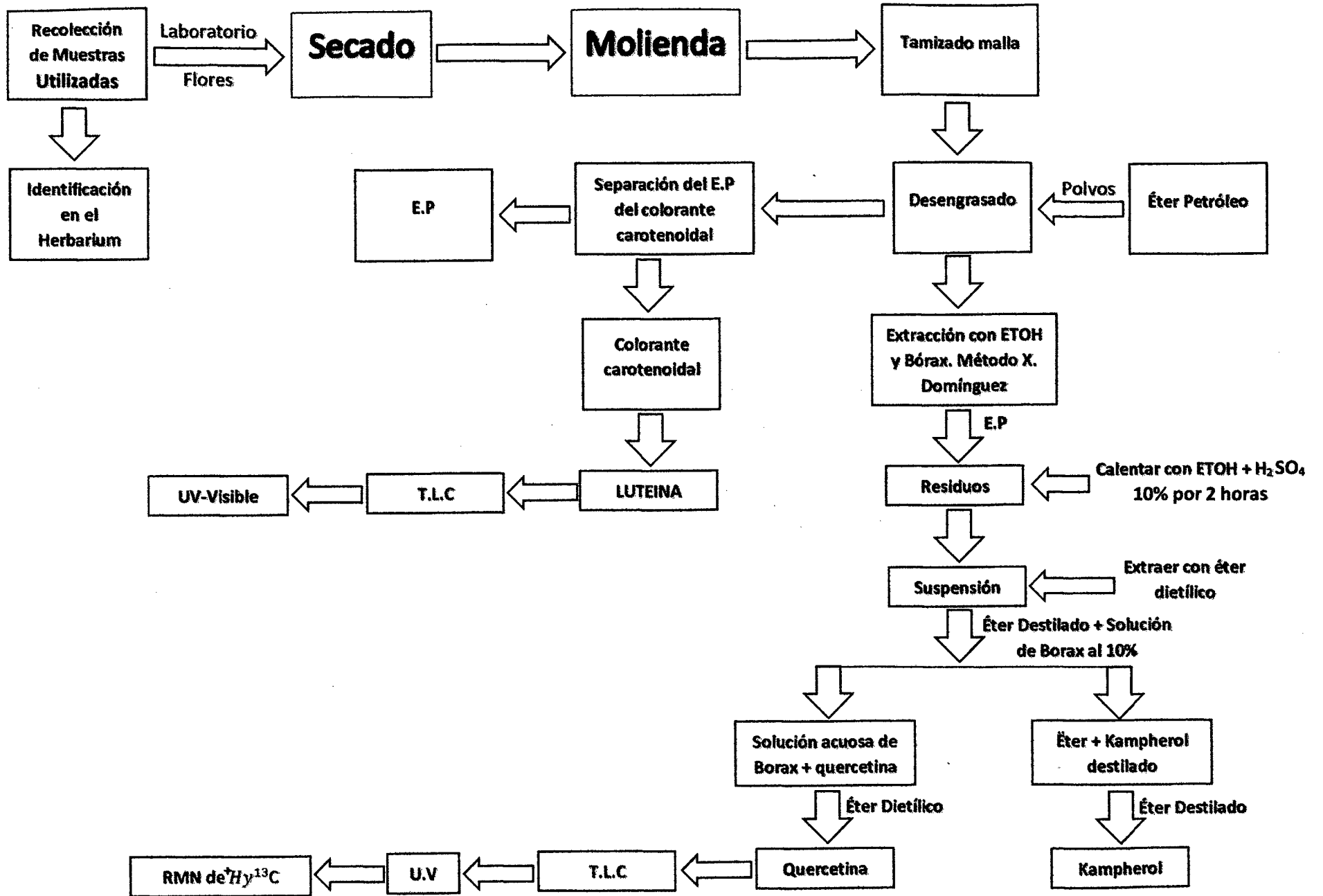


Laboratorio de RMN  
 Sección Química

```

===== CHANNEL11 =====
EXPI0      2
PROCNO     1
Date_      20121101
Time       16.46
Instrum    spect
PROBHD     5mm BB-4H
PULPROG    2g
TD         65536
SOLVENT    Acetone
HS         2
DS         16
SNH        0.094423 Hz
FIDRES     6188.119 Hz
AQ         5.2953587 sec
RG         50.8
DN         80.800 usec
DE         30.00 usec
TE         100.0 K
D1         1.00000000 sec
TDO        1
===== CHANNEL11 =====
NUC1       13C
P1         9.00 usec
PL1        -3.00 dB
PL1X       24.55817413 N
SFO1       900.1318534 MHz
SI         32768
SF         300.1300000 MHz
NDN        EN
SSB        0
LB         -0.30 Hz
GB         0
FC         1.00
    
```







**UNAP**

*Herbarium Amazonense - AMAZ*

Centro de Investigación de Recursos Naturales

## CONSTANCIA N° 44

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

**HACE CONSTAR:**

Que, la muestra botánica presentada por los bachilleres: **AYALA REYES JOHN ROBERT** y **EDDIE POOL PAREDES ARÉVALO**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; son parte de la Tesis Titulado: “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDALES Y FLAVONOIDALES DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Tagetes erecta* L. “flor de muerto, rosa sisa””. La cual fue verificado e identificado en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Nombre común	Nombre Científico	Familia
“flor de muerto, rosa sisa”	<i>Tagetes erectes</i> L.	ASTERACEAE

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 11 de Diciembre del 2013

Atentamente,

Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA  
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP

