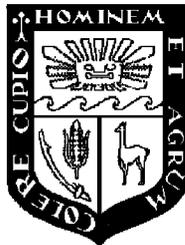


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

*Facultad de Ciencias Forestales*



“Estudio fitoquímico de la corteza de capirona  
*Calycophyllum spruceanum* en la zona de Pucallpa  
DE PUCALLPA ”

*Tesis para optar el Título de*  
**INGENIERO FORESTAL**

**Maria Rosa Prado Lam**

Lima – Perú

2009

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para calificar la sustentación del Trabajo de Tesis, presentado por la ex-alumna de la Facultad de Ciencias Forestales, Bach. MARIA ROSA PRADO LAM, intitulado “ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE CAPIRONA CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM EN LA ZONA DE PUCALLPA (*Calycophyllum spruceanum* BENTHAM HOOKER F. EXSCHUMANN) DE LA ZONA DE PUCALLPA”

Oídas las respuestas a las observaciones formuladas, lo declaramos:

.....

con el calificativo de .....

En consecuencia queda en condición de ser considerada APTA y recibir el título de INGENIERO FORESTAL.

La Molina, 21 de Agosto de 2009

.....  
Ing. Florencio Trujillo Cuellar  
Presidente

.....  
Ing. Neptali Bustamante Guillen  
Miembro

.....  
Ing. Elvito Villegas  
Miembro

.....  
Dr. Hector Enrique Gonzales Mora  
Patrocinador

.....  
Lic. Deysi GuzmanLoayza

---

Copatrocinator

## RESUMEN

*Calycophyllum spruceanum* Benth. (Rubiaceae) es un árbol conocido como “capirona”, cuya corteza es utilizada tradicionalmente por los pobladores de la Amazonia peruana y otras partes de América del Sur como antiinflamatorio, antimicrobiano, cicatrizante, emoliente, antidiabético, antioxidante, antiséptico, anti-trypanosomico, astringente, bactericida, cicatrizante, anticonceptivo, hemostato, insecticida, parasiticida y repelente. Sin embargo, hasta ahora pocos estudios químicos y farmacológicos han sido descritos para esta especie.

La presente investigación tuvo como fin el estudio fitoquímico de la corteza de *C. spruceanum* “capirona”, mediante la comparación de dos clases diamétricas. Además, se realizó la caracterización de los iridoides por ser marcadores quimiotaxonómicos en la familia Rubiaceae.

El material botánico se recolectó en noviembre de 2008, en el distrito de Callería, provincia Coronel Portillo departamento de Ucayali. Con las muestras pulverizadas de la corteza se realizó una extracción hidroalcohólica por percolación. Mediante una marcha fitoquímica se detectaron compuestos lactónicos, antraquinonas, flavonoides, azúcares reductores y libres, iridoides, taninos condensados y saponinas. No fue detectada la presencia de alcaloides en el extracto estudiado.

Se identificó los iridoides utilizando un extracto metanólico de *C. spruceanum* mediante cromatografía en capa fina analítica. Se utilizó el sistema de solventes: butanol, acetato de etilo (100:2:2). La identificación de los iridoides se realizó por espectroscopía UV.

Palabras clave: *Calycophyllum spruceanum*, capirona, Rubiaceae, perfil fitoquímico, iridoides

# ÍNDICE

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>RESUMEN</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>ÍNDICE</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1 <i>LA FAMILIA RUBIACEAE (A.L. DE JUSSIEU)</i> .....	3
2.1.1 Morfología de la familia.....	3
2.1.2 Filogenia y evolución.....	5
2.1.3 Estudios químicos en la familia Rubiaceae.....	5
2.1.4 Interés económico de la familia Rubiaceae.....	6
2.2 <i>GENERO Y ESPECIE: CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM</i> .....	7
2.2.1 Taxonomía de Calycophyllum spruceanum.....	7
2.2.2 Etimología.....	8
2.2.3 Nombres comunes.....	8
2.2.4 Descripción de la especie.....	9
2.2.5 Distribución natural y hábitat.....	11
2.2.6 Fenología, polinización y dispersión.....	11
2.3 <i>ETNOFARMACOLOGIA Y ETNOBOTANICA DE CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM</i> .....	11
2.4 <i>ESTUDIOS QUÍMICOS DE CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM</i> .....	14
2.5 <i>METODOLOGIAS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA</i> .....	15
2.5.1 Etapa I. Caracterización fitoquímica preliminar.....	15
2.5.2 Etapa II. Establecimiento de las especificaciones de calidad del material vegetal y sus extractos.....	15
2.5.3 Etapa III. Establecimiento de las especificaciones de calidad del Medicamento Herbario.....	16
2.5.4 Etapa IV. Aislamiento y elucidación estructural del Principio Activo.....	16
2.6 <i>METABOLITOS CELULARES</i> .....	16
2.6.1 Metabolitos primarios.....	16
2.6.2 Metabolitos secundarios .....	16
2.7 <i>IRIDOIDES</i> .....	21
2.7.1 Definición.....	21
2.7.2 Propiedades físico-químicas de los iridoides.....	22
2.7.3 Biosíntesis de los iridoides.....	22
2.7.4 Actividades biológicas de los iridoides .....	25
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1 <i>LUGAR DE MUESTREO</i> .....	26
3.1.1 Descripción del área de muestreo.....	26
3.1.2 Antecedentes de investigación en la zona.....	27
3.2 <i>OBTENCION DE MATERIAL BOTANICO</i> .....	28
3.2.1 Deseccación y molienda.....	29
3.3 <i>ANALISIS FÍSICO-QUÍMICOS</i> .....	29
3.3.1 Determinación de humedad gravimétrica.....	29
3.3.2 Determinación de cenizas .....	29
3.3.3 Solubilidad .....	29
3.3.4 Obtención de extractos .....	29
3.3.5 Extractivos .....	29
3.4 <i>TAMIZAJE FITOQUIMICO</i> .....	30
3.5 <i>METABOLITOS PRIMARIOS</i> .....	30
3.5.1 Determinación de compuestos grasos .....	30
3.5.2 Determinación de azúcares.....	30

3.5.3	Determinación de aminoácidos libres .....	31
3.6	<i>METABOLITOS SECUNDARIOS</i> .....	31
3.6.1	Determinación de alcaloides .....	31
3.6.2	Determinación de quinonas.....	32
3.6.3	Determinación de cumarinas.....	32
3.6.4	Determinación de saponinas.....	32
3.6.5	Determinación de compuestos fenólicos .....	33
3.6.6	Determinación de iridoides .....	34
3.7	<i>IDENTIFICACIÓN DE IRIDOIDES</i> .....	34
3.8	<i>EVALUACION DE RESULTADOS</i> .....	35
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
4.1	<i>ENSAYOS DE HUMEDAD</i> .....	36
4.2	<i>ENSAYOS DE CENIZAS</i> .....	37
4.3	<i>DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS</i> .....	39
4.4	<i>ENSAYO DE SOLUBILIDAD</i> .....	40
4.5	<i>TAMIZAJE FITOQUÍMICO</i> .....	41
4.5.1	Metabolitos Primarios .....	43
4.5.2	Metabolitos Secundario .....	44
4.6	<i>IDENTIFICACION DE IRIDOIDES</i> .....	48
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
6.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
	<b>ANEXO 1. COORDENADAS DEL AREA DE MANEJO</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANEXO 2. COORDENADAS DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>59</b>
	<b>ANEXO 3. MAPA DE UBICACIÓN DE MUESTRAS RECOLECTADAS</b> .....	<b>60</b>
	<b>ANEXO 4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS A UTILIZAR EN LA MARCHA FITOQUÍMICA</b> .....	<b>61</b>

*Lista de cuadros*

	Página
<b>Cuadro 1</b>	Resultados de actividad biológica de la capirona (Taylor, 2005)..... 14
<b>Cuadro 2</b>	Compuestos químicos en <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Zuleta <i>et al</i> , 2003).. 15
<b>Cuadro 3</b>	Muestras recolectadas según clase diamétrica..... 28
<b>Cuadro 4</b>	Esquema de la evaluación de resultados del estudio fitoquímico de corteza de capirona ..... 35
<b>Cuadro 5</b>	Resultados ensayo de humedad gravimétrica ..... 36
<b>Cuadro 6</b>	Resultados ensayos de cenizas en capirona..... 37
<b>Cuadro 7</b>	Resultados ensayo determinación de extractivos..... 39
<b>Cuadro 8</b>	Resultados del ensayo de solubilidad..... 40
<b>Cuadro 9</b>	Resultados del tamizaje fitoquímico en corteza de <i>C. sprucenaum</i> ..... 42
<b>Cuadro 10</b>	Gradiente de colores ensayo Bortranger (Tabla: M.Prado) ..... 44
<b>Cuadro 11</b>	Gradiente de color ensayo FeCl <sub>3</sub> (Fuente: M.Prado)..... 46
<b>Cuadro 12</b>	Gradiente de color ensayo de Shinoda (fuente: M.Prado) ..... 47

## Lista de figuras

	Página
<b>Figura 1</b>	Mapa de distribución de la familia Rubiaceae (Brummit, 2007) ..... 3
<b>Figura 2</b>	Morfología de la familia Rubiaceae: hojas decusadas y enteras, estípulas, flores actinomorfas con ovario ínfero. (Robbretch, 2009)..... 4
<b>Figura 3</b>	<u><i>Calycophyllum spruceanum</i>. Comunidad de Callería, Ucayali.</u> (Foto: M. Prado).....8
<b>Figura 4</b>	Morfología de <i>Calycophyllum spruceanum</i> : A) Ramita con hojas y flores (x0.6), B) Flores (x3.5), C) Flor, sección longitudinal(x4), D) estambre (x10), E) Hipantio con la corola removida(x9), F) fruto(x2), G) semilla(x10). (Reynel et al, 2003) ..... 10
<b>Figura 5</b>	Estructura básica de una cumarina: $\alpha$ -oxo-benzopirona (IUPAC, 1997) ..... 18
<b>Figura 6</b>	Estructura básica de las quinonas (IUPAC, 1997)..... 19
<b>Figura 7</b>	Estructura fenólica: ácido-2-hidroxiantracénico (IUPAC, 1997)..... 19
<b>Figura 8</b>	Estructura de la flavona (IUPAC, 1997) ..... 20
<b>Figura 9</b>	Estructura base de los iridoides: -2-oxabicyclo [4,3,0]-nonano (Vercauteren, 2007) ..... 21
<b>Figura 10</b>	Biosíntesis de los iridoides (Vercauteren, 2007) ..... 23
<b>Figura 11</b>	Importancia de los seco-iridoides (Vercauteren, 2007)..... 24
<b>Figura 14</b>	Croquis del área de manejo forestal de la CN Callería (Nalvarte, 2003)..... 27
<b>Figura 13</b>	Resultados del ensayo de humedad gravimétrica ..... 37
<b>Figura 14</b>	Resultados ensayo de cenizas corteza de capirona ..... 39
<b>Figura 15</b>	Resultado determinación porcentaje de extractivos corteza de capirona..... 40
<b>Figura 16</b>	Ensayo de la espuma (Foto: M.Prado) ..... 45
<b>Figura 17</b>	Resultado ensayo $FeCl_3$ (Foto: M.Prado)..... 46
<b>Figura 18</b>	Ensayo de Shinoda (foto: M.Prado)..... 47
<b>Figura 19</b>	Fraciones obtenidas en CCD observadas a 360nm (Foto: M.Prado) ..... 48
<b>Figura 20</b>	Fraciones obtenidas en CCD observadas a 254nm (Foto: M.Prado) ..... 48
<b>Figura 21</b>	Espectro UV de la Fracción 1 ..... 49
<b>Figura 22</b>	Espectro UV fracción 1 con $AlCl_3$ ..... 49
<b>Figura 23</b>	Espectro UV fracción 2 ..... 50
<b>Figura 24</b>	Espectro UV de la fracción 3 ..... 50

***LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS Y ABREVIATURAS***

$\mu$ l-	: microlitros
n-BuOH	: butanol
°C	: grado centígrado
CCD	: cromatografía de capa delgada
<i>Cfr</i>	: confróntese, compárese
cm	: centímetro
CLAR-DAD	: cromatografía líquida de alta resolución-detector arreglo de diodos
DMC	: diámetro mínimo de corta
EtOH	: etanol
et al.	: y otros
g	: gramo
mL	: mililitros
MeOH	: metanol
nm	: nanómetro
pp	páginas
rbcL	: gen de la ribulosa bifosfato carboxilasa
Rf	: movilidad relativa al frente del solvente
RMN	: resonancia magnética nuclear
TF-IR	: transformada de Fourier infrarrojo
UV	: ultravioleta

## 1. INTRODUCCIÓN

Se calcula que el número de especies vegetales presentes en el planeta estaría comprendida entre 250 a 500 mil, de las cuales menos de un 5% han sido estudiadas desde un punto de vista fitoquímico y un porcentaje mucho menor en cuanto a su actividad biológica (Gazda, 2004).

En el Perú se pueden encontrar 20 mil especies vegetales, el 8% del total de plantas encontradas en el mundo, siendo la mayoría de ellas especies nativas de la Amazonía. Sin embargo, se calcula que menos de 1% ha sido estudiada desde un punto de vista fitoquímico y farmacológico (Desmarchelier & Schaus, 2000). El conocimiento sobre la mayoría de especies se restringe a datos empíricos y etnofarmacológicos, debido a que poco se conoce al respecto de las sustancias químicas responsables de las acciones farmacológicas. El estudio de los componentes químicos de la flora peruana es una tarea laboriosa y multidisciplinaria que involucra a distintos profesionales, entre ellos a nosotros los forestales.

El uso tradicional de plantas medicinales en el Perú data de tiempos antiguos, Raimondi (1857) lo explica bien cuando afirma: “los indios del Perú son los primeros naturalistas del mundo, empleando las plantas en economía doméstica, en la tintorería, en las construcciones y sobre todo en la cura de diferentes enfermedades”. Este conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales es de suma importancia, ya que constituye no sólo la base de muchas investigaciones fitoquímicas sino un acercamiento efectivo para la determinación de compuestos activos provenientes de plantas superiores.

El género *Calycophyllum* es un género de 46 especies, de las cuales se reportan la existencia de 6 para América Tropical extendidas en Brasil, Bolivia, Perú y Ecuador. La especie más importante de este género en nuestro país es *Calycophyllum spruceanum*, conocida en el Perú como “capirona”, el cual es un árbol de múltiples usos como madera, medicinal y carbón.

El árbol de “capirona” posee una corteza característica, que se regenera completamente cada año, hace que su aprovechamiento pueda ser sostenible. La corteza lisa, de aspecto pulido, cambia de color en el tiempo conforme va madurando de un tono verde a un tono marrón. Entre las principales actividades descritas como usos etnobotánicos de la corteza de

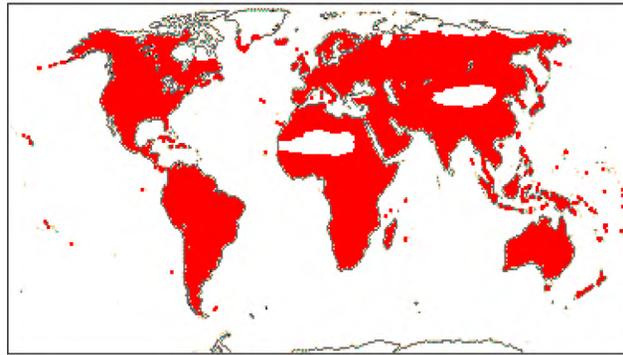
*Calycophyllum spruceanum* destacan: antiinflamatorio, antimicrobiano, cicatrizante, emoliente, anti-envejecimiento, antidiabético, antioxidante, antiséptico, anti-trypanosómico, anti-arrugas, astringente, bactericida, anticonceptivo, hemostato, insecticida, parasiticida y repelente (Duke, 2008).

Actualmente, la capirona ha cobrado gran importancia comercial debido a que es una especie de rápido crecimiento, adaptada a las inundaciones, poseedora de una madera de alta densidad, durable e ideal para construcciones. El objetivo principal de la presente investigación es contribuir a la información existente sobre los perfiles químicos de las especies forestales de la Amazonía, específicamente en *C.spruceanum* “capirona”. Por tal motivo, se evaluaron los componentes fitoquímicos presentes en la corteza de capirona y su variación según el diámetro. Complementariamente, se caracterizaron los marcadores quimiotaconómicos de la familia Rubiaceae: iridoides.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 LA FAMILIA RUBIACEAE (A.L. DE JUSSIEU)

Las Rubiáceas son una familia conformada por árboles, arbustos, hierbas y algunas formas de lianas. Su distribución es cosmopolita (figura 1), aunque se encuentra más diversificada en zonas tropicales y subtropicales. En zonas templadas, la mayoría de Rubiáceas son de hábito herbáceo. (Robbretch, 2009; Ugent, 2006; Watson, 1994)



**Figura 1** Mapa de distribución de la familia Rubiaceae (Brummit, 2007)

La familia Rubiaceae constituye la cuarta familia botánica más numerosa de Angiospermas, después de Asteraceae, Orchidaceae y Fabaceae. Las rubiáceas comprenden cerca de 650 géneros y 13000 especies<sup>1</sup> (Robbretch, 2009). En el Perú, presenta alrededor de 102 géneros y 740 especies, existen además 96 endemismos en 33 géneros, siendo *Psychotria* el género endémico más especioso. El género *Stilnophyllum* es endémico de nuestro país. (Brako & Zarucchi, 1993; Pino & Taylor, 2006).

#### 2.1.1 MORFOLOGÍA DE LA FAMILIA

En Rubiáceas las hojas son opuestas o verticiladas; simples, generalmente enteras con nervación pinnada. Estípulas interpeciolares frecuentemente soldadas, algunas veces foliáceas. Inflorescencias determinadas, aunque a veces presentan flores solitarias, terminales o axilares.

<sup>1</sup> Cfr. Judd (2001), y Ugent (2006) que afirman que el número de géneros de Rubiaceae va entre 550 a 600, mientras que el número de especies está entre los 6000 a 9000.

Las flores son generalmente hermafroditas y actinomorfas. Cáliz con 4-5 lóbulos. Corola con 4-5 lóbulos, o raramente con 8-10 lóbulos, rotácea o funeliforme. Estambres 4-5, epipétalos y alternados con los lóbulos de la corola. Ovario ínfero, usualmente bicarpelado. Disco nectarífero presente debajo del ovario. El fruto puede ser una cápsula con varias semillas o un esquizocarpo compuesto por segmentos con 1 semilla, o una baya carnosa. Semillas a veces aladas con abundante endospermo. (Judd *et al.*, 2001; Ugent, 2006)

La figura 2 muestra los principales caracteres morfológicos que permiten la identificación de la familia Rubiaceae.



**Figura 2** Morfología de la familia Rubiaceae: hojas decusadas y enteras, presencia de estípulas, flores actinomorfas con ovario ínfero. (Robbretch, 2009)

### 2.1.2 FILOGENIA Y EVOLUCIÓN

Las Rubiáceas constituyen un grupo monofilético<sup>2</sup>, la morfología y estudios de secuencias de *rbcL*<sup>3</sup> lo demuestran.<sup>4</sup> La divergencia entre las Rubiáceas empezó hace cerca de 66 millones de años. La familia es comúnmente dividida en 3 subfamilias: Rubioideae, Ixoroideae y Cinchonoideae. La estructura básica filogenética de la familia es Rubioideae, conformada por especies herbáceas, siendo las sub-familias más evolucionadas Ixoroideae y Cinchonoideae constituidas mayormente por especies leñosas. (Judd, 2001; Singh, 2004; Stevens, 2008)

La familia ha pasado por continuas clasificaciones y reestructuraciones desde Robbrecht (1988) a Bremer (2009). Estas reestructuraciones se han dado a nivel de subfamilia y tribus, gracias al avance de la biología molecular en las dos últimas décadas, que ha dejado de lado la clasificación basada sólo en caracteres morfológicos. Si bien la clasificación de una especie dentro de la familia es relativamente simple, la taxonomía a nivel de sub-familia y tribu es caótica, quedando muchos géneros sin poder ser clasificados dentro de una tribu específica. Esto debido a la falta de información sobre la distribución geográfica y los caracteres anatómicos de muchas taxas, sin embargo, los perfiles químicos de muchas especies están ayudando en su clasificación taxonómica (Bremer, 2009; Cardoso *et al.*, 2008)

### 2.1.3 ESTUDIOS QUÍMICOS EN LA FAMILIA RUBIACEAE

Los marcadores quimiotaxonómicos de la familia Rubiaceae son: alcaloides indólicos, iridoides y antraquinonas. Los alcaloides indólicos han sido los metabolitos secundarios más estudiados con el fin de comprobar la quimiotaxonomía de la familia. Además, han servido como evidencia para establecer relaciones morfológicas y químicas entre las familias Rubiaceae, Loganiaceae y Apocynaceae. (Gazda, 2004)

Cada una de las 3 principales subfamilias dentro de Rubiaceae presenta distintos perfiles químicos. Por ejemplo, en la subfamilia Ixoroideae, los marcadores quimiotaxonómicos exclusivos son los iridoides; en Cinchonoideae predominan los alcaloides indólicos y en

<sup>2</sup> Un grupo monofilético es un grupo de especies descendientes de una simple especie y que incluye todos los descendientes de esta especie troncal.

<sup>3</sup> *rbcL*: abreviatura del gen que codifica a la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, este gen está localizado en el genoma del cloroplasto y ha sido estudiado para inferir relaciones filogenéticas en niveles taxonómicos altos. (Judd, 2001)

<sup>4</sup> Bremer *et al.* (1995), Bremer *et al.* (2000) y Bremer (2009) para más detalle sobre estudios de biología molecular tomados como base para establecer la taxonomía en Rubiaceae.

Rubioideae las antraquinonas están presentes como la principal clase de metabolito secundario, sobretodo en géneros como *Rubia*, *Morinda* y *Gallium*. (Gazda, 2004)<sup>5</sup>

Las proantocianidinas pueden estar presentes o ausentes, los flavonoles como kaempferol, quercetina y ácido ursólico están presentes en la mayoría de géneros. Las saponinas o sapogeninas están ocasionalmente presentes. (Watson y Dallwitz, 2000). Se han reportado acumulación de aluminio<sup>6</sup> en algunas especies, sobretodo en la subfamilia Rubioideae. La acumulación de aluminio varía dentro de la familia, algunas subfamilias como la Ixoroideae carece de este, e incluso el nivel de acumulación de aluminio varía entre individuos según la localidad. Se cree que la acumulación de aluminio está relacionada a condiciones edáficas, condiciones ambientales y mecanismos de control de vías metabólicas. (Jansen *et al.*, 1999).

#### 2.1.4 INTERÉS ECONÓMICO DE LA FAMILIA RUBIACEAE

Rubiaceae es una familia que cuenta con un número importante de especies con interés económico. El “café”, *Coffea arabica*, originario de África, sintetiza la cafeína que es utilizada en la composición de diversos medicamentos. El árbol brasileño de “ipecacuana”, *Cephalis ipecacuana*, sintetiza un alcaloide llamado emetina, utilizada como expectorante y en el tratamiento de amebiasis. Las hojas de *Psychotria viridis* son utilizadas, junto con *Banisteriopsis caapi* de las *Malphigiaceae*, como el principal ingrediente de la bebida alucinógena denominada “ayahuasca”. (Ugent, 2006)

Los géneros *Cinchona* y *Ladembergia* que proporcionan quinina, utilizada contra la malaria. La “uña de gato” (*Uncaria tomentosa*) suministra diversos alcaloides como: uncarina, mitrafilina, rynchofilina. Los géneros *Genipa*, *Gallium* y *Rubia* son utilizados como plantas tintóreas. La especie *Genipa americana*, “huito”, es un frutal de la Amazonía, utilizado por muchas comunidades indígenas para colorear su piel en los rituales religiosos y produce un iridoide denominado genipina que posee actividad antimicrobiana. (Gazda, 2004).

---

<sup>5</sup>Gazda, 2004 (envía a Bolzani *et al.*, 2001, Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. *Recent research development in phytochemistry*, 5: 19-31)

<sup>6</sup> Se considera que una planta es acumuladora de aluminio cuando posee más de 1000ppm de Aluminio en sus tejidos.

La familia Rubiaceae también es importante en horticultura. Algunos géneros como *Gardenia*, *Ixora*, *Hamelia*, *Bouvardia*, *Pentas* y *Mussaenda* son conocidos por ser ornamentales. (Robbrecht, 2009).

## **2.2 GENERO Y ESPECIE: CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM**

Según Brako & Zaruchi (1993), el género *Calycophyllum* está conformado por 46 especies, de las cuales 2 son endémicas del Perú.

### **2.2.1 TAXONOMÍA DE CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Subfamilia: Ixoroideae<sup>7</sup>

Tribu: Condamineae

Género: Calycophyllum

Especie: spruceanum

Nombre científico: *Calycophyllum spruceanum* Bentham Hooker f. ex Schumann (figura 3)

Sinónimos botánicos: *Calycophyllum multiflorum*, *Eukylista* sp

---

<sup>7</sup> Ver Bremer (2009), quien refiere que estudios moleculares recientes ubican al género *Calycohyllum* dentro de la subfamilia Ixoroideae, siendo considerada antes dentro de la subfamilia *Cinchonoideae*



**Figura 3** *Calycophyllum spruceanum*. Comunidad Callería, Ucayali. (Foto: M. Prado)

### 2.2.2 ETIMOLOGÍA

*Calycophyllum*: nombre derivado del griego κάλυξ (Kalos) que significa hermoso y φύλλον (phyllum) que significa hoja. El nombre de la especie *spruceanum* es en honor a Richard Spruce, naturalista inglés del siglo XIX. (Proyecto Araucaria Amazonas Nauta, 2006)

### 2.2.3 NOMBRES COMUNES

*Calycophyllum spruceanum* recibe los siguientes nombres comunes (Brack, 1999; Duke, 2008; Vega, 2001)

- Capirona, capirona negra, capirona de bajo (Perú).
- Uhuachaunin (Voz aguaruna, Perú).
- Ashi (Voz cashibo, Perú).
- Haxo (Voz amahuaca, Perú).

- Asho, Huiso asho, nahua (Voz shipibo – conibo, Perú).
- Mulateiro, Escorrega macaco, mulateiro da varzea, pau marfim (Brasil).
- Guayabochi, (voz guarayo, Bolivia).
- Oquiurrubis (voz Chiquitano, Bolivia)

#### 2.2.4 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Según Reynel *et al* (2003), *Calycophyllum spruceanum*, “capirona”, es un árbol de 20 a 35 m de alto, de 50-120 cm de diámetro, con el fuste muy recto, cilíndrico y regular. Posee una corteza externa lisa, de color verde, característica, homogénea y lustrosa, posee ritidoma papiráceo<sup>8</sup> rojizo que se desprende en placas grandes, irregulares, revelando la superficie verdusca de la corteza. La corteza interna es homogénea, muy delgada, de 1-2mm de espesor, de color crema verduzco.

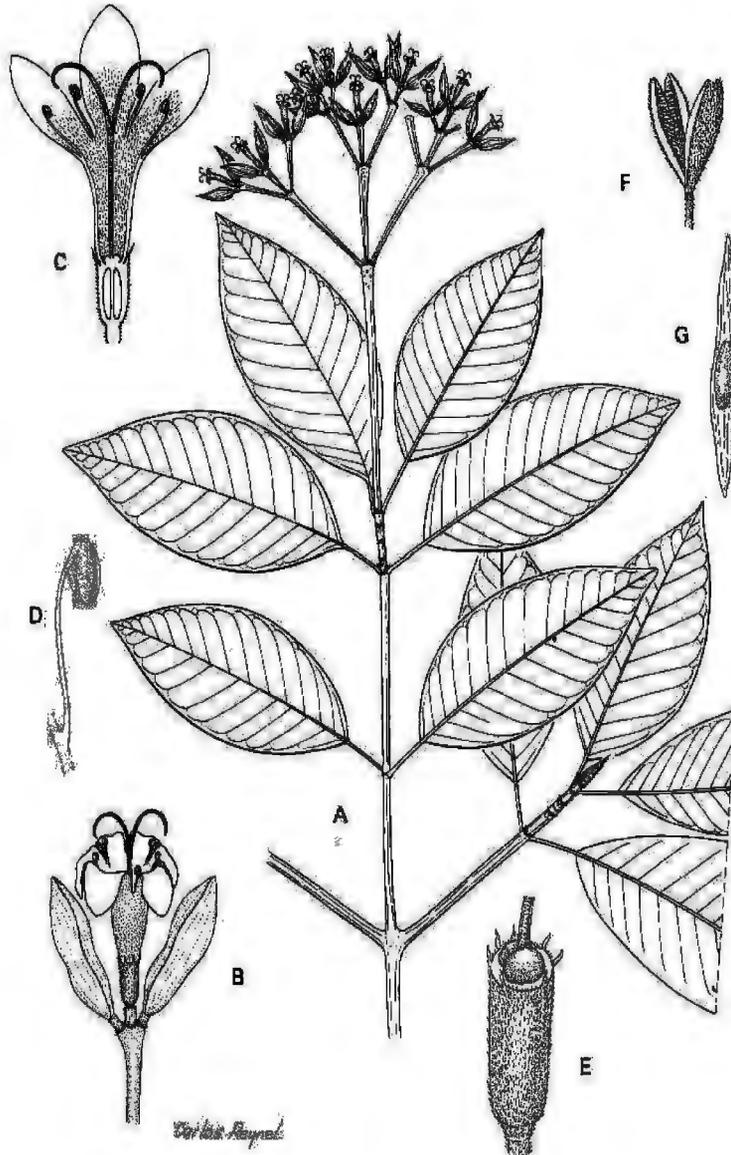
Las ramitas terminales (figura 4) tienen una sección circular, color marrón rojizo, lisas, lustrosas, provistas de lenticelas blanquecinas. Las hojas son simples, opuestas decusadas, elípticas u oblongas, de 5-10 cm de longitud y 3-5 cm de ancho, los peciolos de 1.5-2.5 cm de longitud, acanalados, las láminas enteras, el ápice agudo gruesamente acuminado, la base obtusa, la nervación pinnada, los nervios secundarios 12-15 pares, levemente impresos en la haz y en relieve en el envés, al igual que el nervio central, las axilas de los nervios secundarios con diminutos mechones de pelos o domatios en el envés (10x), las láminas cartáceas.

Las Inflorescencias son cimas terminales de 10-15 cm de longitud, provistas de numerosas flores. Las flores son hermafroditas, con cáliz y corola presentes, las flores de 1-1,5cm de longitud, cuando tiernas envueltas en una bráctea decidua que es normalmente eliminada primero por la flor central de cada trío de la cima, los pedicelos de 2 a 3mm de longitud, pubescentes, el cáliz provisto de apéndices de 1mm de longitud, la corola tubular-campanulada, 5-6 lobulada, los estambres 5-6 epipétalos, las anteras dorsifijas, el pistilo con ovario ínfero, el estilo filiforme y el estigma bifido.

---

<sup>8</sup> Cfr. Lao (1986) señala que el ritidoma de *Calycophyllum spruceanum* es coriáceo.

Los frutos son cápsulas pequeñas, elipsoide-alargadas, de 5-8 mm de longitud, pubescentes en su superficie; abren en dos valvas cuando maduran, las semillas diminutas, aladas y alargadas, con el embrión en posición central.



**Figura 4** Morfología de *Calycophyllum spruceanum* A) Ramita con hojas y flores (x0.6), B) Flores (x3.5), C) Flor, sección longitudinal(x4), D) estambre (x10), E) Hipantio con la corola removida(x9), F) fruto(x2), G) semilla(x10). (Reynel et al, 2003)

### 2.2.5 DISTRIBUCIÓN NATURAL Y HÁBITAT

*Calycophyllum spruceanum* se distribuye en toda la Amazonía peruana, hasta el sur de Brasil y Bolivia, por debajo de los 1200 msnm. La capirona es una especie heliófita, encontrada frecuentemente en bosques secundarios pioneros y tardíos, aunque también se le suele encontrar en bosques primarios y en las zonas ribereñas. También puede crecer en comunidades o manchales llamados "Capironales". (Reynel *et al.*, 2003).

Su presencia está condicionada en gran parte por la dinámica de los ríos, en playas de bosque ribereños o en claros de suelos arcillosos, es una especie que tolera la pedregosidad elevada. Se le encuentra en ámbitos con pluviosidad elevada y constante, pero también en zonas con una estación seca marcada. En áreas de regeneración natural puede ser encontrada asociada a otras especies de características pioneras. No se registran referencias sobre plagas o enfermedades. (De Campos, 2004)

Según Gentry (1996), *Calycophyllum spruceanum* ha sido reportada en los siguientes departamentos: Amazonas, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín y Ucayali.

### 2.2.6 FENOLOGÍA, POLINIZACIÓN Y DISPERSIÓN

La floración de *Calycophyllum spruceanum* ocurre desde inicios de la estación seca hasta su final entre Abril y Septiembre. La fructificación se produce entre Agosto y Septiembre. (Reynel *et al.*, 2003)

## 2.3 ETNOFARMACOLOGÍA<sup>9</sup> Y ETNOBOTANICA DE CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM

Según Duke (2008), la capirona está indicada para tratar: abscesos, acariasis, manchas causadas por el envejecimiento, anticonceptiva, emoliente, infecciones bacterianas, sangrado, moretones, quemaduras, mordeduras de escarabajo, conjuntivitis, dermatosis, diabetes, fibroma, lunares,

---

<sup>9</sup> Dos Santos & Fleurentin (1990) definen la etnofarmacología como "el estudio interdisciplinario y científico de la serie completa de sustancias naturales, de origen vegetal, animal o mineral y las formas relacionadas del conocimiento o práctica implementada por la cultura vernácula, para modificar las condiciones de los organismos vivientes, con propósito terapéutico o preventivo o para hacer un diagnóstico".

hongos, infecciones, micosis, parásitos, sarna, cicatrices , mordedura de serpiente, llagas o úlceras, hinchazón, tripanosoma, tumores, heridas y arrugas.

Los usos y las dosis aplicadas se describen a continuación: (Brack, 1999; Pinedo *et al.* 1997; Vega, 2001)

- Infecciones oculares: echar gota a gota el zumo de la corteza en el área afectada.
- Heridas infectadas: Aplicar el cocimiento de la corteza en forma de lavados.
- Cicatrizante, quemaduras, cortes: Aplicar la corteza raspada en forma de emplasto.
- Hemostático: Aplicar la corteza raspada en forma de emplasto.
- Diabetes: Tomar el cocimiento de la corteza.
- Sarna negra (arácnido): Frotar con la corteza previamente machacada.
- Hongos de la piel: Aplicar el polvo seco de la corteza, aplicar el té de la corteza luego del baño.
- Manchas de la piel y arrugas: Aplicar la savia.
- Enfermedades de los ovarios: Tomar la cocción de la corteza.
- Contra abscesos/golpes/hinchazones: Aplicar el cocimiento de la resina con tabaco y jabón en forma de crema.
- Mordeduras/picaduras: Aplicar el cocimiento de la resina con tabaco y jabón.
- Fibroma/tumores: aplicar en emplasto el cocimiento de la resina con tabaco y jabón.
- Envejecimiento: aplicar el té de la corteza luego del baño

La capirona también es utilizada por los pobladores de la Amazonía como material de construcción debido a que su madera posee una alta densidad y como leña por su alto poder calorífico. (Reynel et al., 2003).

Los quichuas del Napo distinguen dos tipos de capirona: la capirona de restinga que es utilizada para borrar cicatrices y la capirona de altura usada para combatir los hongos. El tratamiento contra la micosis es distinto al descrito anteriormente, los quichuas queman las ramas hasta que brote un aceite oscuro que es aplicado directamente en el área infectada. Los tikuna creen que la capirona desaparece manchas y arrugas porque el árbol “siempre cambia su carapa como si estuviera nueva” (FORMABIAP, 2008)

Los kukama utilizan la capirona para tratar la pelagra<sup>10</sup> tomando un cocimiento de la corteza 3 veces al día. En la cosmología kukama, existe un espíritu madre del capironal denominado Amaniwa Tsay.

El Amaniwa Tsay es la madre de las capironas. Cuida y vigila a sus crías que son las capironas para que no sean tocadas por personas que cortan capironas para quemar o cortar por gusto. Para cortar capirona pedimos a Amaniwa Tsay permiso para que no nos castigue al cortar los árboles. Castiga con dolor de cabeza o cuerpo. Es por eso que las capironas son árboles de tronco duro. Cuando no se le pide a la madre, el tronco se pone más duro y es difícil de cortar. Cuando sacamos la corteza pedimos a la madre poder para que la corteza nos pueda curar la enfermedad. (Anmer Mozombita, FORMABIAP 2008)

Los pobladores de Chacobo en Bolivia, mezclan la corteza en polvo con agua y se lo aplican sobre las heridas como antiséptico. Los Quichuas del Napo utilizan la capirona como estimulante; se cree que puede tener unos efectos semejantes a los de la coca<sup>11</sup>. Los Chacobo del Beni, en la Amazonia boliviana preparan un emplasto de la corteza que se aplica a las heridas con el objeto de prevenir y curar las infecciones. (Duke, 2008; Vega, 2001)

---

<sup>10</sup> La pelagra es una enfermedad causada por una dieta deficiente o insuficiencia del organismo para absorber la niacina (vitamina B3) o el triptófano (un aminoácido)

<sup>11</sup> Vega, 2001 (envía a Lescure *et al.*, 1987: 275. Plantas útiles de la Amazonia ecuatoriana, un inventario crítico de los datos disponibles en Quito)

Por su parte otras especies del mismo género como, *Calycophyllum acreanum* conocida por los huaorani en el Ecuador como “ooyowe” es utilizada en el tratamiento contra la malaria. Los indígenas del río Apaporis, en Colombia, beben una infusión de la corteza de *Calycophyllum obovatum* para eliminar los parásitos intestinales. (Vega, 2001).

## 2.4 ESTUDIOS QUIMICOS DE CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM

Sólo dos estudios han sido publicados sobre capirona. En el 2001, Portillo *et al* reportaron que el extracto diclorometánico de *Calycophyllum spruceanum* posee una amplia actividad anti fúngica (tabla 1) mostrando actividad contra 7 de las 11 cepas de hongos evaluadas especialmente frente a *C. neoformans*, *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*, siendo la última sensible también frente al extracto acuoso.

**Cuadro 1** Resultados de actividad biológica de la capirona (Taylor, 2005)

Actividad anti-bacterial	H <sub>2</sub> O extracto		Activo
Actividad anti-fungal	H <sub>2</sub> O extracto		Activo
Actividad anti-fungal	MeOH extracto	Agar plate	activo

Zuleta *et al.* (2003) refieren que el extracto etanólico de capirona posee una actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*, el parásito que causa el mal de Chagas, enfermedad que afecta cerca de 18 millones de personas al año en América Latina. Este ha sido el único reporte sobre la composición química de la capirona. También reportaron la presencia de iridoides y seco-iridoides en la corteza de *C.spruceanum* (tabla 2). Los iridoides aislados presentaron una IC<sub>50</sub> de 59.0, 90.2, 74.2 y 84.9 mg/ml, aunque los resultados demuestran una actividad baja contra *Trypanozoma cruzi*, constituyen el primer reporte de actividad antitrypanosomica por parte de seco-iridoides.

**Cuadro 2** Compuestos químicos en *Calycophyllum spruceanum* (Zuleta et al, 2003)

Dideroside	Monoterpeno	00.00146%
Dideroside methyl ester	Monoterpeno	00.00064%
Dideroside, 7-methoxy:	Monoterpeno	No determinado
Dideroside, 6'-O-acetyl	Monoterpeno	No determinado
Dideroside, 6'-acetyl-beta-d-glucopyranosyl	Monoterpeno	00.00113%
Dideroside, 8-O-tigloyl	Monoterpeno	00.0001%
Kingiside	Monoterpeno	No determinado
Loganetin	Monoterpeno	00.00016%
Loganin	Monoterpeno	00.00096%
Loganin, secoxy	Monoterpeno	00.00047%

## 2.5 METODOLOGIAS DE INVESTIGACION FITOQUÍMICA

En fitoquímica no existe una metodología de investigación definida. Los métodos a escoger dependen del investigador y del metabolito a estudiar. Sin embargo, la OMS (1998) propone cuatro etapas en el estudio fitoquímico:

### 2.5.1 ETAPA I. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Esta etapa incluye la realización de una revisión bibliográfica sobre la composición química de la especie y en particular de la parte de la planta a estudiar, el tamizaje fitoquímico para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en la planta. Es importante mencionar que la preparación de extractos debe ser lo más cercano posible a la forma de uso tradicional, siguiendo métodos farmacéuticos reconocidos (infusión, decocción maceración, percolación, etc.). Estos extractos deben pasar por un control de calidad que incluye: caracteres organolépticos, pH, índice de refracción, densidad relativa, contenido de sólidos totales, etc.

### 2.5.2 ETAPA II. ESTABLECIMIENTO DE LAS ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL Y SUS EXTRACTOS

Durante esta etapa se debe considerar la realización de: ensayos químicos según el grupo funcional que se está estudiando, técnicas analíticas que determinen la concentración de los metabolitos que ejercen la acción farmacológica, métodos físico-químicos que permitan caracterizar farmacológicamente la planta o parte de la planta estudiada.

### **2.5.3 ETAPA III. ESTABLECIMIENTO DE LAS ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DEL MEDICAMENTO HERBARIO**

Esta etapa incluye el desarrollo de métodos analíticos físicos, químicos y químicos físicos que permitan establecer las especificaciones de calidad del medicamento con vistas a su normalización y registro.

### **2.5.4 ETAPA IV. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL PRINCIPIO ACTIVO**

En esta etapa se procederá a aplicar métodos de fraccionamiento con técnicas de separación de las fracciones que posean mayor actividad farmacológica, desarrollar un procedimiento de extracción en mayor escala que tendrá como objetivo obtener suficiente cantidad de la sustancia activa para realizar los estudios farmacológicos y toxicológicos. Durante esta etapa se determina la estructura química del compuesto mediante el uso de métodos químicos y espectroscópicos.

## **2.6 METABOLITOS CELULARES**

Se consideran metabolitos celulares aquellas sustancias que son producidas durante el metabolismo de las plantas. Se pueden clasificar en:

### **2.6.1 METABOLITOS PRIMARIOS**

Los metabolitos primarios tienen un rol esencial en el metabolismo de las plantas y son constituyentes universales presentes en todas las plantas. Entre ellos podemos citar: azúcares, proteínas, amino ácidos, ácidos nucleicos, clorofilas, etc. (Harbone, 1999b)

### **2.6.2 METABOLITOS SECUNDARIOS**

Se entiende por metabolitos secundarios a todos los componentes químicos no incluidos dentro de los metabolitos primarios, sustancias que aparentemente cumplen un rol esencial en el metabolismo vegetal y cuya distribución varía de acuerdo a factores taxonómicos y bióticos. Un sistema de clasificación más adecuado de los metabolitos secundarios es en función a su biogénesis u origen biosintético. Bajo esta premisa, se pueden clasificar a los compuestos

fitoquímicos en 3 principales grupos biogénicos: terpenoides, alcaloides incluyendo compuestos nitrogenados relacionados y compuestos fenólicos. (Harbone, 1999b)

Diversas hipótesis se tejen aún sobre la función que desempeñan los metabolitos secundarios en las plantas. Diversos estudios han demostrado que los metabolitos secundarios son esenciales en los mecanismos de defensa, crecimiento<sup>12</sup> y reproducción de la planta. Una de las hipótesis más aceptadas afirma que una presión alta por parte de los consumidores favorece una mayor diversidad de metabolitos secundarios y viceversa, es decir, una alta diversidad de metabolitos secundarios indica un estado de defensa alto. Sin embargo, esta teoría no toma en cuenta que muchas veces el mecanismo de defensa de las plantas no está regulado por un solo metabolito secundario sino por la acción sinérgica del conjunto de ellos.<sup>13</sup> (Langenheim, 1984; Rosenthal & Berenbaum, 1991; Salisbury, 2000)

Por otro lado, Espinoza (2001) sugiere que el papel de los metabolitos secundarios en la defensa dependen de dos factores: la asignación de recursos (metabolitos secundarios) a la defensa y la diversidad de metabolitos. La diversidad de los metabolitos secundarios cumple un rol importante en la ecología evolutiva entre plantas y depredadores, como los insectos. La acumulación de ciertos metabolitos secundarios puede impedir la evolución de ciertos depredadores o por el contrario servir como marcadores taxonómicos llevando la relación planta-herbívoro a una hiper-especialización. (Leland *et al.*, 2006; Speight, 1999; Walberg, 2001)

#### **A) ALCALOIDES**

Son compuestos básicos nitrogenados como parte de un anillo heterocíclico, generalmente están mayormente distribuidos en plantas, pero han sido reportados también en sustancias excretadas por animales. Estas sustancias poseen una amplia gama de estructuras<sup>14</sup> y actividades fisiológicas que no es alcanzada por ningún otro grupo de productos naturales. La acción de los alcaloides en las plantas no ha sido definida claramente, aunque se cree que actúan como repelentes de la herbivoría o que pueden ser una forma de almacenar nitrógeno. El

<sup>12</sup> Las hormonas vegetales, reguladoras del crecimiento, son consideradas como metabolitos secundarios.

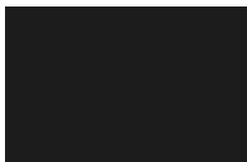
<sup>13</sup> Para resultados concluyentes se hace necesario contar con un perfil químico completo de la planta y así poder establecer las relaciones entre metabolitos secundarios y mecanismos de defensa. Cabe mencionar, que esto no ocurre muchas veces debido a que los investigadores orientan sus estudios a determinados metabolitos que son de su interés.

<sup>14</sup> Según Harbone (1999a) existen alrededor de diez mil estructuras descritas de alcaloides y que en promedio una nueva es reportada cada día.

interés en el estudio de alcaloides radica en que muchos de ellos poseen propiedades medicinales, muchos son usados como medicamentos, por ejemplo, codeína, morfina, etc. (Harborne, 1999a)

### **B) CUMARINAS**

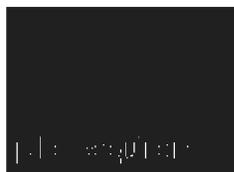
Son lactonas aromáticas que se caracterizan por el sistema benzo- $\alpha$ -pirona (figura 5), son solubles en soluciones alcalinas con la aparición de una coloración amarilla. El nombre de cumarina deriva del árbol de la Tonka, cuyo nombre común es coumarona, del cual se extrajo la primera de ellas. Se han descrito cerca de 700 cumarinas encontradas en plantas. Existen 3 principales tipos de cumarinas: hidroxicumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas. Las hidroxicumarinas han sido reportadas en 100 familias botánicas, mientras que las furano y piranocumarinas están restringidas sobre todo a las familias Umbeliferae y Rutaceae. Las furanocumarinas son biológicamente activas, exhibiendo un amplio rango de efectos tóxicos, para los mamíferos y humanos las cumarinas más peligrosas son las aflatoxinas que son hepatotóxicas. (Lock, 1994; Harborne, 1999a)



**Figura 5** Estructura básica de una cumarina:  $\alpha$ -oxo-benzopirona (IUPAC, 1997)

### **C) QUINONAS**

Son compuestos que poseen una estructura diona cíclica conjugada derivada de compuestos aromáticos por conversión de un número par de grupos  $-\text{CH}=\text{}$  en grupos  $-\text{C}(=\text{O})-$  con un arreglo de dobles enlaces (figura 6). Las quinonas, de las cuales se han descrito al menos 1200 estructuras, son pigmentos cuya coloración varía desde amarillo hasta negro, aunque la mayoría son amarillas, rojas o naranjas. Aunque están ampliamente distribuidas en las plantas, su coloración contribuye poco en la pigmentación de tejidos como corteza o duramen ya que son enmascaradas por otros pigmentos presentes. (Harborne, 1999a; IUPAC, 1997)



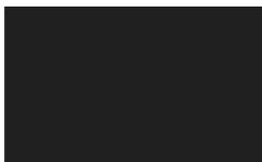
**Figura 6** Estructura básica de las quinonas (IUPAC, 1997)

#### **D) SAPONINAS**

Las saponinas son glicósidos de alcoholes tanto triterpenoides como esteroides con una cadena lateral espiroacetal. Las agliconas de las saponinas, que se obtienen por hidrólisis ácida, se denominan sapogeninas. Son sustancias solubles en agua y etanol, tensoactivas con propiedades similares a los jabones, lo que explica su nombre. Producen espuma cuando se agitan con agua, tienen la propiedad de ser hemolíticas, son la materia prima para la síntesis de hormonas esteroideas. (Valencia, 1995)

#### **E) FENOLES**

Se denominan fenoles a los compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos a un benceno u otro anillo arilo (figura 7). La hidrólisis ácida de tejidos vegetales produce ácidos fenólicos que están presentes normalmente asociados a la lignina. Estos ácidos fenólicos son de distribución universal, e.g. ácido p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido vainilico, mientras que en plantas leñosas encontramos el ácido tánico y el ácido elágico. Por el contrario, fenoles libres son raramente encontrados en las plantas. Una característica común a los compuestos fenólicos es su actividad antimicrobiana. (Harborne, 1999a)



**Figura 7** Estructura fenólica: ácido-2-hidroxiantracénico (IUPAC, 1997)

#### **F) TANINOS**

Los taninos son compuestos fenólicos ampliamente distribuido en las plantas, sobretodo en especies leñosas. Tienen la propiedad de reaccionar con proteínas formando copolímeros insolubles en agua. Forman precipitados de color azul oscuro o negro verdoso con las sales

férricas. Debido a su sabor astrigente, su principal función es proteger a la planta de la herbivoría. (Valencia, 1995)

Existen dos tipos de taninos: los taninos condensados o proantocianidinas, como la procianidina, y los taninos hidrolizables, como el ácido gálico. Ambos tipos de taninos se encuentran distribuidos en el reino vegetal, sin embargo, los taninos hidrolizables están restringidos a las plantas dicotiledóneas. Cabe mencionar que ambos tipos de taninos pueden ser encontrados en una misma especie. Los taninos condensados son importantes porque ayudan en la cicatrización de heridas y quemaduras, mientras que los taninos hidrolizables han demostrado tener propiedades antivirales y antitumorales. (Harborne, 1999a)

### **G) FLAVONOIDES**

Los flavonoides constituyen el grupo de metabolitos secundarios más numerosos y distribuidos en las plantas. Son estructuras derivadas del núcleo aromático 2-fenilbenzopirano y están arreglados en bajo el sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (figura 8). Estas sustancias se encuentran con frecuencia en forma de glicósidos. La principal función de los flavonoides además de ser pigmentos presentes en flores y frutos, es de atraer insectos y animales con fines de polinización y dispersión de semillas. La acción farmacológica de los flavonoides es amplia por ejemplo: actividades contra la fragilidad capilar, dilatadores de coronarias, espamolítica, antihepatóxica, estrógena y diurética. (Lock, 1994, Valencia, 1995)



**Figura 8** Estructura de la flavona (IUPAC, 1997)

## 2.7 IRIDOIDES

### 2.7.1 DEFINICIÓN

Los iridoides son monoterpenos que se caracterizan por un esqueleto ciclo pentapiránico (figura 9) denominado iridano (cis-2-oxabicyclo [4,3,0]-nonano). En la práctica, el término iridoide cubre un amplio grupo de productos naturales que se originan biogénicamente del iridano. (Bruneton, 2001; Zgorka, 2008)



Figura 9 Estructura base de los iridoides: -2-oxabicyclo [4,3,0]-nonano (Vercauteren, 2007)

Etimológicamente, el término iridoide indica una sustancia derivada de monoterpenos volátiles llamados iridodial e iridomirmecina, componentes de la secreción defensiva de hormigas australianas del género *Iridomyrmex*. El antiguo nombre usado para los iridoides era pseudoindicanos, ya que eran conocidos por reaccionar con los ácidos dando derivados de color azul, por esta razón muestras de plantas que contienen iridoides suelen oscurecerse luego de su recolección y secado. Los iridoides son reconocidos como marcadores quimiotaxonómicos de diversas familias: Bignoniaceae, Cornaceae, Dipsacaceae, Gronoviaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Loganiaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Verbenaceae, es decir están distribuidas sólo en las dicotiledóneas. (Zgorka, 2008)

Generalmente, los iridoides se encuentran en la forma de glicósidos. La aucubina, el catalpol y la loganina son los glicósidos de iridoides más distribuidos en las plantas. Se encuentran particularmente en ciertos géneros como *Plantago* y *Veronica* influenciando en su actividad terapéutica. Las agliconas son generalmente inestables y se desintegran después de una

hidrólisis ácida originando un residuo de color azul. Existen alcaloides iridoideos como la gentianina y los alcaloides iridoideos de *Valeriana officinalis*, especie que también contiene epóxidos iridoideos como los valepotriatos. (Anaya, 2004; Harborne, 1999a)

### **2.7.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS IRIDOIDES**

Los iridoideos son compuestos líquidos o sólidos, mayormente estables a temperatura ambiente, cristalinos, amorfos, poseen altos puntos de fusión. Glicósidos polares de iridoideos son muy solubles en agua y alcoholes (EtOH, MeOH, n-BuOH), sin embargo la solubilidad de las agliconas es un poco baja y aumenta con el número de grupos hidroxilos. Seco-iridoideos y esterés de iridoideos son solubles en solventes orgánicos como acetato de etilo o cloroformo. (Zgorka, 2008)

### **2.7.3 BIOSÍNTESIS DE LOS IRIDOIDES**

Los iridoideos son derivados biosintético de precursores monotérmicos y como los monotérmicos son originados del geraniol que sigue un proceso de ciclación del 10-oxogeraniol en iridooidal (figura 10). La glucosilación y oxidación del iridooidal conduce a la formación del loganósido precursor inmediato de la mayoría de iridoideos. La apertura del ciclo del loganósido produce el secologanósido, precursor de los secoiridoideos y posteriormente a los alcaloides monotérmicos. (Bruneton, 2001).

Los seco-iridoideos constituyen los precursores biosintéticos de los alcaloides terpmicos. La ruta biosintética de los iridoideos es importante debido a que la condensación del secologanósido da lugar a la formación de los precursores de los alcaloides (figura 11) de las Apocynaceae, Loganiaceae y Rubiaceae. Generalmente los seco-iridoideos suelen estar presentes con su respectivo derivado alcaloide. (Harbone, 1999a).

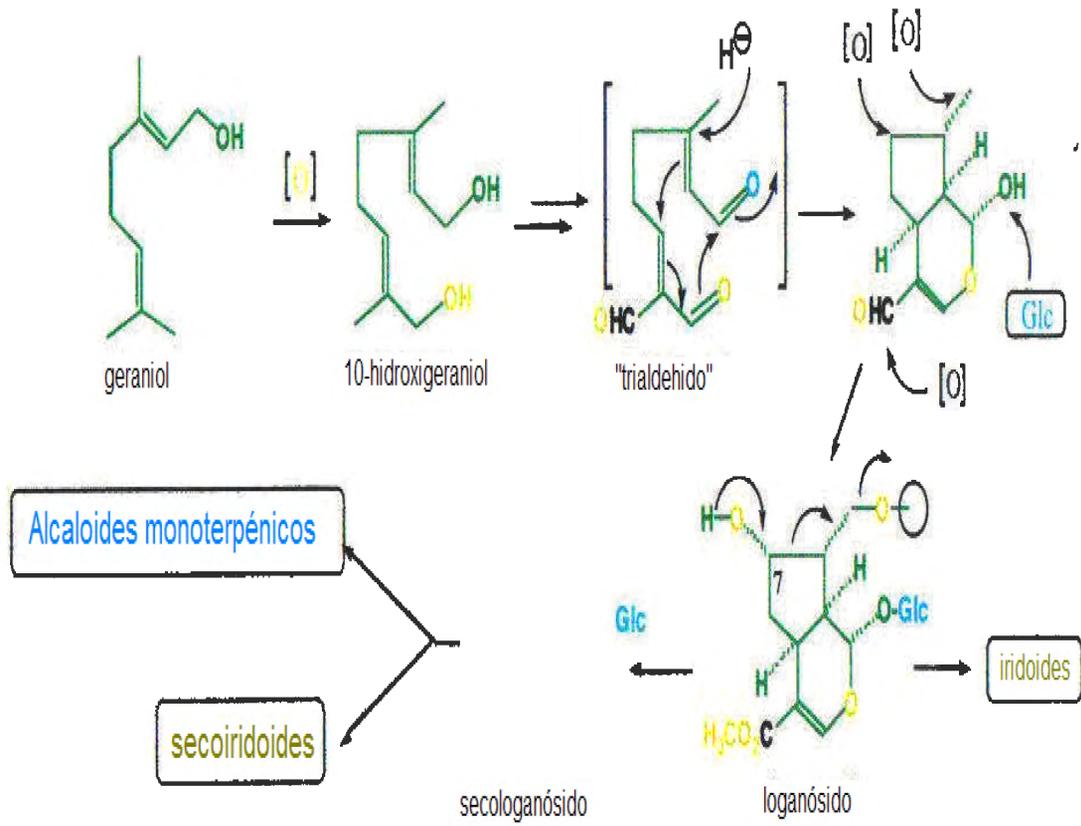


Figura 10 Biosíntesis de los iridoides (Vercauteren, 2007)

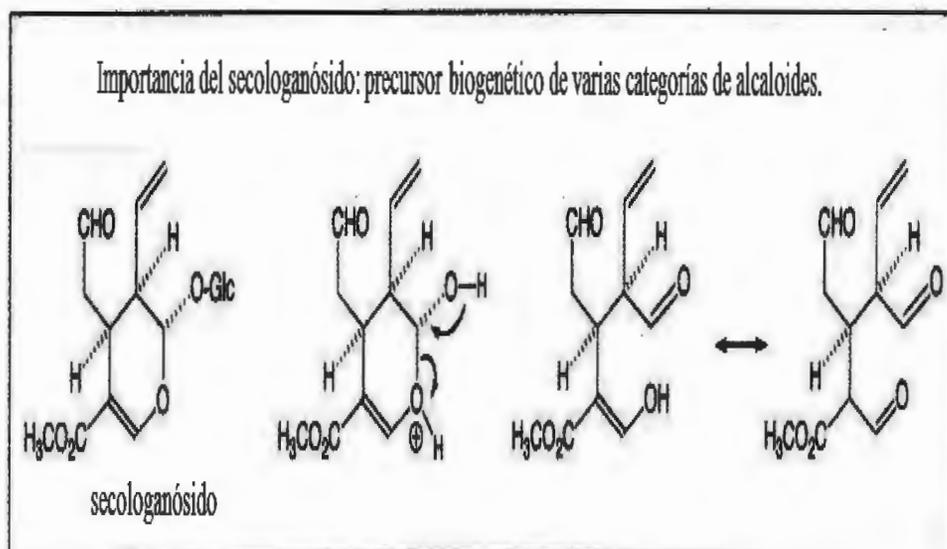


Figura 11 Importancia de los seco-iridoides (Vercauteren, 2007)

#### 2.7.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS IRIDOIDES

Los iridoides son sustancias amargas que pueden repeler a algunos depredadores. Sin embargo, algunos iridoides cumplen funciones de atracción de organismos especialistas (Anaya, 2003). Por ejemplo, la mayoría de las familias botánicas utilizadas como hospederos por las mariposas del género *Melitaneae* producen iridoides. Los glucósidos de iridoides son estimulantes necesarios para algunas larvas de este género de mariposas, que secuestran los iridoides para utilizarlos como defensa química, de esta forma las larvas se vuelven desagradables para los depredadores. Incluso, la colonización de plantas que contienen iridoides, por parte de este tipo de mariposas se ha convertido en un rasgo filogenético que se ha conservado a lo largo del tiempo. (Walhberg, 2001)

La presencia de iridoides está restringida a dicotiledóneas, en familias más evolucionadas. No se ha reportado su presencia en monocotiledóneas ni en gimnospermas. Algunos iridoides muestran actividades antimicrobianas. Plantas que contienen seco-iridoides han sido utilizadas en la medicina tradicional como tónicos amargos como *Cornus sp* o antiinflamatorios como *Euphrasia*. Algunas agliconas como allamandinan y fulvoplumierina han demostrado actividades anti leucémicas. Glucósidos de iridoides como la aucubina han demostrado propiedades diuréticas y laxativas. En grandes concentraciones y en la presencia de ácidos, los iridoides pueden ser tóxicos. (Harborne, 1999a)

La especie *Nepeta* de la familia *Labiatae* tiene propiedades excitantes en los felinos, posiblemente porque su olor se asemeja a las sustancias usadas por estos animales para el marcaje territorial. Esta planta conocida como nébeda contiene nepetalactona, sustancia que funciona como repelente de insectos. (Anaya, 2003)

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE MUESTREO**

##### **3.1.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO**

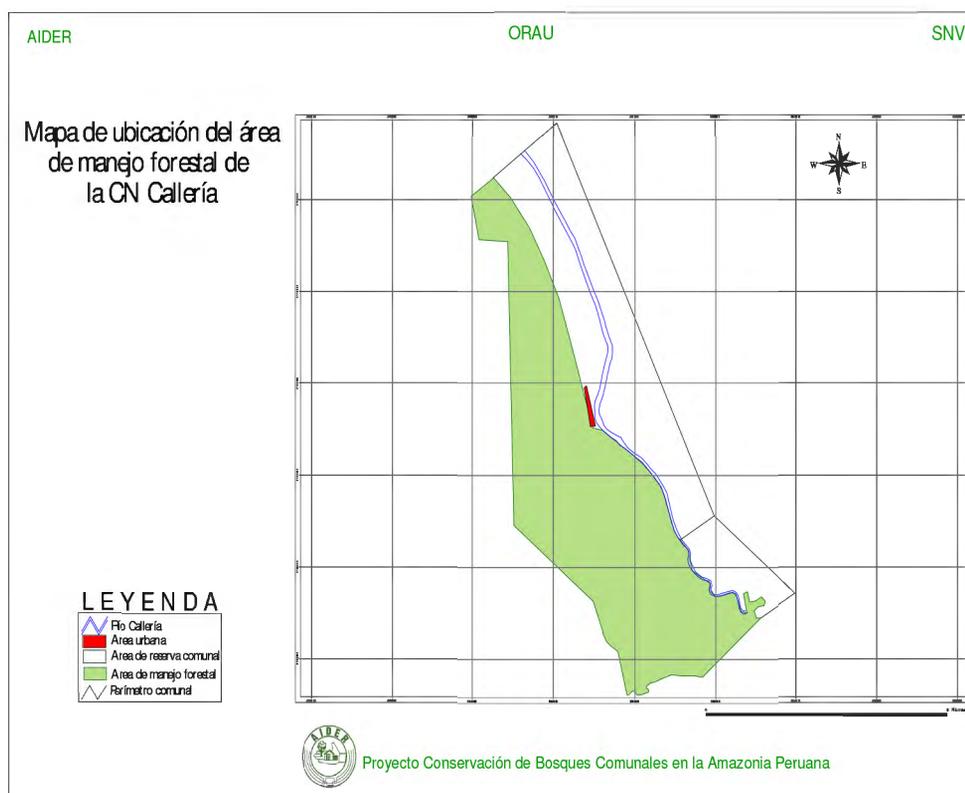
El área de muestreo fue la comunidad nativa Callería que se encuentra ubicada en el distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo, en el departamento de Ucayali (figura 12). El área de manejo se enlaza con la ciudad de Pucallpa por vía fluvial, aproximadamente a 30 Km. La superficie del área de manejo es de 2,528 ha, con un perímetro de forma irregular con límites naturales y artificiales (anexo 1). La principal vía fluvial es el río Callería que cruza el área de la comunidad y que es navegable durante todo el año. El área muestra un paisaje de terrazas bajas, con un relieve del terreno de plano a ligeramente ondulado, inundable durante la época de creciente. Se encuentran restingas medias cubiertas con bosques primarios. Dentro y fuera del área de manejo existen algunos cuerpos de agua, denominados “cochas” cuyas áreas circundantes lo conforman suelos muy humedecidos.

El área de manejo se caracteriza por presentar bosques latifoliados primarios poco intervenidos, de restinga y bajiales. El dosel superior del bosque alcanza los 35 m con árboles emergentes que sobrepasan los 40 metros de altura. Se observa buena capacidad de regeneración natural, especialmente en restingas. Además, se encuentran pequeñas superficies cubiertas con bosques secundarios, productos de áreas abandonadas por la agricultura de rozo, tumba y quema, con presencia de especies de cetico, bolaina, capirona, shimbillo y otras. (Nalvarte, 2003)

De acuerdo al Mapa Ecológico del Perú (ONERN, 1976), el área de manejo se ubica dentro de la zona de vida bosque húmedo tropical (bh-T), caracterizada por presentar una biotemperatura anual máxima de 25.7°C y mínima de 23.2°C; con precipitación anual de 1,800 mm. Suelos normalmente profundos, ácidos y arcillosos. La composición florística del bosque de árboles a partir de 10 cm DAP cuenta con un total de 86 especies forestales, diferenciadas a nivel de nombre común, y distribuidas en por lo menos 26 familias botánicas. (Nalvarte, 2003)

### 3.1.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN EN LA ZONA

En el 2005, Klouleck *et al.* realizaron un tamizaje de la actividad antibacterial de los extractos



**Figura 14** Croquis del área de manejo forestal de la CN Callería (Nalvarte, 2003)

etanólicos de 9 plantas medicinales utilizadas en el distrito de Callería. Los resultados fueron prometedores, de las 9 plantas estudiadas, 8 demostraron poseer propiedades antimicrobianas. Entre ellas, destacan *Phyllanthus amarus* y *Terminalia catappa* que mostraron potencial para el descubrimiento de principios antibacterianos.

### 3.2 OBTENCION DE MATERIAL BOTANICO

Las muestras de corteza de *Calycophyllum spruceanum* fueron recolectadas en noviembre del 2008 en la comunidad de Callería. Se recolectaron muestras provenientes de 20 árboles (anexo 2 y anexo 3), éstas se subdividieron en dos clases diamétricas en función al DMC de la capirona que es 41 cm. Todas las muestras fueron recolectadas al mismo nivel de altura, en el primer tercio. El espesor de la corteza en promedio fue de 2mm.

**Cuadro 3** Muestras recolectadas según clase diamétrica

I	1	22
	3	39
	4	30
	6	41
	9	41
	13	22
	17	40
	18	38
II	2	61
	7	65
	8	78
	5	66
	10	76
	11	86
	12	55
	14	85
	15	83
	16	49
	19	60
	20	90

Luego de su recolección, el material vegetal fue secado a temperatura ambiente. Se evitó exponer las muestras durante mucho tiempo al sol, asimismo se empaquetó el material para protegerlo de la humedad y evitar su descomposición. En Pucallpa y antes de su traslado a Lima, las muestras pasaron por una selección, de tal forma que aquellas con signos de

presencia de hongos o en mal estado fueron descartadas; luego se procedió a un nuevo empaquetado.

### **3.2.1 DESECACIÓN Y MOLIENDA**

Las muestras fueron secadas en el Laboratorio de Secado de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNALM durante 3 días a 35°C. La temperatura usada fue determinada con el fin de no volatilizar ciertos extractivos que son termolábiles, de tal forma que el estudio fitoquímico no se vea alterado. Una vez secado el material, este fue pulverizado con la ayuda de un molino, del cual se obtuvo el material utilizado en los ensayos.

### **3.3 ANALISIS FISICO-QUÍMICOS**

Antes de realizar los análisis fitoquímicos se realizaron las pruebas siguientes para caracterizar el material vegetal:

#### **3.3.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD GRAVIMÉTRICA**

El grado de humedad de las muestras se determinó por la técnica descrita en la norma TAPPI T3-wd-77.

#### **3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

Se determinaron las cenizas totales siguiendo el método descrito en la NRSP-309.

#### **3.3.3 SOLUBILIDAD**

Consiste en determinar el grado de alcohol al cual los diferentes metabolitos secundarios son más solubles según el método de ensayo NRSP – 309.

#### **3.3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS**

Los extractos fluidos se obtuvieron por el método de percolación.

#### **3.3.5 EXTRACTIVOS**

Se determinó el porcentaje extractivos en alcohol según la norma TAPPI T 12m-59

### 3.4 TAMIZAJE FITOQUIMICO<sup>15</sup>

Una vez determinado el grado de solubilidad, se realizaron una serie de reacciones analíticas, denominadas *screening* fitoquímico, con el fin de determinar de forma cualitativa, la presencia de distintos grupos fitoquímicos. La detección de constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico se realizó siguiendo la marcha fitoquímica general (Lock, 1994 y Bruneton, 2001). La preparación de reactivos utilizados en el tamizaje fitoquímico se especifica en el anexo 4:

### 3.5 METABOLITOS PRIMARIOS

#### 3.5.1 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS GRASOS

##### Ensayo de Sudán

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos; para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudán III o Sudán IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro indica la presencia de lípidos y/o aceites esenciales.

#### 3.5.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

##### A) *ENSAYO DE FEHLING*

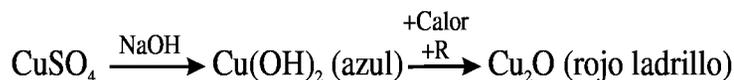
Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua, y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo, se calienta la mezcla en baño de agua durante 10-30 minutos. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

En medio alcalino, el cobre procedente del  $\text{CuSO}_4$  se encuentra en forma de hidróxido cúprico, y se forma la correspondiente sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Cuando el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (de color azul) se

---

<sup>15</sup> Otros términos que hacen referencia a lo mismo son marcha fitoquímica y *screening* fitoquímico.

calienta en presencia de un compuesto reductor se forma óxido cuproso (de color rojo ladrillo).



### ***B) ENSAYO DE MOLISH***

Detecta glúcidos en general, a 0.5 mL del extracto acuoso se le añaden 2 gotas de solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 10% y 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se forman dos capas. En caso de reacción positiva aparece en la interfase un anillo de color violeta.

### **3.5.3 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES**

#### Ensayo de ninhidrina

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua; si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta de 5 a 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando el extracto se torna de un color azul violáceo.

### **3.6 METABOLITOS SECUNDARIOS**

#### **3.6.1 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES**

##### ***A) ENSAYO DE DRAGENDORFF***

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides; si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado. Calentar suavemente y dejar enfriar, añadir 3 gotas del reactivo, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++) de color rojo ladrillo. En todos los casos indica presencia de alcaloides.

**B) ENSAYO DE MAYER**

Se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas del reactivo: si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado coposo (+++) de color amarillento indica que la reacción es positiva.

**C) ENSAYO DE WAGNER**

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. Un resultado positivo se indica por un precipitado marrón.

**3.6.2 DETERMINACIÓN DE QUINONAS**Ensayo de Bornträger

Permite reconocer en un extracto la presencia de antraquinonas y naftoquinonas. La alícuota del extracto debe encontrarse en cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo.

Las naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido de amonio forman complejos de color rojo.

**3.6.3 DETERMINACIÓN DE CUMARINAS**Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo el ensayo: como lactonas sesquiterpénicas, cardiotónicos, etc. El extracto debe ser etanólico, se adiciona 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo respectivamente.

**3.6.4 DETERMINACIÓN DE SAPONINAS**Ensayo de la espuma

Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como tri terpénico. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 2 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos.

### **3.6.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

#### **A) ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO**

Permite reconocer la presencia de taninos en un extracto vegetal. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 1% en solución salina fisiológica. Un resultado positivo puede dar la siguiente información:

\*Rojo vino → compuestos fenólicos en general.

\* Verde → taninos pirocatecólicos

\*Azul → taninos pirogalotánicos

Los derivados fenólicos se pueden identificar ya que el grupo hidroxilo unido a un anillo aromático forma un complejo con el Fe, cuyo color depende de la estructura del derivado fenólico

#### **B) ENSAYO DE SHINODA**

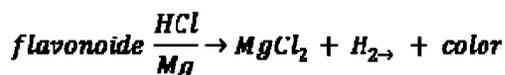
Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea. Dependiendo del tipo de flavonoide aparecerá una coloración diferente:

\*Anaranjado → flavonas

- \*Rojo → flavanonas
- \*Rojo azulado → flavonoles
- \*Violeta → flavonoles y xantonas

En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H<sub>2</sub>, que es eliminado en forma de gas y el MgCl<sub>2</sub>, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado.



### 3.6.6 DETERMINACIÓN DE IRIDOIDES

#### Ensayo de Trim y Hill

1 gramo de muestra se macera con 5ml de HCl 1% durante 3 a 6 horas. 0.1mL del macerado se decanta en un tubo que contenga 1ml del reactivo de Trim y Hill. El tubo es calentado durante un corto tiempo, si la reacción es positiva se produce una coloración azul a violeta rojizo.

### 3.7 IDENTIFICACIÓN DE IRIDOIDES

Luego de la marcha fitoquímica, se procedió a la evaluación de iridoides, debido a su importancia como marcador quimiotaxonómico dentro de la familia Rubiaceae y la existencia de antecedentes fitoquímicos.

La identificación de iridoides se realizó a partir de un extracto metanólico, según la NRSP 303. Se realizó cromatografía en capa fina (CCD) en placas de silica gel GF 254nm, se sembró 100µL, usando como fase móvil acetato de etilo- ácido fórmico- agua (80:10:10) v/v. Se midieron los R<sub>f</sub> de las manchas detectadas a luz UV/V 365nm, y se procedió a la realización de la cromatografía en escala preparativa (CEP), las fracciones obtenidas se eluyeron con MeOH, se centrifugaron y se filtraron. Las fracciones determinadas se analizaron por espectroscopia UV.

### 3.8 EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se evaluaron en función a dos clases diamétricas (tabla 4). Estas se definieron según el diámetro mínimo de corta (DMC) de capirona que es 42 cm.

Los ensayos físico-químicos fueron sometidos a una prueba de t de Student con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$  para analizar la diferencia entre medias de las clases diamétricas. La discusión de los resultados del tamizaje fitoquímico se hizo comparando los resultados observados por clase diamétrica. Los ensayos se definen a un nivel cualitativo (en función al color) y semi-cuantitativo (gradientes de intensidad del color).

**Cuadro 4** Esquema de la evaluación de resultados del estudio fitoquímico de corteza de capirona

RANGO	10 a 42 cm	43 a 90 cm
Genizas	#	#
Extractivos	#	#
Solubilidad	#	#
Flavonoides	x	x
Cumarinas	x	x
Saponinas	x	x
Antraquinonas	x	x
Azúcares	x	x
Iridoides	x	x

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

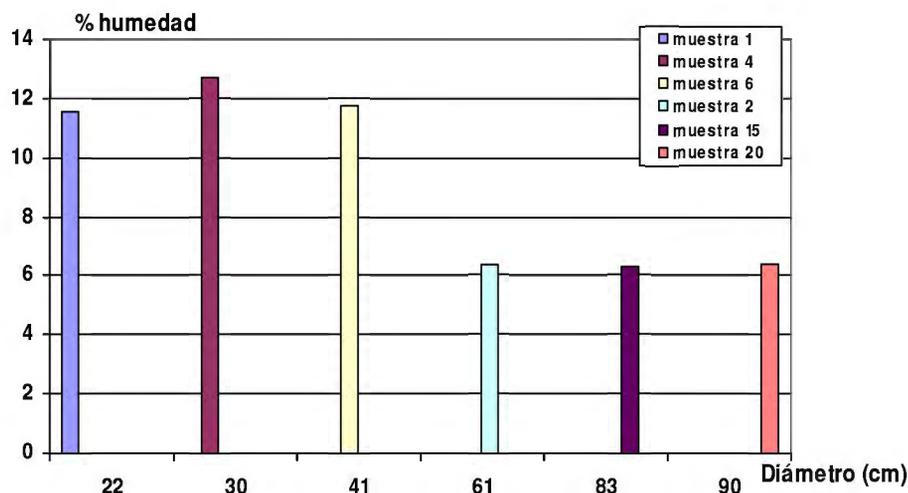
### 4.1 ENSAYOS DE HUMEDAD

Los resultados del ensayo de humedad gravimétrica se presentan en la tabla 5.

**Cuadro 5** Resultados ensayo de humedad gravimétrica

CLASE	MUESTRA	%HUMEDAD
I	1	11.56
	4	12.51
	6	11.71
Promedio		11.93
II	2	6.37
	15	6.30
	20	6.40
Promedio		6.36
t calculado		0.059
Región crítica		±4,489

Los valores de humedad según las clases diamétricas difieren, con muestras pertenecientes a la clase I, de una mayor humedad respecto a las muestras de la clase II (figura 13). Esto puede deberse a una desigualdad durante el secado, si bien todas fueron secadas en un mismo proceso, en la etapa de preparación de la muestra. Aunque todas las muestras fueron secadas en una sola operación, aunque la temperatura aplicada no fue homogénea en todo el horno, por lo tanto influyó en la variación de resultados. Sin embargo, al aplicar la prueba t de Student, con un nivel de significancia de 0,05 se determina que la diferencia entre ambas clases no es significativa.



**Figura 13 Resultados del ensayo de humedad gravimétrica**

Los valores de humedad aceptados por la Real Farmacopea Española para drogas vegetales dentro de los límites de 4 a 8%. Por lo tanto los valores encontrados para las muestras pertenecientes a la clase I serían rechazados según este parámetro.

## 4.2 ENSAYOS DE CENIZAS

El contenido total de cenizas expresa la cantidad de material inorgánico remanente luego de someter a la muestra a ignición. Las cenizas están compuestas principalmente en forma de: calcio, potasio, magnesio, sulfatos, fosfatos, carbonatos y silicatos. Por lo tanto, se puede decir que el contenido de cenizas en las plantas depende principalmente de la composición del suelo, ya que éste determina los procesos de nutrición mineral necesarios para el desarrollo vegetal.

En la tabla 6 se observan los resultados obtenidos para análisis de ceniza en corteza de capirona. La prueba de t de Student realizada determina que no existen diferencias significativas entre las clases evaluadas, De lo antes mencionado, al no haber influencia del diámetro, otros son los factores que podrían influenciar sobre la cantidad de cenizas:

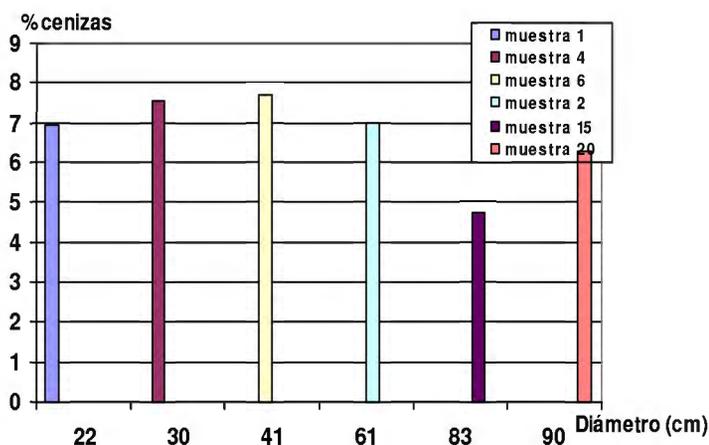
**Cuadro 6** Resultados ensayos de cenizas en capirona

CLASE	MUESTRA	%CENIZAS
I	1	6.94

	4	7.54
	6	7.67
Promedio		7.38
II	2	6.97
	15	4.72
	20	6.26
Promedio		5.98
Promedio total		6.68
T calculado		0.2189
Región crítica		± 3.5

El promedio total de cenizas fue 6.68%, mayor al valor reportado como promedio de cenizas en madera que es de 0.34%. (Gonzales *et al.*, 2001). Esto puede deberse a que la madera al ser aún un tejido fisiológicamente activo utiliza estas sustancias minerales en sus procesos metabólicos. Por su parte, la corteza es un tejido muerto en el que se acumulan diversas sustancias como los nutrientes minerales.

En la figura 14 se observa que, a pesar de la prueba estadística, en el porcentaje de cenizas totales hay una tendencia mayor en árboles de diámetros menores (clase I) frente a árboles de diámetros mayores (clase II). Aunque el diámetro puede ser un indicador de la edad del árbol, por los resultados obtenidos, la cantidad de cenizas es mayor en árboles jóvenes, probablemente debido a que tienen una mayor actividad biológica que los árboles adultos, lo que favorece la absorción y retención de una mayor cantidad de nutrientes.



### Figura 14 Resultados ensayo de cenizas corteza de capirona

En las drogas vegetales, según la Real Farmacopea Española, los valores permitidos oscilan entre 5-24%, pero los valores más frecuentes están entre 8-10%. Según esto, los porcentajes de cenizas encontrados en *C. spruceanum* se encontrarían dentro de los límites normales para drogas vegetales.

### 4.3 DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS

Los resultados de la determinación de extractivos se presentan en la tabla 7. La prueba de t de Student realizada concluye que no existen diferencias entre las clases evaluadas.

Cuadro 7 Resultados ensayo determinación de extractivos

I	1	19.453
	4	17.410
	6	20.132
	promedio	18.998
II	2	24.964
	15	25.946
	20	26.709
	promedio	25.873
Promedio total		21.444
t calculado		-2.82
Región crítica		±3.853

Se observa que el porcentaje de extractivos es mayor en las muestras de la clase II (figura 15) respecto a la clase I. Si consideramos que los individuos de la clase II son de mayor edad que los de la clase I, entonces podríamos decir que se justifican estos resultados. Árboles de mayor edad tendrían a acumular más metabolitos secundarios debido a que cuentan con un metabolismo menos activo que árboles jóvenes, que por el contrario sí necesitan de estas sustancias para su desarrollo.

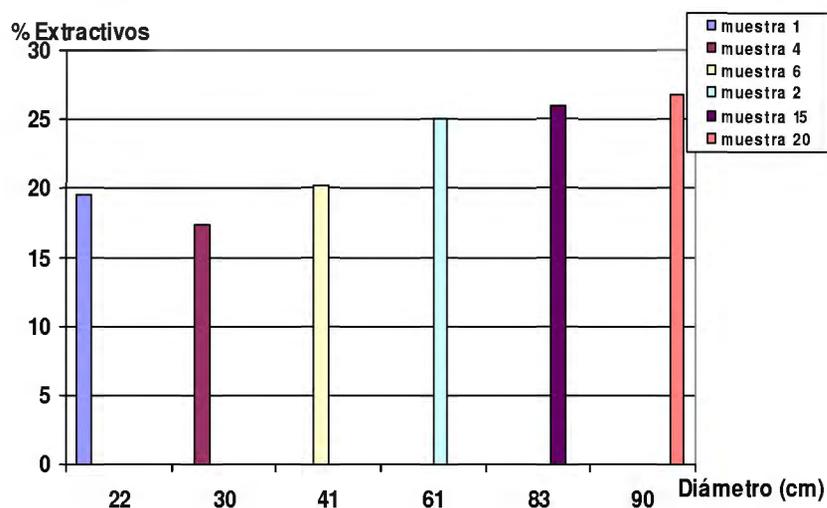


Figura 15 Resultado determinación porcentaje de extractivos corteza de capirona

#### 4.4 ENSAYO DE SOLUBILIDAD

El grado alcohólico donde se concentran la mayor cantidad de sólidos no fue variable entre las muestras evaluadas (tabla 7). Por tanto, el tamizaje fitoquímico se realizó con extractos hidroalcohólicos al 50%

Cuadro 8 Resultados del ensayo de solubilidad

CLASE	MUESTRA	%SOLUBILIDAD
I	1	50
	4	50
	6	50
II	2	50
	15	50
	20	50

#### **4.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

Los resultados del tamizaje fitoquímico se reflejan en la tabla 9. Los resultados se expresan con los siguientes símbolos:

Fuertemente positivo (+++)

Positivo moderado (++)

Positivo débil (+)

Negativo (-)

Cuadro 9 Resultados del tamizaje fitoquímico en corteza de *C. spruceanaum*

1	-	-	-	++	++	-	+	++	++	+++	-	++
2	-	-	-	++	++	-	+	++	++	+++	-	++
3	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	++
4	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
5	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
6	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
7	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
8	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
9	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
10	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
11	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	++
12	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	++
13	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
14	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
15	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
16	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
17	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
18	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
19	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+
20	-	-	-	+	++	-	+	++	++	+++	-	+

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado para *Calycophyllum spruceanum* determinan que los metabolitos secundarios presentes en la corteza de esta especie son: quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos. Asimismo reportamos la presencia de sustancias del metabolismo primario como azúcares libres y azúcares reductores en la corteza de esta especie.

No se encontraron diferencias en los resultados según clase diamétrica, lo que indica que ambas clases analizadas presentan el mismo perfil químico.

#### **4.5.1 METABOLITOS PRIMARIOS**

##### ***C) COMPUESTOS GRASOS***

El ensayo para compuestos grasos también dio negativo para todas las muestras analizadas. Lopez-Casamayor (2007) indica que generalmente los compuestos grasos están distribuidos en frutos y semillas vegetales donde suelen desempeñarse como materia de reserva principal, lo cual explicaría los resultados obtenidos. La acumulación de grasas no es frecuente en tejidos como la corteza (Salisbury, 2001), ya que esta no tiene la necesidad de compuestos que suministren energía, debido que al ser tejidos maduros no se encuentran en crecimiento.

##### ***D) AZUCARES***

Los resultados del ensayo de Fehling demuestran la presencia de azúcares reductores en la corteza de *C.spruceanum*. El ensayo de Molish también resultó positivo para todas las muestras analizadas, esto indica la presencia de glúcidos en la corteza de capirona. Ambos resultados reafirman la amplia distribución de estos compuestos en las plantas como resultado del proceso fotosintético y el papel que cumplen como fuente de energía.

##### ***E) AMINOACIDOS LIBRES***

Las muestras analizadas resultaron negativas para el ensayo de ninhidrina, lo cual indica que no se encontraron aminoácidos libres en los extractos analizados.

## 4.5.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

### F) ALCALOIDES

Todos los ensayos realizados para la determinación de alcaloides resultaron negativos, confirmando la ausencia de alcaloides en capirona descrita por Raffauf (1996). Se han reportado la presencia de alcaloides en distintas partes de la planta como en las hojas de *Uncaria tomentosa*, pero suelen estar más restringidos a las cortezas, como la quinina y raíces como es el caso de la nicotina. Por lo tanto, es muy probable que si estos no están presentes en la corteza, tampoco estén presentes en otras partes de la planta como hojas o raíces.

A pesar que los alcaloides indólicos constituyen un marcador quimiotaxonómico en Rubiaceae, ocurren mayoritariamente en la sub-familia *Cinchonoideae*. La capirona, sin embargo, pertenece a la sub-familia *Ixoroideae* (Bremer, 2009) lo cual podría explicar que no presente este tipo de metabolitos secundarios en su composición. Este resultado se debería respaldar con la utilización de técnicas de análisis más preciso.

La función de los alcaloides en la planta sigue siendo incierta, aunque parecen cumplir una función de defensa contra la herbivoría y de reserva de nitrógeno. (Harbone, 1999a)

### G) QUINONAS

Se comprobó la presencia de antraquinonas en la corteza de *C.spruceanum*. Según Lock (1994), este tipo de metabolito se encuentra frecuentemente en la corteza y en el duramen. El resultado fue positivo para el ensayo de Bortrager, observándose una coloración roja en la fase acuosa, debido a la ionización del grupo OH. Los resultados considerados como positivo moderado (++) se basaron la siguiente gradiente de color:

**Cuadro 10** Gradiente de colores ensayo Bortranger (Tabla: M.Prado)

+	++	+++
---	----	-----

Las antraquinonas son pigmentos de color rojo a morado, pero generalmente están enmascaradas por otros pigmentos, por ejemplo carotenoides y antocianinas, presentes en los tejidos vegetales. Según lo explicado, se comprende porque el color de la corteza de capirona no está definido por las antraquinonas. Las antraquinonas están ampliamente presentes en la familia Rubiaceae, por ejemplo: la alizarina en la raíz de *Rubia tinctorum* (Valencia, 1995) que

es usada como colorante, en las raíces de *Chiococca alba*, así como en los géneros *Gallium* y *Morinda* (Gazda, 2004)

#### **H) CUMARINAS**

El ensayo de Baljet resultó positivo debido a la presencia de un precipitado rojo, lo cual indica la presencia del anillo lactónico típico de las cumarinas.

Según Harborne (1999a), las cumarinas simples han sido reportadas en más de 100 familias; sin embargo, su presencia se restringe mayoritariamente a las siguientes familias: Umbelliferae, Rutaceae, Asteraceae, Moraceae, Solanaceae y Fabaceae. A pesar de que las cumarinas no son productos naturales encontrados frecuentemente en Rubiaceae, hasta el 2002 se han reportado 59 cumarinas para esta familia. (Campos y Coelho, 2002)

De otro lado, se hace necesaria una confirmación del resultado obtenido y una caracterización del metabolito encontrado, ya que el ensayo de Baljet también suele dar positivo para algunos compuesto lactónicos en general.

#### **I) SAPONINAS**

La presencia de saponinas fue positiva en todas las muestras, ya que se observó la persistente presencia de espuma. En las muestras analizadas, la altura de la espuma fue en promedio de 1cm (figura 16).



**Figura 16 Ensayo de la espuma (Foto: M.Prado)**

La presencia de saponinas es importante en las plantas porque protegen a la planta del ataque de insectos y moluscos, ya que son tóxicas para estos. (Harborne, 1999a) Además, las

saponinas están relacionadas con la formación de las hormonas vegetales (Lock 1994, Valencia 1995) y dado que esta planta está sometida a grandes condiciones de estrés, su ecología está relacionada con la dinámica de los ríos, se podría explicar su presencia en la planta.

Las Rubiáceas son conocidas por ser bioproductoras de saponinas y sapogeninas (Watson y Dallwitz, 2000). Como ejemplo podemos mencionar: las hojas de *Rudgea viburnoides* (Alves *et al.*, 2004), en las hojas de *Tocoyena brasiliensis* (Harmerski, 2005) y la corteza de *Uncaria tomentosa* que posee saponinas triterpénicas que tienen efectos antitumorales (Nagamoto, 1988).

### J) TANINOS

La presencia de taninos fue evidente en todas las muestras analizadas. Se observó una coloración verde negruzca luego de la aplicación del reactivo, lo cual indica la presencia de taninos catéquicos o condensados. Se consideró el resultado como un positivo evidente (+++) (figura 17), debido a que se notó un color verde oscuro, la gradiente de color utilizada se muestra en la tabla 11:



**Figura 17 Resultado ensayo FeCl3 (Foto: M.Prado)**

**Cuadro 11 Gradiente de color ensayo FeCl3 (Fuente: M.Prado)**

+	++	+++
---	----	-----

Debido a su sabor astringente, los taninos protegen a las plantas contra la herbivoría y el ataque de insectos, su presencia en la corteza de capiróna podría explicar por qué en esta especie no se

reportan agentes patológicos. La importancia de los taninos condensados radica en su capacidad antioxidante y posiblemente reducirían los riesgos de enfermedades cardiovasculares y cáncer. En Rubiaceae, encontramos taninos condensados en el fruto de *Morinda citrifolia* “noni” (Shu-chuan et al., 2007) y en la corteza de *Uncaria tomentosa* que presenta un alto poder antioxidante. (Gonçalves et al., 2005)

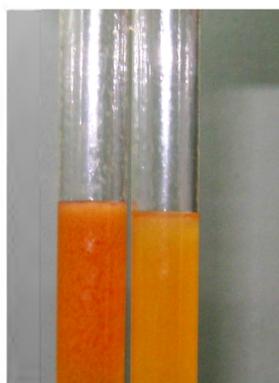
### **K) FLAVONOIDES**

El ensayo de Shinoda realizado nos indicó la presencia de flavonoides en el extracto, dando una coloración anaranjada. Al ser una reacción colorimétrica este ensayo nos permite identificar el tipo de flavonoide presente en la muestra, en este caso la presencia de flavonas.

La diferencia de calificativos entre muestras (figura 18) puede estar relacionada a la hora de la colección. Las muestras que mostraron una reacción poco evidente (++) fueron recolectadas en las primeras horas del día, de acuerdo con la OMS (1998), los metabolitos secundarios presentan *un ritmo de variación anual, estacional e incluso diario*. La escala de colores se muestra en la tabla 12, se considera una reacción evidente (+++) cuando se presenta una coloración naranja muy intensa:

**Cuadro 12** Gradiente de color ensayo de Shinoda (fuente: M.Prado)

+	++	+++
---	----	-----



**Figura 18** Ensayo de Shinoda (foto: M.Prado)

#### 4.6 IDENTIFICACION DE IRIDOIDES

Mediante CCD se identificaron 3 fracciones (figura 19 y figura 20). La fracción 1 presentó un  $R_f = 0.57$ , la fracción 2 un  $R_f = 0.68$  y la fracción 3 un  $R_f = 0.78$ .

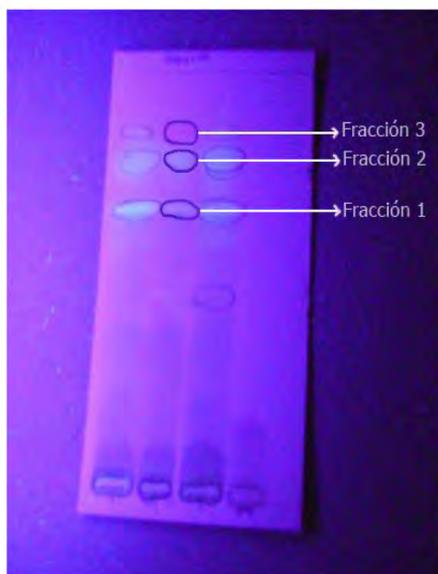


Figura 19 Fracciones obtenidas en CCD observadas a 360nm (Foto: M.Prado)

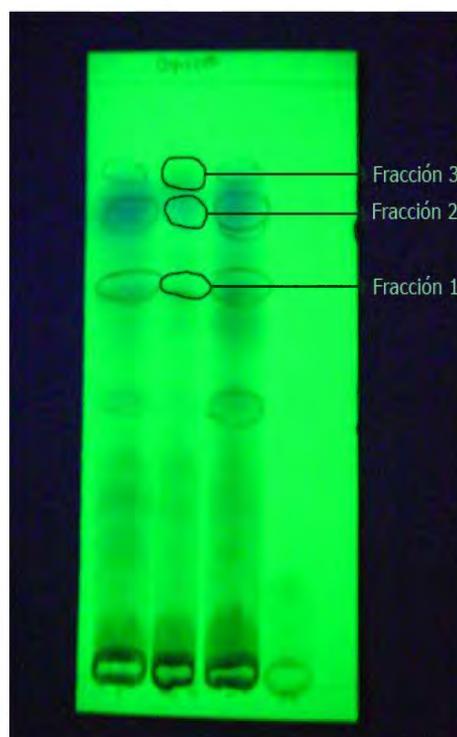
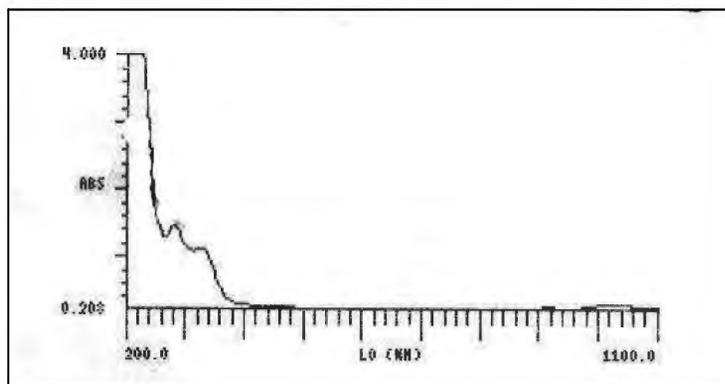


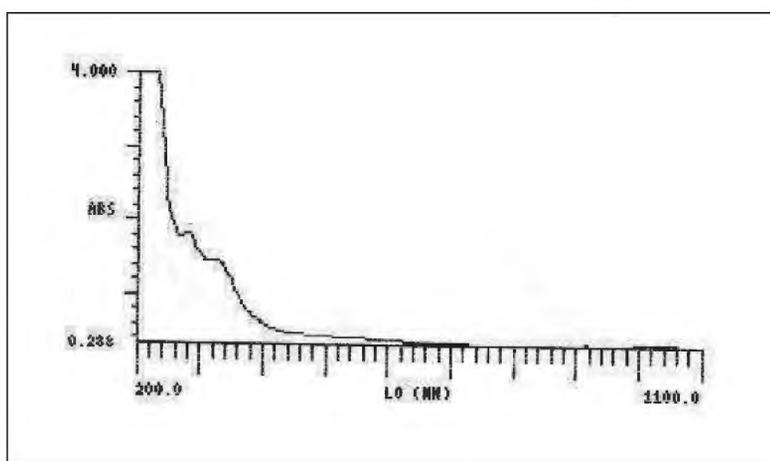
Figura 20 Fracciones obtenidas en CCD observadas a 254nm (Foto: M.Prado)

Mediante el uso de espectrometría UV se obtuvieron los siguientes espectros para cada fracción. La fracción 1 presenta dos bandas de absorción (figura 21), la primera entre 200 a 250 nm y la segunda entre 250 a 300nm. Las absorciones presentadas son típicas de los iridoides, como indica Zuleta (2003), el rango de absorción de estas sustancias varía entre 237 a 300nm.



**Figura 21 Espectro UV de la Fracción 1**

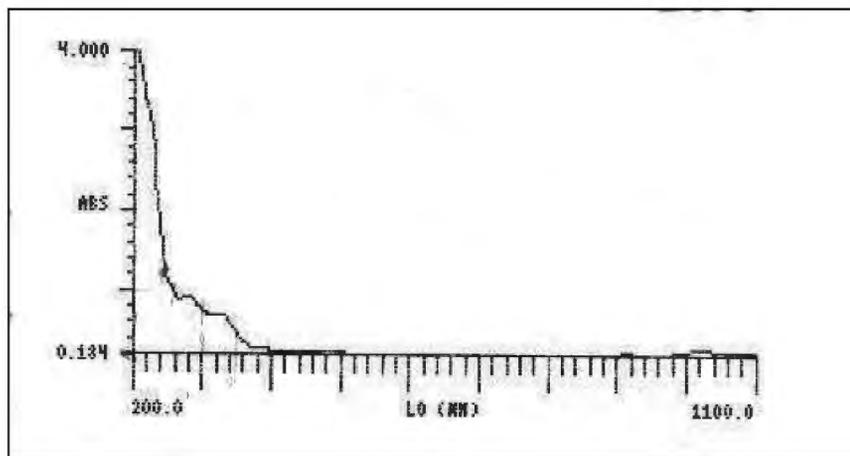
La misma fracción fue analizada agregando  $\text{AlCl}_3$  para comprobar si existía un desplazamiento del espectro obtenido. Sin embargo, este no cambió (figura 22), por lo tanto se puede afirmar que las estructuras analizadas no tienen OH libres, es decir serían iridoides y no seco-iridoides que son los que presentan el anillo piranósico abierto.



**Figura 22 Espectro UV fracción 1 con  $\text{AlCl}_3$**

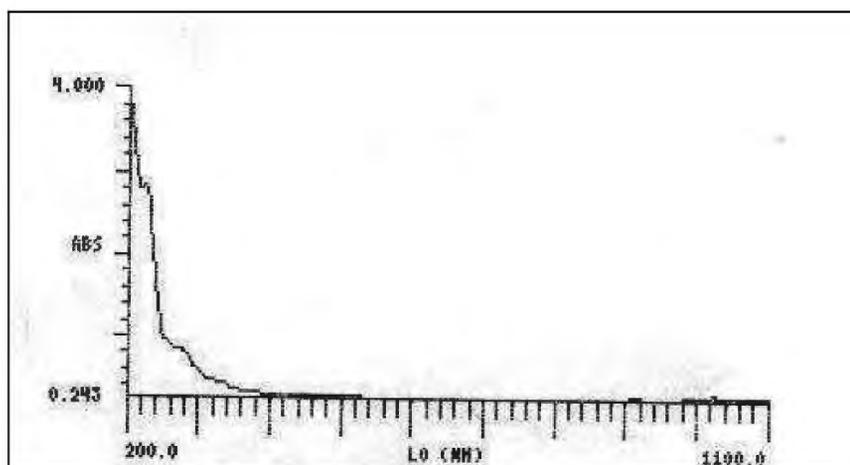
La fracción 2 presenta dos bandas de absorción (figura 23), ubicadas dentro del mismo rango que las absorciones encontradas en la fracción 1 e indicadas por Zuleta *et al.* (2003), es decir

entre 237-300nm. Sin embargo, el espectro difiere un poco respecto a la fracción 1, ya que podría tratarse de otro tipo iridoide presente en la corteza de capirona.



**Figura 23 Espectro UV fracción 2**

Por el contrario, la fracción 3 presentó un espectro UV muy diferente al de las dos fracciones anteriores (figura 24). Esta fracción presentó una absorción entre 200 a 210nm, además de la absorbancia entre el rango ya mencionado para iridoides. Esta absorbancia, es típica de iridoides que no presentan en su estructura un radical metoxicarBoniolo  $\text{CO}_2\text{CH}_3$  (Vercauteren, 2007)



**Figura 24 Espectro UV de la fracción 3**

## 5. CONCLUSIONES

- a) Metabolitos primarios: La detección de azúcares y azúcares reductores ha resultado positiva en todas las muestras.
- b) Se ha comprobado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios en la corteza de *Calycophyllum spruceanum*: lactonas, quinonas, flavonas, taninos pirocatecólicos e iridoides.
- c) La detección de alcaloides, compuestos grasos y aminoácidos libres ha resultado negativa en todas las muestras.
- d) Desde un punto de vista fitoquímico, no existen diferencias significativas entre los dos grupos evaluados, según las clases diamétricas.
- e) Se identificó la presencia de iridoides mediante el uso de espectrometría UV.

## 6. **RECOMENDACIONES**

- a) Ampliar el estudio fitoquímico realizado mediante la caracterización y cuantificación de los demás metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico que no fueron estudiados en la presente investigación.
- b) Realizar ensayos de actividad biológica y estudios toxicológicos.
- c) Evaluar la presencia de metabolitos secundarios de *Calycophyllum spruceanum* en otras partes del árbol como hojas, flores y frutos.
- d) Realizar estudios fitoquímicos con material botánico de otra procedencia para comprobar si existe una variación en los metabolitos secundarios según el lugar de origen.
- e) Realizar estudios sobre la regeneración de la corteza de capirona, de tal manera que se pueda evaluar si el aprovechamiento de ésta es factible sin alterar el desarrollo del árbol y la calidad de la madera.
- f) Confirmar la presencia de iridoides mediante el uso de otras técnicas como HPLC-DAD (detector de arreglo de diodos), FT-IR, RMN <sup>13</sup>C, RMN 1H, EMS, Rx, etc.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alves, R. Stehman, I. Brandao, M. 2004. Caracterización botánica e química de *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae). Revista brasileira de Farmacognosia 14 (1): 49-56
- Anaya, Ana Luisa. 2003. Ecología química. México, D.F. Plaza y Valdez 349p.
- Brack, Antonio. 1999. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Lima, PE. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas (CBC). 550 p.
- Brako, Lois. Zaruchi, James. 1993. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Missouri, US. Missouri Botanical Garden. 128 p.
- Bremer, Briggitta. Andreansen, Katarina, OLSSON, Daniel. 1995. Subfamilial and Tribal Relationships in the Rubiaceae Based on rbcL Sequence Data. Annals of the Missouri Botanical Garden 82 (3): 383-397.
- Bremer, Briggitta. Andreansen, Katarina, OLSSON, Daniel. 2000. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-ixoroideae: morphology, nuclear and Chloroplast DNA data. American Journal of Botany 87(11): 1731-1748
- Bremer, Briggitta. 2009. A review of molecular studies of Rubiaceae. Annals Missouri Botanical Garden 96: 4-26
- Brummit, R.K. 2007. Flowering plant families of the world. Londres, GB. Kew Royal Botanical Gardens. 424p.
- Bruneton, Jean. 2001. Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales. Título original: Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes medicinales. Primera edición. (Traducido al español por: Angel Villar). Zaragoza, ES. 594p.
- Campos, Claudia y Coelho, Maria Auxiliadora. 2002. Tendencias evolutivas de familias productoras de cumarinas em Angiospermae. Quim. Nova 25(4): 533-538, 2002
- Cardoso, Carmen. Silva, Dulce. Young, Maria. Gamboa, Ian. Bolzani, Vanderlan. 2008. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. Brazilian Journal of pharmacognosy 18(1): 26-29.
- De campos, Marilene. 2004. Pau-mulato-da-varzea (*Calycophyllum spruceanum*). Informativo técnico rede de Semetes da Amazônia, Nro 6, 2004. Universidade federal do Acre. Rio Branco, Brasil.
- Desmarchelier, Cristian y Schaus, Witting. 2000. Sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon. Lima, PE. 270p.

- Dos santos, José y Fleurentin, Jacques. 1990. *L'ethnopharmacologie: une approche pluridisciplinaire*. En: CABALION, P. *et al.* Ethnopharmacologie, sources, méthodes, objectifs. Société française d'ethnopharmacologie
- Duke, James. 2008. *Duke's Handbook of medicinal plants of Latin America*. Boca Raton, US. 901p.
- Espinoza-Garcia, Francisco. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: *Relaciones químicas entre organismos*. México, D.F. Plaza y Valdés editores. pp.231-250.
- Gazda, Valéria. 2004. *Abordagem Química e Estudo da Atividade Biológica das Raízes de Chiococca alba (L.) Hitchc. (Rubiaceae)*. Tesis Mg. Sc. Ciencias Farmaceuticas, Río de Janeiro, BR. Universidad Federal de Río de Janeiro. 164p.
- Gentry, Alwyn. 1996. *A field guide of the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador & Peru)*. Chicago, US. University of Chicago Press. 895 p.
- Gonçalves, Cristina. Dinis, Teresa. Batista, Maria Teresa. 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66 (2005) 89–98
- Gonzales, Enrique. Egoavil, Graciela. Chung, Pablo. Bueno, Jorge. 2001. Posibilidades de uso de especies tropicales para la industria papelera en el Perú. II Simposio Internacional de Ingeniería Química. Lima, PE.
- Hamerski, Lidilhone. Carbonezi, Carlos. Cavalheiro, José. Bolzani, Vanderlan. Young, Maria Claudia. 2005. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). *Quim. Nova*, 28 (4): 601-604.
- Harborne, Jeffrey. 1999a. *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. Londres, GB. Segunda edición. CRC Press. 976p.
- Harborne, Jeffrey. 1999b. *Classes and function of secondary products from plants*. Chapter 1 of: *Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products*. Londres, GB. World Scientific.
- IUPAC. 1997. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. [Consultado el 16 de junio de 2009]. Disponible en la World Wide Web: <http://goldbook.iupac.org>
- Jansen, S. 1999. Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. *Annals of botany*. 85:91-100
- Judd, Walter. Campbell, Christopher. Kellog, Elizabeth. Stevens, Peter. Donoghue, Michael. 2001. *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. Título original: *Plant*

systematics, a phylogenetic approach. Traducido por : Jules Bouharmont. Paris, FR. De Boeck Université. 488p.

Kloucek, P. Polensny, Z. Svobodova, B. Vlkova, E. Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology* 99 (2005) 309–312.

Lao, R. 1986. Descripción dendrológica de 51 especies forestales del Asentamiento Rural Forestal von Humboldt. Huánuco, PE. 100p.

Langenheim, J.H. 1984. The roles of plant secondary metabolites in wet tropical ecosystems. p 189-207. En: Medina, E. *et al.* Physiological ecology of plants of the wet tropics.

Leland, Cseke. Kirajosyan, Ara. Kaufman, Peter. arber, Sara. Duke, James. 2006. Natural products from plants. Second edition. Londres, GB. CRC Press. 611 p.

Lock de ugaz, Olga. 1994. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda edición. Lima, PE. Pontificia Universidad Católica del Perú. 213 p.

Lopez-Casamayor, Eloísa. 2007. Estudio fitoquímico y de aproximación genética en especies de la sección *Plinthine* del género *Arenaria*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, ES. 226p.

Nagamoto, N. 1988. Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *Planta Medica*, 43: 305-307.

Nalvarte, Jaime. 2003. Proyecto de conservación de bosques comunales en la Amazonia Peruana: plan de general de manejo forestal Comunidad Nativa Callería. Asociación para la investigación y el desarrollo integral (AIDER). Lima, PE. 84p.

NRSP (Normas ramales de salud pública de Salud Pública de Cuba). Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo NRSP: 309

NRSP (Normas ramales de salud pública de Salud Pública de Cuba). Determinación de aucubina. Métodos de ensayo NRSP: 303

OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Ginebra, CH. 122p.

Pinedo, Teodoro. Rengifo, Elsa. Cerruti, Teodoro. 1997. Plantas medicinales de la Amazonia Peruana, estudios de su uso y cultivo. Iquitos, PE. IIAP (Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana). 304p.

Pino, Delicia. Taylor, Charlotte. 2006. Rubiaceae endémicas del Perú. Revista peruana de biología 13(2): 586-599

Portillo, Aida. Vila, R. Freixa, B. Cañiqueral, S. 2001. Antifungal activity of paraguayean plants used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 76 (2001) 93-98.

Raffauf, Robert. 1996. Plant alkaloids: a guide to their discovery and distribution. Nueva York, US. Food product press. 279 p.

Raimondi, Antonio. 1857. Elementos de botánica aplicada a la medicina y a la industria en los cuales se trata especialmente de las plantas del Perú. Lima, PE. Escuela Nacional de Medicina. 2 tomos.

REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. 2005. Real Farmacopea Española. Tercera edición. 3398p.

Reynel, Carlos. Pennington, T. Pennington, R. Flores, C. Daza, A. 2003. Árboles útiles de la Amazonía peruana y sus usos: Un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Lima, PE. Darwin Initiative Project; ICRAF. 509p.

Robbrecht, Elmar. 2009. Monographic and systematic studies in Rubiaceae. National Botanical Garden of Belgium. [Consultado el 29 de junio de 2009]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>

Rosenthal, G & Berenbaum, M. 1991. Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. Segunda edición. Londres, GB. Academic Press. 468p.

Salisbury, Frank. 2000. Fisiología de las plantas. Título original: plant physiology. Traducido por: José Alonso. Madrid, ES. Thomson Editores Spain. 985p.

Singh, Gurgarachan. 2004. Plant systematic: an integrated approach. New Hampshire, US. Science Publishers. 561p.

Speight, Martin. Hunter, Mark. Watt, Alan. Southwood, Richard. 1999. Ecology of insects: concepts and applications. Londres, GB. Wiley- Blackwell. 350p.

Stevens, P.F. 2008. Angiosperm phylogeny Website. [Consultado el 27 de junio de 2009]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>

Shu-chuan, Yang. T. Tsui, Chen. Ken-yuon, Li. Tsun-chun, Tsai. 2007. Change in phenolic compound content, reductive capacity and ACE inhibitory activity in Noni Juice during traditional fermentation. Journal of Food and Drug Analysis, 15(3): 290-298

TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). Determinación de humedad gravimétrica. TAPPI T3-wd-77 .

TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). Determinación de extractivos en alcohol TAPPI T 12m-59

Taylor, Leslie. 2005. Mulaterio (*Calycophyllum spruceanum*). En: The healing power of Rainforest herbs. [Consultado el 27 de febrero de 2009]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.rain-tree.com/mulaterio.htm>.

Valencia, Ciria. 1995. Fundamentos de fitoquímica. México, DF. Editorial Trillas. 235p.

Vega, Mario. 2001. Etnobotánica de la Amazonia peruana. Editorial Abya Yala. Iquitos, Perú. 166 p.

Vercauteren, J. 2007. Plan du cours de pharmacognosie : drogues à iridoïdes. Université Montpellier I. Montpellier, FR. 31p

Ugent, Donald. Ochoa, Carlos. 2006. La etnobotánica del Perú: desde la prehistoria al presente. Lima, Perú. CONCYTEC. 380p.

Walhberg, Niklas. 2001. The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution*, 55(3): 522-537.

Watson, Leslie & Dallwitz, Michael. 1994. Rubiaceae Juss. The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification and information retrieval. URL: [Consultado el 16 de febrero del 2009] Disponible en la World Wide Web: <http://delta-intkey.com/angio/www/rubiacea.htm>

Zgorka, Grazyna. 2008. TLC of iridoids. En: Thin layer chromatography in phytochemistry. Editado por: Monika Waksmundzka-Hajnos *et al.* CRC Press. 874p.

Zuleta, Luz Margarita. Cavalheiro, Alberto. Silva, Dulce. Furlan, Maysa. Young, Maria Claudia. Alburquerque, Sergio. Castro-gamboa, Ian. Bolzani, Vanderlan. 2003. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 64 (2): 549-553.

## ANEXO 1. COORDENADAS DEL AREA DE MANEJO

Las coordenadas UTM del área de manejo son las siguientes según Datum WGS84:

Puntos	Este	Norte
PP1	553119	9102903
H1	553002	9102901
H2	552952	9103051
H3	553052	9103157
H4	553179	9103162
H5	553225	9103258
H6	553122	9103354
H7	552985	9103272
H8	552834	9103245
H9	552775	9103469
H10	552682	9103426
H11	552768	9103011
H12	552628	9103041
H13	552519	9103371
H14	552433	9103456
H15	552160	9103390
H16	551993	9103373
H17	551834	9103508
H18	551862	9103657
H19	551752	9103726
H20	551425	9103928
H21	551330	9104373
H22	551124	9104593
H23	551111	9104604
H24	551061	9104658
H25	550982	9104809
H26	550872	9105135

Puntos	Este	Norte
H27	550758	9105504
H28	550652	9105748
H29	550484	9105962
H30	550355	9106111
H31	550166	9106294
H32	549841	9106538
H33	549690	9106635
H34	549213	9106985
H35	548960	9107040
H36	548420	9108890
H37	548140	9109850
H38	547790	9110640
H39	547410	9111370
H40	546940	9112050
H41	546530	9112480
H42	545980	9112070
H43	546170	9111125
H44	546880	9111090
H45	547030	9104920
H46	548980	9103258
H47	549219	9102610
H48	549222	9102569
H49	549307	9102406
H50	549414	9102293
H51	549483	9102242
H52	549594	9102164
H53	549815	9101223

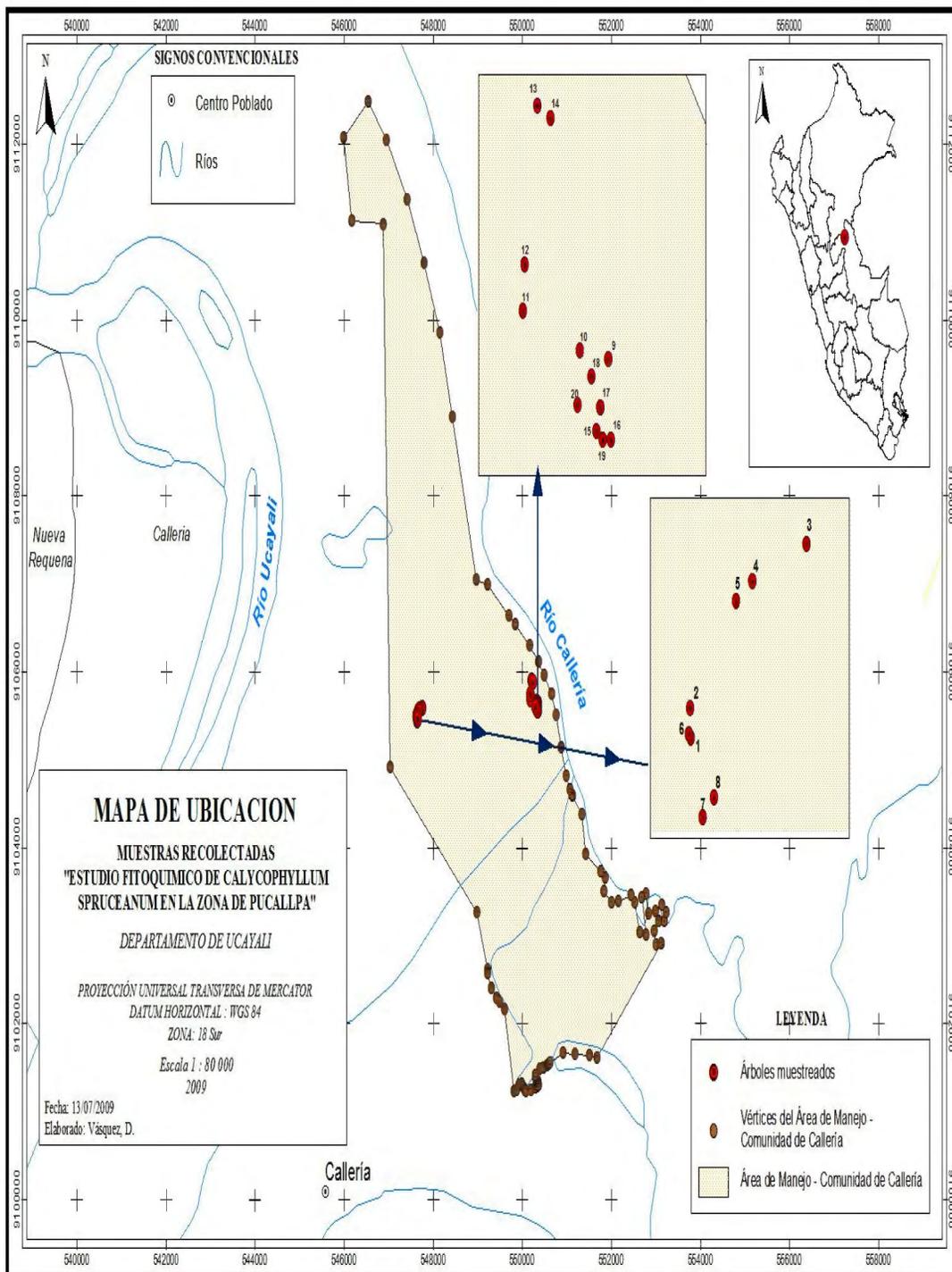
Puntos	Este	Norte
H54	549870	9101243
H55	549923	9101296
H56	549975	9101321
H57	550022	9101275
H58	550054	9101242
H59	550082	9101229
H60	550187	9101241
H61	550294	9101272
H62	550334	9101283
H63	550354	9101307
H64	550344	9101344
H65	550319	9101364
H66	550289	9101383
H67	550295	9101413
H68	550394	9101489
H69	550469	9101502
H70	550551	9101527
H71	550590	9101542
H72	550608	9101558
H73	550917	9101668
H74	551176	9101648
H75	551508	9101642
H76	551670	9101613
H77	553119	9102903

## ANEXO 2. COORDENADAS DE LAS MUESTRAS

I	1	22	547637	9105492	135
	3	39	547757	9105594	120
	4	30	547701	9105574	152
	6	41	547635	9105494	162
	9	41	550358	9105648	132
	13	22	550218	9105900	127
	17	40	550342	9105600	140
	18	38	550324	9105630	124
II	2	61	547636	9105508	120
	7	65	547649	9105450	177
	5	66	547684	9105564	132
	8	78	547690	9105566	156
	10	76	550302	9105656	140
	11	86	550190	9105696	140
	12	55	550193	9105742	124
	14	85	550244	9105888	128
	15	83	550334	9105576	119
	16	49	550363	9105568	160
	19	60	550346	9105568	110
	20	90	550297	9105602	142

**Fuente: ELABORACIÓN PROPIA**

### ANEXO 3. MAPA DE UBICACIÓN DE MUESTRAS RECOLECTADAS



## ANEXO 4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS A UTILIZAR EN LA MARCHA FITOQUÍMICA

1. Reactivo de Dragendorff:

Solución *a*: 8 g  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  / 20 mL  $\text{HNO}_3$

Solución *b*: 27.2 g KI / 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Mezclar, reposar, decantar supernadante. Diluir a 100 mL.

2. Reactivo de Mayer:

Solución *a*: 1.36 g  $\text{HgCl}_2$  / 60 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Solución *b*: 5 g KI / 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Mezclar y diluir a 100 mL.

3. Reactivo de Wagner:

1.27 g de  $\text{I}_2$  + 2g KI / 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Diluir a 100 mL.

4. Reactivo de Baljet:

Solución *a*: 1 g ácido pícrico / EtOH 95%

Solución *b*: 10 g NaOH / 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Mezclar ambas soluciones

5. Reactivo de Fehling:

Solución *a*: 35 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  / 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Solución *b*: 175 g sal de Rochelle + 50 g NaOH / 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$

6. Cloruro férrico:

*R*: 1 gota  $\text{FeCl}_3$  / 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$

*Ms* + 1 gota *R*

7. Reactivo de Borntrager:

*Ms* / *bz* + NaOH 5% aq.

8. Reactivo de Trim y Hill:

10 mL ácido acético + 1 mL 0.2%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 0.5 mL HCl concentrado