



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y POSIBLE
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DEL Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:

JOHN MARCOS QUISPILLO MOYOTA

RIOBAMBA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a Dios, a mis amados padres Carlos y Dolores, ya que ellos son quienes me trajeron a la vida, me han formado desde el día que nací hasta hoy, me han dado todo lo necesario para siempre poder cumplir las metas que he tenido, a mis hermanas Nancy y Mariana, a mi hermano Fernando, ya que ellos me han dado el ejemplo de superación día a día y siempre han estado apoyándome en todo aunque a veces a la distancia, a mis amigos que son parte mi vida y por supuesto de esta etapa.

A la Dra. Cumandá Játiva porque desde que fue mi maestra a compartido su conocimiento científico, me ha sabido aconsejar en cosas de la vida y a todos quienes permitieron que este sueño ya sea una realidad.

John Marcos Quispillo Moyota

AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios por brindarme la vida, y en ella todas las inolvidables experiencias.

Agradezco a mis padres, a mis hermanas y hermano, quienes son el pilar fundamental de todos mis logros en el estudio y en la vida misma, y mucho más en esta meta alcanzada.

Quiero agradecer a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, la cual me abrió las puertas del aprendizaje científico y humano.

Extiendo un agradecimiento profundo mi directora de tesis Dra. Cumandá Játiva, al miembro del tribunal Dr. Jacinto Mera, los cuales han sabido llevar adelante este trabajo de investigación, aportando con conocimiento técnico y científico, además con responsabilidad, virtudes y valores enmarcados en la ética humana.

No puedo dejar de lado agradecer a mis amigos que siempre me han dado su aliento, apoyo y ánimo para seguir adelante con todos los propósitos planteados y así a todas las personas que hicieron posible la culminación de esta tesis.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y POSIBLE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*)”, de responsabilidad del señor John Marcos Quispillo Moyota, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Iván Ramos DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Cumandá Játiva DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dr. Jacinto Mera MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS		-----

Yo, John Marcos Quispillo Moyota, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

JOHN MARCOS QUISPILLO MOYOTA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
Bu(OH)	Butanol
cm	centímetros
Cl₃CH	Cloroformo
Ce SO₄	Sulfato de cerio
Et(OH)	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
L	litro
Me(OH)	Metanol
m	Metros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mg/ mL	Miligramo por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por Millón
P/V	Peso por volumen
rpm	Revoluciones por minuto
V/V	Volumen por volumen
μL	Microlitros
μg	Microgramos
UV	Ultravioleta
TLC	Cromatografía de capa fina
CC	Columna cromatográfica
λ	Longitud de onda

INDICE

1. Marco teórico.....	- 1 -
1.1 Plantas medicinales.....	- 1 -
1.2 Principio activo.....	- 1 -
1.3 Metabolitos secundarios	- 2 -
1.4 Escobillón rojo (<i>callistemon speciosus</i>):	- 5 -
1.4.1 Taxonomía.....	- 5 -
1.4.2 Origen y distribución geográfica	- 5 -
1.4.3 Descripción botánica	- 6 -
1.4.4 Aplicaciones y usos	- 6 -
1.4.5 Composición química	- 7 -
1.5 Pruebas químicas preliminares	- 8 -
1.6 Marcha fitoquímica preliminar	- 9 -
1.7 Extracto.....	- 11 -
1.8 Métodos de extracción.....	- 12 -
1.9 Maceración	- 13 -
1.9.1 Descripción.....	- 13 -
1.9.2 Maceración en frío.....	- 14 -
1.9.3 Maceración con calor.....	- 14 -
1.10 Análisis fitoquímico	- 15 -
1.11 Tamizaje fitoquímico:	- 15 -
1.12 Cuantificación de taninos pirocatécolicos por permanganometría permanganato de potasio como valorante.....	- 16 -
1.4.2 Estandarización con oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$).	- 16 -
1.13 Cromatografía.....	- 18 -
1.13.1 Cromatografía en capa fina	- 20 -
1.13.1.1 Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina.....	- 20 -
1.13.1.2 Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina.....	- 21 -
1.13.1.3 Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.....	- 21 -
1.13.2 Cromatografía en placa preparativa.....	- 21 -

1.13.3 Cromatografía de columna.....	- 22 -
1.13.3.1 Procedimiento.....	- 23 -
1.13.3.2 Análisis de los eluatos de la columna.....	- 24 -
1.4 Espectroscopia ultra violeta.....	- 25 -
1.4.1 Fundamentos básicos de la espectroscopia uv-visible.....	- 25 -
1.14.2 Limitaciones de la ley de beer.....	- 25 -
1.14.3 Aplicaciones.....	- 27 -
1.14.4 Características.....	- 27 -
1.14.5 Métodos de medida.....	- 28 -
1.14.6 Materiales que se analizan.....	- 28 -
1.14.7 Consideraciones generales.....	- 29 -
1.14.8 Reglas de woodward - fieser.....	- 29 -
1.14.9 Resultados que se obtienen.....	- 30 -
1.15 Espectroscopia infrarroja.....	- 30 -
2. Parte experimental.....	- 32 -
2.1 Lugar de la investigacion.....	- 32 -
2.2 Recursos materiales.....	- 32 -
2.2.1 Recolección del vegetal.....	- 32 -
2.2.2 Equipos.....	- 32 -
2.2.3 Materiales.....	- 33 -
2.2.4 Reactivos.....	- 33 -
2.3 Factores de estudio.....	- 34 -
2.4 Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	- 34 -
2.5 Procesamiento de la materia prima.....	- 34 -
2.6 Preparación del extracto.....	- 34 -
2.6.1 Procedimiento.....	- 34 -
2.7 Evaluación de propiedades físicas y químicas del extracto etanólico (A).....	- 35 -
2.7.1 Determinación de los requisitos organolépticos.....	- 35 -
2.7.2 Determinación de los requisitos físicos.....	- 36 -
2.8 Cuantificación de taninos pirocatécolicos en el extracto etanólico (A), por permanganometría.....	- 37 -
2.9 Tamizaje fitoquímico del extracto eanólico (A).....	- 37 -

2.9.1 Ensayo de sudan	- 37 -
2.9.2 Ensayo de wagner	- 37 -
2.9.3 Ensayo de baljed	- 38 -
2.9.4 Ensayo de borntrager	- 38 -
2.9.5 Ensayo de espuma	- 38 -
2.9.6 Ensayo del cloruro férrico	- 38 -
2.9.7 Ensayo de shidona	- 39 -
2.9.8 Ensayo de rosentaler	- 39 -
2.10 Preparación de los subextractos.....	- 39 -
2.10.1 Procedimiento.....	- 40 -
2.11 Diagrama de extracción y fraccionamiento del escobillón rojo.....	- 41 -
2.12 Deparación y purificación de metabolitos del extracto y subextractos del escobillón rojo.....	- 42 -
2.13 Separación y purificación del extracto etanólico (A2).....	- 42 -
2.14 Separación y purificación del subextracto clorofórmico (B).....	- 42 -
2.14.1 Separación del subextracto clorofórmico en columna.....	- 42 -
2.14.2 Determinación cromatográfica de las fracciones de columna.....	- 43 -
2.15 Separación y purificación del subextracto butanólico (C).....	- 53 -
2.15.1 Diagrama del fraccionamiento del subextracto butanólico (C).....	- 53 -
2.16 Fragmentación del subsubextracto toluénico (C1) en columna.....	- 53 -
2.16.1 Determinación cromatográfica de las fracciones de columna del subsubextracto toluénico.....	- 54 -
2.16.2 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 1, 2.1, 2.2, 3, 4 y 5.....	- 54 -
2.16.3 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 1, 2.1, 2.2..	- 55 -
2.16.4 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 6, 7, 8.1, 9.1, 10.1 y 11.....	- 56 -
2.16.4 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 6, 7, 8.1, 9.1, 12, 13.1 y 14.1.....	- 56 -
2.16.5 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 8.1, 8.2, 9.2, 14.2.....	- 57 -
2.16.6 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 15.1, 16.1, 17, 18.1, 19.1, 20.1 y 21.1.....	- 57 -
2.17 Separación y purificación del subsubextracto metanólico (C2).....	- 58 -

2.17.1 Verificación de la pureza de las franjas obtenidas de la placa preparativa del subsubextracto metanólico.	58 -
2.17.2 Verificación de la pureza de las franjas obtenidas de la placa preparativa de la banda 3.....	59 -
2.17.3 Verificación de la pureza de las franjas obtnidas de la placa preparativa de la banda 3.2.....	59 -
2.18 Placas de las cromatografías en capa fina (tlc) y columna cromatográfica (cc).....	61 -
2.18.1 Placa cromatográfica del extracto etanólico a2 y de los subextractos clorofórmico (B) y butanólico (C).....	61 -
2.18.2 Placa cromatográfica del subextracto clorofórmico (B).....	61 -
2.18.3 Separación del subextracto clorofórmico en columna (cc1).....	62 -
2.18.4 Placas cromatográficas de las fracciones del subextracto clorofórmico (B).-	62 -
2.18.5 Separación de la fracción 9 del subextracto clorofórmico en columna (cc2).-	68 -
-	
2.18.6 Placas cromatográficas de las fracciones de la fracción 9 del subextracto clorofórmico (B).....	68 -
2.18.7 Placas cromatográficas del subextracto butanólico (C) y del subsubextracto toluénico (C1).....	72 -
2.18.8 Placas cromatográficas del subsubextracto metanólico (C2).....	76 -
2.19 Análisis espectrofotométrico del subextracto clorofórmico, subsubextracto toluénico y subsubextracto metanólico.....	78 -
3. Resultados y discusiones	80 -
3.1 Análisis de la especie vegetal	80 -
3.1.1 Comprobación taxonomica e identificación botánica	80 -
3.1.2 Estudio macromorfológico del vegetal.....	80 -
3.2 Obtención del extracto etanólicos, subextracto clorofórmico y subsub extractos toluénico y metanólico.....	81 -
3.3 Análisis de los extractos	81 -
3.3.1 Determinación de las características organolépticas y físicas del extracto etanólico.	81 -
3.3.2 Análisis fisicoquímicos cualitativo mediante reacciones de caracterización. .-	82 -
3.3.3 Cuantificación de taninos pirocatécolicos por permanganometría en el extracto etanólico (A).....	83 -

3.4 Separación y purificación de metabolitos secundarios del escobillón rojo (<i>callistemon speciosus</i>).....	83 -
3.4.1 Separación y purificación del extracto etanólico (A2).....	83 -
3.4.2 Separación y purificación del subextracto clorofórmico (B).....	83 -
3.4.3 Separación y purificación del subextracto butanólico (C).....	84 -
3.5 Posibles estructuras dadas por espectroscopia uv	86 -
3.5.1 Flavonoides.....	86 -
3.5.2 Cumarinas.....	90 -
3.5.4 Esteroles	91 -
4. Conclusiones.....	92 -
5. Recomendaciones	95 -
6. Resumen.....	96 -
7. Bibliografía	98 -

INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1	Componentes identificados en los tres estados de Venezuela, en comparación con los resultados reportados para la especie estudiada en Australia.....	- 7 -
Tabla No. 2	Técnicas cromatográficas.....	- 18 -
Tabla No. 3	Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides.....	- 29 -

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Ejemplar de escobillón rojo ubicado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.....	- 5 -
Figura No. 2	Marcha fitoquímica preliminar.....	- 10 -
Figura No. 3	Definición de Rf.....	- 19 -

INDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1	Equipos.....	- 32 -
Cuadro No. 2	Materiales.....	- 33 -
Cuadro No. 3	Reactivos.....	- 33 -
Cuadro No. 4	Determinación del peso de los extractos.	- 40 -
Cuadro No. 5	Fracciones obtenidas del subextracto B, según el eluyente utilizado.....	- 43 -
Cuadro No. 6	Absorbancias y longitudes de onda de la fracción 12 determinadas por espectroscopia UV.	- 47 -
Cuadro No. 7	Fracciones obtenidas según el eluyente utilizado en la microcolumna de la fracción 9.	- 49 -
Cuadro No. 8	Absorbancias y longitudes de los cristales formados por las fracciones 2, 3 y 4, obtenidas por espectroscopia UV.....	- 51 -
Cuadro No. 9	Absorbancias y longitudes de la fracción 2 obtenidas por espectroscopia UV.	- 52 -
Cuadro No. 10	Fracciones obtenidas según el eluyente utilizado en la columna cromatográfica del subsubextracto toluénico.....	- 54 -
Cuadro No. 11	Absorbancias y longitudes de onda de las bandas 4 y 5 de la placa preparativa de la fracción 1, obtenidas por espectroscopia UV....	- 56 -
Cuadro No. 12	Absorbancia y longitudes de onda de los cristales de la fracción 9.2 obtenidas por espectroscopia UV.....	- 57 -
Cuadro No. 13	Absorbancias y longitudes de onda de la banda 2, obtenidas por espectroscopia UV.....	- 58 -
Cuadro No. 14	Absorbancias y longitudes de onda de las bandas 3.1 y 3.3, obtenidas por espectroscopia UV.....	- 59 -
Cuadro No. 15	Absorbancias y longitudes de ondas de las bandas 3.2.1 y 3.2.2, obtenidas por espectroscopia UV.....	- 60 -
Cuadro No. 16	Longitudes de onda y absorbancias de los compuestos aislados, obtenidas por espectroscopia UV.....	- 78 -
Cuadro No. 17	Características organolépticas y físicas del extracto etanolico.....	- 81 -
Cuadro No. 18	Tamizaje Fitoquímico.....	- 82 -

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades; aun en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quieren precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.⁶

En busca de ampliar el conocimiento de los vegetales con los que cuenta nuestro territorio, así también tomando en cuenta lo importante que es el saber la composición química de los mismos, y mediante el conocimiento que se tiene en el área de farmacognosia y fitoquímica, la presente investigación, busco determinar la composición química del *Callistemon speciosus*, especie de la familia *Myrtaceae* de gran interés como planta ornamental y medicinal por su alto contenido de aceites esenciales en sus hojas. Lo encontramos en el territorio ecuatoriano; para lo cual se procedió a la separación, purificación y posible identificación de los metabolitos secundarios del vegetal.¹⁰

Es importante recalcar que en los estudios realizados con anterioridad, nos indican únicamente datos del aceite esencial y la actividad del mismo, mas no existen datos específicos de los metabolitos secundarios que presenta el *Callistemon speciosus*, haciéndose mucho más importante su estudio, ya que así se podrá especificar la composición química y el adecuado uso del mismo.

De esta manera el principal objetivo planteado es realizar la separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del Escobillón rojo (*Callistemon speciosus*). Así también identificar taxonómicamente al vegetal, posterior a esto elaborar los extractos y subextractos del Escobillón rojo, también se busca separar y purificar los metabolitos secundarios por procesos cromatográficos, presentes en los extractos y

subextractos obtenidos. Y por último realizar la posible identificación de los metabolitos secundarios encontrados.

Mediante la presente investigación fue posible la separación y purificación de algunos de los metabolitos secundarios presentes en el Escobillón rojo, mediante fraccionamiento del extracto, subextractos y subsubextractos con solventes orgánicos, aplicando técnicas cromatográficas como capa fina, columna cromatográfica, y placa preparativa, posterior a esto se realizó el análisis espectrofotométrico ultravioleta, que permitió establecer las estructuras de algunos compuestos aislados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

Son todas aquellas plantas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general.²⁶

Se calcula en unas 260.000 las especies de plantas que se conocen en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar plantas medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia, modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso.²⁶

Evidentemente, sobre todo en las regiones ecuatoriales, la proporción de especies de plantas medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora.²⁶

Las plantas medicinales recorren prácticamente toda la nomenclatura botánica desde las plantas herbáceas como la hierba buena hasta los árboles como el aguacate y el mango, encontrándose las sustancias con efectos terapéuticos en todas las partes de la planta.²⁶

En Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía. .¹⁹

1.2 PRINCIPIO ACTIVO

El principio activo es la sustancia que posee acción farmacológica sobre determinadas dolencias o enfermedades mitigando sus efectos o resolviendo su curación.²⁷

Es el producto orgánico derivado de la biosíntesis de la planta y puede ser una sustancia simple o compleja en dependencia de la ruta metabólica que haya dado su resultado a partir de la fotosíntesis.²⁷

Puede estar formando parte de las sustancias de reservas de la planta (carbohidratos), cumplir funciones específicas dentro del funcionamiento orgánico del vegetal (enzimas) o ser producto final que se excreta por órganos específicos como los frutos o las flores (aceites esenciales,) o por zonas específicas como la epidermis (gomas y resinas).²⁷

Estará localizado en tejidos determinados o distribuido por toda la planta lo que influirá en la técnica extractiva para su dosificación y conservación (infusión, decocción, maceración).²⁷

1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Una de las características de los seres vivos es la presencia de actividad metabólica. El metabolismo no es nada más que el conjunto de reacciones químicas que ocurren al interior de las células. En el caso de las células vegetales, el metabolismo acostumbra a ser dividido en primario y secundario.²³

Se entiende por metabolismo primario al conjunto de procesos metabólicos que desempeñan una función esencial en el vegetal, tal como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de solutos. Los compuestos involucrados en el metabolismo primario poseen una distribución universal en las plantas.²³

Ese es el caso de los aminoácidos, de los nucleótidos, de los lípidos, carbohidratos y de la clorofila.²³

En contrapartida el metabolismo secundario origina compuestos que no poseen una distribución universal, pues no son necesarios para todas las plantas.²³

Como consecuencia práctica, estos compuestos pueden ser utilizados en estudios taxonómicos (quimiosistemática). Un ejemplo clásico son las antocianinas y betalainas, las

cuales no se ven conjuntamente en una misma especie vegetal. Las batalainas son restringidas a diez familias de plantas, pertenecientes al orden de las *Caryophyllales* que consecuentemente no poseen antocianinas.²³

Más allá que el metabolismo secundario no siempre sea necesario para que una planta complete su ciclo de vida, el desempeña un papel importante en la interacción de las plantas con el medio ambiente.²³

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas está comprendido dentro de los llamados Productos naturales o Metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas, que los llamados metabolitos primarios; estos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente. De los primeros, Productos naturales o Metabolitos secundarios, podemos decir que son indispensables en las plantas que ocurren; no intervienen o quizás, mejor dicho, no se ha descubierto aun una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados artículos de lujo en la planta.⁶

En este contexto, los metabolitos secundarios vegetales presentan un gran valor desde el punto de vista social y económico.²³

Del total de medicamentos aprobados entre el 83 al 94, el 6% eran obtenidos directamente de especies vegetales y ese número continuó creciendo hasta los días de hoy.²³

Desde el punto de vista económico se puede mencionar los alcaloides indólicos terpenoidicos vincristina (utilizado en el tratamiento de la leucemia) y vinblastina (usado en la terapia de corio-carcinoma y en la enfermedad de Hodgkins).²³

Como estimación, cerca de 110.000 compuestos han sido identificados hasta el presente, siendo que de este total los terpenoides constituyen el mayor grupo (33.000 compuestos), seguidos por los alcaloides (16.000 compuestos).²³

Anualmente 4.000 nuevos compuestos de origen vegetal han sido relatados con una tendencia al crecimiento para este valor.²³

Como característica general, tales compuestos muestran un padrón de aparición restringido en algunos grupos taxonómicos, no siendo considerados esenciales para el metabolismo basal de la célula vegetal, donde surge la denominación de metabolitos secundarios.²³

En el ámbito de la interacción planta/ambiente (efecto atractivo/repulsivo a microorganismos, insectos, vertebrados, plantas, etc.), desempeñan un importante papel, garantizando la supervivencia de las especies en el ecosistema.²³

Adicionalmente, metabolitos secundarios son utilizados en escala industrial para la producción de insecticidas, colorantes, saborizantes, aromatizantes y medicamentos.²³

Con respecto del alto valor económico de algunos de estos biofármacos, bajos niveles de productividad han sido usualmente encontrados en los sistemas de producción agrícola convencionales, ocurriendo por una serie de motivos.²³

Este hecho genera la necesidad de desarrollar sistemas alternativos de producción y en este contexto el cultivo de células y tejidos vegetales ha sido considerado como un sistema de alto potencial para la superación de este problema; más allá que se presentan algunas dificultades a su viabilidad económica que aún no han sido superadas.²³

En función de esto, diversas estrategias han sido empleadas objetivando aumentar los valores de productividad de compuestos bioactivos en sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales incluyendo la manipulación epigenética la elucidación de vías biosintéticas y la aplicación de técnicas de biología molecular, según un abordaje de ingeniería de vías metabólicas.²³

En general los metabolitos primarios y secundarios pueden tener actividad biológica determinada: medicinal, toxica, alimenticia; puede tener aplicación casera o industrial en síntesis, es necesario conocer los vegetales de nuestro país y darles un uso adecuado, una

producción sustentable y sostenible; aprovechar y disfrutar de los recursos que la naturaleza nos ofrece.²

1.4 ESCOBILLÓN ROJO (*Callistemon speciosus*):

El nombre del género es la combinación de los términos griegos “kallos” = belleza y “stémon” = estambre; el nombre de la especie es, en latín “speciosus” = bello.¹¹

1.4.1 TAXONOMÍA

1.4.1.1 Nombre científico: *Callistemon speciosus*.

1.4.1.2 Nombre común: escobillón rojo, hisopo, isopo, calistemo, calistemon y cepillo, gusanillo, limpiatubos (español); Albany bottlebrush, swampbottlebrush (inglés); rince-bouteilles (francés); panacheiro (portugués); zylinderputzer (alemán).^{9,25,29}

1.4.1.3 Familia: Myrtaceae.^{9,29}

FIGURA No. 1 EJEMPLAR DE ESCOBILLÓN ROJO UBICADO EN LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.



FUENTE: John Quispillo

1.4.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es un arbusto perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual incluye unas 2800 especies que predominan en los países cálidos; cultivada en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; originario de Australia y Tasmania. Se adapta bien entre los 1000 y los 2500 m.s.n.m. en zonas húmedas. No es caducifolio. Crecimiento medio. Requiere libre exposición solar. Tolerancia a suelos pobres, secos y algo de salinidad. De longevidad

prolongada, esta familia está constituida principalmente por árboles y arbustos, actualmente se describen más de 30 especies de *Callistemon*. Los *callistemon* fueron introducidos por primera vez en Europa como plantas ornamentales por Joseph Banks en 1789.^{5,10,11.}

1.4.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto perennifolio, erecto y compacto, es una planta de porte pequeña a mediana que puede alcanzar hasta los 8 m de alto. Presenta un tronco más o menos recto y de aproximadamente 13 cm diámetro, con ramas erguidas y las ramillas jóvenes sedosopelosas; corteza rugosa, agrietada o papirácea, de tonalidad oscura.¹⁵

Hojas de 2,5-11 cm x 4-10 mm, alternas, cortamente pecioladas, gruesas, rígidas, de color verde oscuro, de lineares a elípticas, de ápice con punta estrecha, con nerviación y márgenes prominentes y abundantes glándulas esenciales.¹⁵

Inflorescencias de 5-15 x 2,5-7 cm, en espigas densas, con ejes pelosos.

Flores hermafroditas, actinomorfas, con 5 sépalos y 5 pétalos verdosos; filamentos libres, de alrededor de 2-2,5 cm de longitud, de color rojo brillante, con anteras amarillas; estilo ligeramente más largo que los estambres.¹⁵

Estambres con los filamentos libres o ligeramente unidos en la base, de 2,5 cm de largo, de color rojo intenso, rara vez blancos, con las anteras amarillas..¹⁵

Fruto de 5,5-7 (10) mm de diámetro, tipo cápsula, cupuliforme, serotino (permanece sobre la rama durante mucho tiempo). Florece a mediados de primavera-verano.¹⁵

1.4.4 APLICACIONES Y USOS

El gran interés de esta especie para su uso en parques, avenidas y jardines, desde el punto de vista ornamental; pero el *Callistemon speciosus* tiene aplicaciones terapéuticas importantes, por su composición química, semejantes a las de *Eucaliptus globulus*, como broncodilatador, expectorante y antiséptico.¹¹

1.4.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En estudios anteriores realizados en Australia, Egipto y Brasil sobre el aceite esencial de *Callistemon speciosus*, se encontró como componente mayoritario al 1,8-cineol en un 57,7% (Australia), 37,7% (Egipto) y 81,5% (Brasil).^{8,12.}

En un estudio comparativo de los aceites esenciales de *Callistemon speciosus* DC. recolectado en los Estados Carabobo, Lara y Mérida (Venezuela), se obtuvo un rendimiento de aceite esencial de 0,92% para el *C. speciosus* recolectado en Carabobo, mientras que en la especie del Estado Lara se obtuvo un rendimiento de 0,86% de aceite y solo un 0,46% para la especie recolectada en Mérida.^{8,12.}

TABLA No. 1 COMPONENTES IDENTIFICADOS EN LOS TRES ESTADOS DE VENEZUELA, EN COMPARACIÓN CON LOS RESULTADOS REPORTADOS PARA LA ESPECIE ESTUDIADA EN AUSTRALIA.

Compuesto	Estructura	Carabobo (%)	Lara (%)	Mérida (%)	Australia (%)	TR (min)	K
α -tujeno		-	-	1,40	-	4,68	931
α -pineno		5,83	8,41	17,43	2,7	4,85	932
β -pineno		0,41	0,54	0,73	6,3	5,82	984
α -felandreno		0,35	-	6,30	0,1	6,43	1002
ρ -cimeno		-	-	8,20	-	6,69	1031
limoneno		3,13	3,74	4,34	8,5	7,08	1040
1,8-cineol		68,59	71,05	43,31	57,7	7,21	1042
linalol		0,71	0,36	2,52	0,3	9,09	1097
α -terpineol		15,51	12,95	10,64	6,7	11,95	1198

TR: Tiempos de Retención determinados por CG-EM en columna HP-5.
K: Índices de Kovats determinados por CG en columna HP-5.

FUENTE: REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES MÉRIDA - VENEZUELA,

El componente mayoritario en todos los aceites esenciales resultó ser el 1,8-cineol o eucaliptol, siendo más abundante en la especie recolectada en el Estado Lara (71,05%), que en los Estados Carabobo (68,56%) y Mérida (43,31%).^{8,12.}

Aparte de este estudio se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de *Duranta triacanta*,

Callistemon speciosus y *Tagetes minuta*, en los Laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, realizado por la señorita Rosa Ana Uvidia Ortiz, para la obtención de su título de Bioquímico Farmacéutico en el año 2012.

Siendo importante para este caso lo referente al *Callistemon speciosus*, se tiene que el extracto etanólico se obtuvo por maceración de toda la planta y fue concentrado en rotavapor. Los subextractos se extrajeron en embudo de separación con una alícuota del extracto etanólico y éter etílico inmiscible, la fase superior es el éter. Se procedió igual con el cloroformo, la fase inferior es el cloroformo; se eliminó los solventes y se tuvo los subextractos.

Por reacciones de coloración o precipitación se comprobó la presencia de aceites esenciales, flavonoides y terpenoides en los extractos etanólicos. Utilizando el método de Mitscher se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

A 10.000 µg/mL, el extracto etanólico del *Callistemon speciosus* es parcialmente activo para *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; a 1.000µg/mL el extracto etanólico de *Callistemon speciosus* es activo para *S. aureus* y *C. albicans*.

El subextracto etéreo del Cepillo inhibe *S. aureus* y *C. albicans*, el subextracto clorofórmico es parcialmente activo para *S. gallinarum* y *K. pneumoniae*.

1.5 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

En estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 1000 gr, y orientarse a identificar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. Los métodos pueden ser:⁴

- a) Histológicos, o sea, observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados etc.
- b) Químicos, tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etc.
- c) Fisicoquímicos, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo, etc.
- d) Biológicos, ver el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupo de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etc..⁴

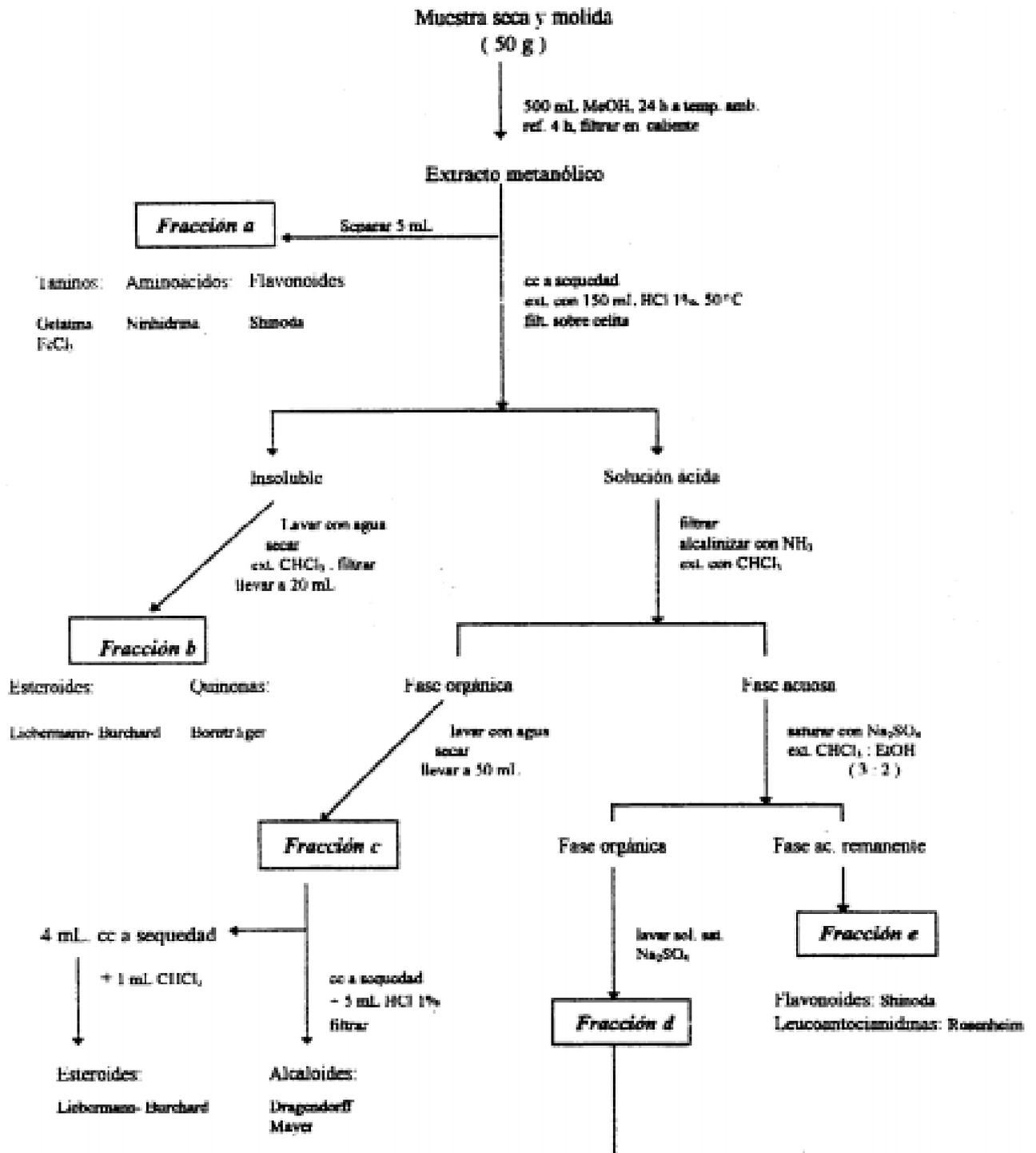
En la práctica es ventajoso utilizar varios de estos métodos, procurando que no falte el biológico. Hay numerosas investigaciones sobre condiciones óptimas para estudios preliminares Farnsworth ha presentado un cuidadoso compendio de ellas. En todos los casos se recomienda verificar el comportamiento de los reactivos y la reproductividad de limitaciones de las técnicas, mediante el empleo de sustancias y extractos testigos. Debe recordarse que una técnica es válida solo si se conoce la especificidad de la reacción.

Entre menor es el número de sustancias que dan positiva la prueba y son más parecidas, mayor es la especificidad y la sensibilidad de esta prueba, la que se caracteriza por los valores de su límite de identificación (mínima cantidad de sustancia determinable bajo condiciones de la prueba) y su límite de concentración (máxima dilución del compuesto en que todavía la prueba es positiva).⁴

1.6 MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos, basándose en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración. A continuación se presenta un esquema para la determinación de alcaloides, saponinas, flavonoides, antraquinonas, triterpenos y/o esteroides, etc. (Fig. 2).⁶

FIGURA No. 2 MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR



1.7 EXTRACTO

Los extractos son preparaciones de consistencia líquida (extractos fluidos y tinturas) o semisólida (extractos blandos o densos), o sólida (extractos secos), obtenidos a partir de drogas vegetales o tejidos animales en estado generalmente seco.¹⁸

Existen diferentes tipos de extractos. Los extractos ajustados se encuentran dentro de una tolerancia aceptable sobre el contenido de constituyentes con conocida actividad terapéutica.¹⁸

Los extractos estandarizados se logran por ajuste del extracto con sustancias inertes o mezclando lotes de extractos.¹⁸

Los extractos cuantificados son ajustados a un definido rango de constituyentes. Los ajustes se hacen mezclando lotes del extracto o añadiendo material específico.¹⁸

Otros extractos son esencialmente definidos por su proceso de producción (estado de la droga vegetal o tejido animal a ser extraído, por el solvente, por las condiciones de extracción) y sus especificaciones.¹⁸

Los extractos son preparados por métodos apropiados usando etanol u otro solvente adecuado. Pueden ser mezclados diferentes lotes de droga vegetal o tejido animal previo a la extracción. La droga vegetal o tejido animal a ser extraído debe someterse a un tratamiento preliminar, por ejemplo, inactivación de enzimas, molienda o trituración. Además, las materias indeseables deben ser eliminadas antes de la extracción.¹⁸

Las drogas vegetales, tejido animal y solvente orgánico usado para la preparación de extractos cumplen con cualquiera de las farmacopeas. Para los extractos densos y secos donde el solvente orgánico es eliminado por evaporación, puede usarse solvente recuperado o reciclado, siempre que el procedimiento de recuperación sea controlado y monitoreado para que el solvente cumpla los patrones apropiados antes del rehúso o mezclado con otros materiales aceptados.¹⁸

Donde sea aplicable, la concentración para lograr la consistencia se logra utilizando métodos adecuados, como son la presión reducida y a una temperatura a la cual el deterioro de los constituyentes es reducido al mínimo.¹⁸

Los aceites esenciales que hayan sido separados durante el proceso pueden ser repuestos al extracto en una etapa apropiada en el proceso de manufactura. Los excipientes utilizados se pueden adicionar en diferentes etapas convenientes del proceso de manufactura por ejemplo, mejorar la calidad tecnológica tal como la homogeneidad o consistencia. Los estabilizadores y preservativos antimicrobianos también pueden ser adicionados.¹⁸

La extracción con un solvente dado conduce a las proporciones típicas de un constituyente caracterizado en la materia extraíble. No obstante durante el proceso de estandarización y cuantificación, se pueden aplicar procedimientos de purificación para incrementar estas proporciones con respecto al valor esperado, tales extractos se refieren como “refinados”.¹⁸

1.8 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para lograr una concentración adecuada de los principios activos contenidos en las plantas y que su acción sea más efectiva es necesario realizar diversos procedimientos mediante los cuales sean extraídos aquellos con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias beneficiosas.²⁴

Los métodos de extracción permiten obtener los productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende.²⁴

Estas preparaciones son conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, densos o secos (según su contenido de líquidos) y las tinturas. Son conocidas también como preparados galénicos, en honor a Claudio Galeno precursor de la preparación de medicamentos a partir de los vegetales.²⁴

Las farmacopeas han incluido dentro de sus especificaciones regulaciones con fundamento científico para garantizar la calidad de estos preparados, los cuales no precisan de un

control tan exacto como los medicamentos oficiales, pero deben observarse algunos cuidados en cuanto a la conservación y tiempo de almacenamiento.²⁴

Es preferible su uso inmediato dado la facilidad de su elaboración y estar disponibles en cualquier momento a partir de la planta medicinal.²⁴

Previo a los tratamientos de extracción la planta debe limpiarse con cuidado para evitar contaminaciones con otras plantas o partículas mecánicas ajenas al objetivo que es la extracción de las sustancias utilizando un solvente adecuado al cual llamaremos menstro.²⁴

Estas extracciones se diferencian de las soluciones verdaderas en que están presentes sustancias en suspensión. Los principales métodos de extracción son:

- Maceración
- Percolación
- Digestión
- Infusión
- Decocción.²⁴

1.9 MACERACIÓN

Es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.²²

En la maceración, el agente extractante (la fase líquida) suele ser agua, pero también se emplean otros líquidos como vinos, jugos, alcohol o aceites aderezados con diversos ingredientes que modificarán las propiedades de extracción del medio líquido.²²

1.9.1 DESCRIPCIÓN

La maceración consiste principalmente en dejar la planta sumergida en un disolvente durante un lapso más o menos largo. En general, en herbolaria se utiliza este método cuando la planta contiene principios activos que se perderían o se modifican cuando se les expone a un calor excesivo o cuando el disolvente pudiera alterarse por lo mismo. Un producto de la maceración es la tintura, que se prepara dejando las plantas desmenuzadas

o cortezas reducidas a polvos en alcohol fino o vino tinto dentro de una botella cerrada herméticamente. Para la maceración de las plantas en vino y en alcohol deben usarse botellas o recipientes con cierre hermético. Durante el tiempo de maceración, que varía según la planta usada, debe agitarse suavemente al menos una vez al día durante 30-50 segundos.²²

Existen, básicamente, dos tipos de maceración:

1.9.2 MACERACIÓN EN FRÍO

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la menor cantidad de líquido posible, sólo lo suficiente como para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se hace por un lapso más o menos largo, dependiendo de lo que se vaya a macerar.²²

La ventaja de la maceración en frío consiste en que de usarse solo agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda su esencia sin alterarla en lo más mínimo.²²

1.9.3 MACERACIÓN CON CALOR

El proceso a ejecutar en este tipo de maceración es el mismo que en la maceración en frío, sólo que en este caso puede variar el medio por el cual se logra la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso tomando como referencia que 3 meses de maceración en frío, es igual a 2 semanas en maceración con calor, esto es en el caso de las plantas y hierbas medicinales.²²

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente puro la esencia del producto a macerar ya que siempre quema o destruye alguna pequeña parte de estas, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles.²²

Muchas veces, para acortar más los tiempos de extracción y que las sustancias pasen el menor tiempo posible a elevadas temperaturas, se hacen extracciones con corriente de vapor.²²

1.10 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo en las plantas medicinales, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (UV, IR, RMN, EM). (Tabla 2) .⁶

1.11 Tamizaje Fitoquímico:

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.²⁸

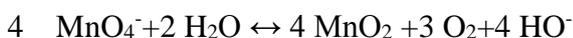
El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico.²⁸

Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción anti-inflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. La presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a la descartación de la planta por su alta toxicidad.²⁸

1.12 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA PERMANGANATO DE POTASIO COMO VALORANTE.



Las soluciones de KMnO_4 son de color tan intenso que una sola gota de solución 0,02 N da color perceptible a 100 ml de agua, el KMnO_4 es su propio indicador, es inestable, es capaz de oxidar espontáneamente al agua, además del hecho de que la materia orgánica lo reduce.



La velocidad de esta reacción es muy lenta, está catalizada por luz, calor, ácidos, bases, sales de Mn^{++} y por el propio MnO_2 . Por lo tanto, todo el MnO_2 deberá ser eliminado. Antes de estandarizar la solución, deberá dejarse que transcurra la reacción del KMnO_4 con la materia orgánica del agua (calentando para acelerar la reacción de descomposición y dejando en reposo para que coagule el MnO_2 inicialmente coloidal); luego se separará de la solución el MnO_2 por filtración a través de un tapón de asbesto en un crisol o en un embudo Buchner con filtro de lana de vidrio o a través de un embudo filtrante de vidrio sinterizado, pero nunca por papel de filtro, que puede ser causa de más descomposición del KMnO_4 .

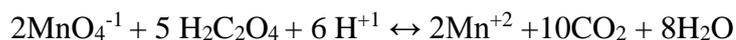
Las soluciones de KMnO_4 deben permanecer en frascos oscuros, mantenerse lejos de la luz o contaminación de polvo, las soluciones de concentraciones mayores a 0,02 N, cuando se preparan y conservan como se acaba de describir, son estables durante muchos meses.

Preparación de permanganato de potasio 0.01N

$$\frac{0.01 \text{ eq KMnO}_4}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol KMnO}_4}{5 \text{ eq}} \times \frac{158.03 \text{ g KMnO}_4}{1 \text{ mol}} \times 1 \text{ L} = 0.316 \text{ gKMnO}_4$$

1.4.2 ESTANDARIZACIÓN CON OXALATO DE SODIO ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$).

Se dispone de este reactivo comercialmente en estado muy puro, se disuelve en medio ácido sulfúrico, formándose ácido oxálico no disociado.



El mecanismo por el cual transcurre esta reacción es extraordinariamente complicado, y sólo se obtienen resultados analíticos reproducibles y estequiométricos cuando se satisfacen ciertas condiciones empíricas:

Debe valorarse a unos 70 °C para favorecer la velocidad de reacción. A medida que avanza la reacción, el valorante reacciona cada vez con mayor rapidez, hasta que la reacción se vuelve prácticamente instantánea, constituyendo un proceso auto catalítico, en el cual uno de los productos de la reacción funciona como un catalizador, se forman complejos de oxalato de Mn(III).

Preparación de la solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$:

$$\text{PM} = 133.9 \text{g/mol Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{masa} = \frac{\text{PM}}{2}$$

$$\text{masa} = \frac{133.9 \text{g/mol}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{2} = 66.96 \text{ Eqq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}$$

$$\# \text{Eqq Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 = 66.96$$

$$\# \text{meqq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4} = 0.06696$$

$$\# \text{Eqq KmNO}_4 = \# \text{Eqq Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$N_A \times V_A \times \text{meqB} = \text{g B}$$

$$0.01 \times 26 \times 0.06696 = \text{g B Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{g B} = 0.017 \text{ g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

1.13 CROMATOGRAFÍA

TABLA No. 2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

I.	De extracción	En soxhlets. Maceración. Percolación. Arrastre de vapor. Fluido supercrítico.
II.	De separación y purificación	
	Cromatografía en papel CP	Ascendente CPA Descendente CPD Circular CPC Preparativa CPP
	Cromatografía de capa delgada, CCD	Analítica CCD Preparativa CCDP Bidimensional CCDB
	Cromatografía líquida (de columna; CC)	Adsorción Partición Exclusión Flash Al vacío Intercambio iónico Alta performance, HPLC
	Cromatografía en contra corriente, CCC	A la gota (DCCC) Alta velocidad (HSCCC)
	Cromatografía gas-líquida, CGL	
	Electroforesis	
III.	De determinación estructural	
	Espectrométricas	Ultravioleta-visible, UV-Vis Infrarrojo, IR Resonancia magnética nuclear De protón y de carbono-13 RMN-H RMN-C De masa, EM
	Rayos X	
	Reacciones de coloración y de precipitación	
	Propiedades físicas	

FUENTE: LOCK O., Manual de Fitoterapia, Fondo Editorial PUCP, 1994

Se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas:

sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor).¹³

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.¹³

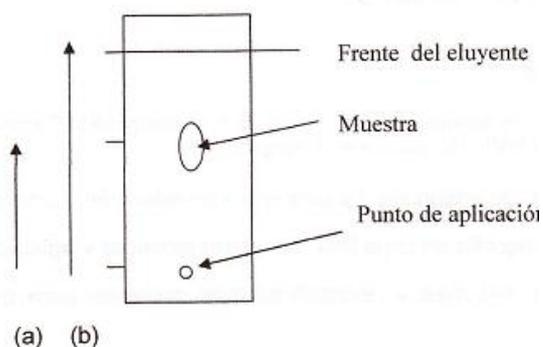
Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de absorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.¹³

Concepto de Rf:

Rf es el registro, es una relación de distancias, y se define como.¹³

FIGURA No. 3 DEFINICIÓN DE Rf

Rf = (a) distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación
(b) distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.



FUENTE: www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografiaThin.htm#historia

El valor de Rf depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de +/- 20%, por lo que es mejor correr duplicados de la misma Placa.¹³

1.13.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes.¹³

En la cromatografía en capa fina (ccf), el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado. El adsorbente se coloca en forma de una capa delgada adherida sobre un soporte rígido, que pueden ser placas de vidrio, aluminio o poliéster. Los tamaños de la placa para ccf. convencional son: 20 x 20; 10 x 20 y 5 x 2 cm.¹³

Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos, se requerirán otras técnicas de revelado.¹³

Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina

- éter de petróleo
- cloruro de metileno
- n-hexano
- acetato de etilo
- ciclohexano
- acetona
- tolueno
- iso-propanol
- dietil-éter
- etanol
- t-butil-éter
- metanol
- cloroformo
- ácido acético.¹³
-

1.13.1.1 Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina.

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante:¹³

a) Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F_{254} ó F_{366}), el número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado".¹³

- b) La introducción de la placa en vapores de yodo.¹³
- c) El rocío con una solución de agua/H₂SO₄ 1:1 (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases). Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero, hasta carbonizar los compuestos.¹³

1.13.1.2 Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina.

- a) Gel de sílice (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- b) Oxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra o básica)
- c) Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- d) Poliamidas.¹³

Para la selección del adsorbente deber tomar las siguientes consideraciones:

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| a) Polaridad | d) Área Superficial |
| b) Tamaño de partícula | e) Homogeneidad |
| c) Diámetro | f) Pureza. ¹³ |

1.13.1.3 Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.

- a) Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- b) La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corrientes de aire.
- c) Limpieza de las placas. Muchas placas están contaminadas con grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Para el trabajo a pequeña escala, éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar secar completamente antes de aplicar la muestra.
- d) Pureza de los disolventes.¹³

1.13.2 CROMATOGRAFÍA EN PLACA PREPARATIVA.

La cromatografía preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 100-200 mg.

En la superficie del adsorbente (gel de sílice), mediante una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y se introduce la placa en posición vertical en una cubeta. Durante la elución debe permanecer tapada para evitar la evaporación del disolvente, y para que todo el ambiente sea semejante. Una vez que se han separado los productos que componen la muestra, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con ayuda de una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Una vez transferido a un erlenmeyer se añade un disolvente en el cual sea soluble el producto, se filtra el gel de sílice y una vez eliminado el disolvente tenemos el producto puro.¹³

1.13.3 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.

En la cromatografía de columna las moléculas de una mezcla son separadas en base a la afinidad de las moléculas por la fase estacionaria o por la fase móvil. Si una molécula A tiene más afinidad por la fase estacionaria que la B, B bajará más rápido que A. Existen muchos tipos de cromatografía de columna.¹⁴

A. Filtración en gel: En esta las moléculas son separadas por su tamaño. El gel consiste de una cama de esferas con poros de un tamaño dado. El gel se conoce como sefadex, el cual viene con poros de distintos tamaños. Las moléculas de igual o menor tamaño que el poro entran a las esferas mientras que las moléculas más grandes pasan rápidamente por la columna. Las moléculas de tamaño intermedio pueden entrar las esferas pero pasan menos tiempo en ellas. Las moléculas salen en orden de tamaño por el eluido. Hay que usar otras pruebas para determinar qué fracciones contienen las muestras de interés, las cuales suelen ser proteínas. Estas pruebas pueden ser mediciones fotométricas, SDS-PAGE o ensayos enzimáticos. Una vez tenemos identificadas las fracciones con las muestras, podemos hacer un "profile" de elución con concentración en Y y el volumen de elución en X. El volumen inicial es el "void volume" de la columna. Lo que contiene es un amortiguador que estaba dentro de la columna al empezar. Las moléculas más grandes salen inmediatamente después. El material que se escoja para la fase estacionaria dependerá del tipo de muestra que estemos corriendo. Cada tipo de gel presenta poros de distinto tamaño.¹⁴

B. Intercambio iónico: Se usa para purificar proteínas. Separa moléculas en base a su carga iónica. La fase estacionaria presenta una matriz con carga. Al eluir una muestra, las moléculas de igual carga salen con el amortiguador. Las moléculas de carga opuesta se adhieren al material de empaque con distintos grados de afinidad. Para desprender las proteínas adheridas se usa una solución alta en cloruro de potasio o de sodio. Esto puede hacerse usando soluciones con incrementos moderados de salinidad, o de un solo paso, echando la solución de mayor concentración de sal primero. Al subir la concentración poco a poco podemos recolectar las muestras desde las que menos afinidad por la columna tiene hasta las de mayor afinidad. Durante la elución, la sal va compitiendo con la proteína por las cargas de la matriz de la columna, hasta que la desprende. La columna puede ser de matriz negativa (intercambio catiónico) o positiva (intercambio aniónico). El tipo de empaque dependerá de qué queremos aislar. En este tipo de columna el pH es importante porque puede alterar la carga de la columna.¹⁴

C. Fase inversa: Esta es una cromatografía de interacción en la que la fase estacionaria, con moléculas hidrofóbicas, interactúa con moléculas hidrofóbicas en la muestra. La matriz consiste de fibras de silicato con cadenas de hidrocarburos. Estas atraerán a las moléculas hidrofóbicas de la muestra mientras que las hidrofílicas salen con el amortiguador. Las moléculas son eluidas de la columna lavando con soluciones de distinta concentración de alcohol o cualquier otro solvente no polar.¹⁴

1.13.3.1 Procedimiento.

La cromatografía en columna utiliza una columna de vidrio vertical que se llena con un soporte sólido adsorbente (fase estacionaria: los más utilizados son gel de sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3)). La muestra que se quiere separar se deposita en la parte superior de este soporte. El resto de la columna se llena con el eluyente (disolvente que constituye la fase móvil) que, por efecto de la gravedad, hace mover la muestra a través de la columna. Se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el disolvente eluyente que fluye por la columna. Debido a que cada uno de los componentes de una mezcla establecerá interacciones diferentes con la fase estacionaria y la móvil, serán transportados a diferentes velocidades y se conseguirá su separación. Así, de manera similar a otros tipos de cromatografía, las diferencias en las velocidades de desplazamiento

a través del medio sólido se corresponden con diferencias en los tiempos de elución por la parte inferior de la columna para cada uno de los componentes de la muestra original, que se recogerán en fracciones diferentes.¹⁴

La polaridad del eluyente afecta las velocidades relativas con las que los diferentes componentes de la mezcla se mueven en la columna. Los disolventes polares compiten más eficientemente con las moléculas polares de una mezcla por los lugares polares del adsorbente. Por lo tanto, un disolvente polar desplazará las moléculas, incluyendo las más polares, rápidamente a través de la columna. Si el disolvente es muy polar la elución será muy rápida y generalmente habrá poca separación de los componentes de la mezcla. Si por el contrario el disolvente es muy apolar, no eluirán los compuestos de la columna. Por lo tanto, la elección del eluyente es crucial para el éxito de la cromatografía en columna. A menudo se utiliza un gradiente creciente de polaridad para la elución. La CCF se utiliza para determinar y elegir el sistema solvente adecuado para cada separación.¹⁴

En 1978 se introdujo una versión modificada denominada cromatografía en columna rápida. La diferencia con la cromatografía en columna tradicional es que en la técnica rápida el disolvente se hace atravesar la fase estacionaria aplicando una presión positiva. Esto hace que las separaciones mejoren en resolución y se pueda disminuir el tiempo de elución, por lo cual constituye un método de elección.¹⁴

1.13.3.2 Análisis de los eluatos de la columna.

Si los compuestos separados en una cromatografía en columna son coloreados, el progreso de la separación se puede monitorizar visualmente. No obstante, a menudo los compuestos que deben ser aislados suelen ser incoloros. En este caso, se recogen secuencialmente pequeñas fracciones de eluatos en tubos rotulados y la composición de cada fracción se analiza por cromatografía en capa fina. Una vez identificadas las diferentes fracciones que contienen el mismo producto, se reúnen, se elimina el disolvente y se analiza la identidad de los componentes por métodos espectroscópicos.¹⁴

1.4 ESPECTROSCOPIA ULTRA VIOLETA.

1.4.1 FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LA ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La longitud de onda comprende entre 160 y 780 nm.¹⁷

La absorción de radiación UV-visible por una especie se da en 2 etapas:

- Excitación electrónica
- Relajación. Puede ser por:
 - Emisión de calor
 - Reacción fotoquímica
 - Emisión de fluorescencia / fosforescencia.¹⁷

Las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas.¹⁷

La excitación corresponde a los electrones de enlace, por ello los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces. Por este motivo la espectroscopia UV-visible es válida para identificar grupos funcionales en una molécula.¹⁷

1.14.2 LIMITACIONES DE LA LEY DE BEER

Con frecuencia se encuentran desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de la absorbancia y la concentración cuando b es constante. En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan cambios químicos asociados con cambios de concentración; las dos últimas son conocidas a veces como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente.¹⁷

a) *Limitaciones propias de la ley de Beer:*

La ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas; en este sentido es una ley límite. A concentraciones altas (generalmente $>0.01M$), la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula

altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Un efecto similar se encuentra, a veces, en medios que contienen concentraciones de absorbente bajas pero concentraciones altas de otras especies, especialmente electrólitos. La estrecha proximidad de los iones al absorbente altera la absorptividad molar de éste por interacciones electrostáticas; el efecto se reduce mediante dilución.¹⁷

Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 0.01M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones. Por ejemplo, se ha comprobado que la absorptividad molar del catión del azul de metileno en disoluciones acuosas a 463nm aumenta un 88% cuando la concentración del colorante aumenta de 10^{-5} a 10^{-2} M; incluso por debajo de 10^{-6} M no se observa un cumplimiento estricto de la ley de Beer.¹⁷

b) Desviaciones químicas:

Cuando un analito se disocia, se asocia o reacciona con un disolvente para dar lugar a un producto con un espectro de absorción diferente al del analito, se producen desviaciones de la ley de Beer. Las disoluciones acuosas de los indicadores ácido-base son un ejemplo característico de este comportamiento. Por ejemplo, el cambio de color asociado con un indicador tipo HIn se produce como consecuencia de los cambios en el equilibrio.¹⁷

c) Desviaciones instrumentales originadas por la radiación policromática:

El cumplimiento estricto de la ley de Beer sólo se observa cuando la radiación es realmente monocromática; esta observación es otra manifestación aun del carácter límite de la ley. Desafortunadamente, en la práctica es raro el uso de radiación restringida a una sola longitud de onda debido a que los dispositivos que aíslan porciones de la señal de salida de una fuente continua generan una banda de longitudes de onda más o menos simétrica en torno a la deseada.¹⁷

d) Desviaciones instrumentales originadas por la radiación parásita:

La radiación que emerge del monocromador suele estar contaminada con pequeñas cantidades de radiación dispersada o parásita, la cual alcanza la rendija de salida como resultado de dispersiones y reflexiones en varias superficies internas. La radiación parásita, con frecuencia difiere sustancialmente en su longitud de onda de la radiación principal, y además, puede no haber atravesado la muestra.¹⁷

Cuando las medidas se hacen en presencia de radiación parásita, la absorbancia observada viene dada por.¹⁷

$$A' = \log[(P_o + P_s)/(P + P_s)]$$

Donde P_s es la potencia de radiación parásita no absorbida.¹⁷

Cuando las concentraciones y los caminos ópticos son elevados, la radiación parásita puede causar desviaciones significativas en la relación lineal entre la absorbancia y el camino óptico.¹⁷

1.14.3 APLICACIONES

Análisis cualitativo:

El disolvente empleado influye en las posiciones de los máximos, los polares desplazan a mayor longitud de onda. Las mediciones de absorción son útiles para descubrir la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos.¹⁷

Análisis cuantitativo:

Por la ley de Lambert - Beer podemos medir la concentración de la sustancia que absorbe al medir la cantidad de radiación absorbida, independiente de la radiación incidente.¹⁷

1.14.4 CARACTERÍSTICAS

- Gran aplicación: una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas que absorben a longitud de onda de UV-Visible y pueden cuantificarse; otras que no absorben por sí mismas pueden hacerlo al ser tratadas químicamente
- Alta sensibilidad: hasta 10^{-7} M según se modifique una técnica.
- Selectividad: puede analizarse cada especie por separado.

- Facilidad y comodidad.¹⁷

1.14.5 MÉTODOS DE MEDIDA

- Espectrofotométrico ordinario.
- Espectrofotométrico de escala expandida o de análisis de trazas.
- Determinaciones simultáneas.
- Adición estándar.
- Espectroscopia de derivadas.
- Valoraciones espectrofotométricas.¹⁷

1.14.6 MATERIALES QUE SE ANALIZAN

La espectroscopia ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos, ya que solo puede ser de utilidad para aquellos que tengan un cromóforo o instauraciones visibles en la región comprendida entre los 100 y los 800 nm. (Energía comprendida entre las 286 y 36 Kcal/mol).¹⁷

Cromóforo: es cualquier grupo de átomos que absorben luz independientemente de que presente color o no.¹⁷

También puede presentar un grupo auxócromo que es el que amplía la conjugación de un cromóforo mediante la compartición de electrones de no enlace.¹⁷

Debemos tener en cuenta que la obtención de un espectro UV supone en primer lugar disolver la sustancia en un disolvente adecuado, que también absorbería en el UV, por lo que en la práctica la espectroscopia UV se ve limitada a longitudes de onda superiores a 200-220 nm. Debido a ello, como podemos imaginar, no son muchos los grupos funcionales que podremos determinar con la espectroscopia UV, siendo de destacar que todos ellos deben poseer al menos un enlace doble, como compuestos aromáticos carboxílicos.¹⁷

1.14.7 CONSIDERACIONES GENERALES

La máxima absorción se debe a la presencia de cromóforos en una molécula. Este tipo de espectroscopia sirve principalmente para el análisis de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos (α y β) insaturados..⁶

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en rangos de 240-285 nm (Banda II) y 300 – 550 (Banda I). Podría indicarse como características de dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas..⁶

TABLA No. 3 VALORES DE ABSORCIÓN PARA LAS BI Y BII DE LOS DIFERENTES TIPOS DE FLAVONOIDES

Banda II, nm	Banda I, nm	Tipo de flavonoide
250-280	310-350	flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3OH subst)
250-280	350-385	Flavonoles (3OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas (5-deoxi-,6,7dioxi)
275-295	300-330	Isoflavonas,dihidroflavonoles
230-270(baja intensidad)	340-390	Chalconas
230-270(baja intensidad)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas,antocianinas

1.14.8 REGLAS DE WOODWARD - FIESER

Las reglas de Woodward – Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir la longitud de onda de la absorción (λ max) UV-visible, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Visible no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado, la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de los electrolitos y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

1.14.9 RESULTADOS QUE SE OBTIENEN

Se obtienen unas líneas a determinadas longitudes de onda que corresponden con los máximos de absorción. Estos se deben a la presencia de cromóforos en la molécula.¹⁷

Para caracterizar dichas absorciones, además de la longitud de onda máxima para cada absorción, debemos recordar la ley de Lambert-Beer.¹⁷

1.15 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopia infrarroja tiene casi 125 años de existencia. El primer espectro de vibraciones moleculares fue observado en 1881 por Abney y Festing, quienes prepararon emulsiones fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos. Encontraron bandas características en estos espectros, las cuales asociaron con la presencia de hidrógeno en las moléculas estudiadas. En 1892, Julius obtuvo el espectro infrarrojo de 20 compuestos orgánicos, encontrando que todos los compuestos que contienen metilo (CH₃) exhiben una banda de absorción de 3.45 μm y llegó a la conclusión de que la absorción de ‘ondas caloríficas’ se debe a movimientos intramoleculares; en otras palabras, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción. También encontró que el efecto no es ‘aditivo’; es decir, que no se puede predecir el espectro de absorción de un compuesto a partir del conocimiento de los espectros de los átomos constituyentes.¹⁶

Los espectrómetros infrarrojos son herramientas importantes para observar espectros vibracionales. Las características más relevantes de esta espectroscopia son las siguientes:¹⁶

1. Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.

3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
4. A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.
5. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.
6. Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que constituye a esta espectroscopía como una herramienta de análisis no destructiva.
7. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.¹⁶

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACION

La presente investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 RECURSOS MATERIALES

2.2.1 RECOLECCIÓN DEL VEGETAL

Se recolecto el vegetal tanto tallo, hojas, flores y frutos de Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*), de los ejemplares que se encuentran en la avenida de la Biblioteca Central de la ESPOCH, la misma que se halla en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador; teniendo en cuenta que este en buen estado físico apreciable a simple vista.

2.2.2 EQUIPOS

CUADRO No. 1 EQUIPOS

• Balanza analítica (BOECO Germany)	• Refractometro
• Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)	• pH-metro
• Estufa de circulación de aire (MEMMERT)	• Centrifuga (Dynac CA)
• Refrigeradora (MABE)	• Sorbona
• Desecador	• Cámara UV
• Bomba de vacío	• Espectrofotómetro UV 1603 (Shimadzu)
• Reverbero eléctrico (HACEB)	• Atomizador (Aspersor)
• Cámara digital	• Computadora

2.2.3 MATERIALES

CUADRO No. 2 MATERIALES

• Vasos de precipitación	• Pipeta 1 ml
• Balones esmerilados	• Pipeta 5 ml
• Tubos de ensayo	• Pipeta 10ml
• Gradilla	• Pipeta Pasteur
• Frascos de vidrio boca ancha	• Capilares
• Frascos ámbar	• Columna cromatográfica
• Embudo normal	• Erlenmeyers
• Embudo de separación	• Cámaras cromatográficas
• Refrigerante	• Varilla de agitación
• Mangueras	• Balones de aforo
• Piseta	• Algodón
• Trípode	• Papel aluminio
• Mascarilla	• Probeta 25ml
• Placas de sílica gel	• Pera de succión
• Tijera	• Pinzas universales

2.2.4 REACTIVOS

CUADRO No. 3 REACTIVOS

• Agua destilada	• Limaduras de magnesio
• Alcohol etílico	• Hidróxido de sodio
• Alcohol metílico	• Reactivo de Sudan III
• Acetato de etilo	• Ácido clorhídrico
• Ácido sulfúrico 0.1 N	• Vainillina
• Ácido acético	• Reactivo de Wagner
• Amoníaco	• Reactivo de Baljeth
• Acetona	• Ácido sulfúrico vainillina
• Butanol	• Sulfato de cerio
• Cloroformo	• Ácido fórmico
• Éter	• Reactivo de shinoda
• Cloruro férrico	• Yodo
• Hexano	• Tolueno
• Índigo de carmín	• Permanganato de potasio 0.01 N

2.3 FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio de esta investigación fueron:

- Preparación de los extractos etanólicos y subextractos clorofórmico, butanólico, toluénico y metanólico de *Callistemon speciosus*, y tamizaje fitoquímico.
- Separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en los subextractos, mediante cromatografía de capa fina y cromatografía en columna.
- Análisis espectrofotométrico de las fracciones purificadas.

2.4 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.

Se tomó la muestra del Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*), la misma que incluyo tallos con ramas, hojas, flores, frutos y semillas, luego su prensado, fue llevada al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el ejemplar.

2.5 PROCESAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.

Una vez recolectado el vegetal se procedió a la limpieza del mismo.

- Se realizó una agitación del vegetal para eliminar el polvo y las hormigas que se encontraban en el mismo.
- Luego se procedió al lavado con el fin de eliminar polvo y cualquier otro material residual del anterior proceso.
- Posterior a esto se colocó sobre papel, para escurrir y favorecer el secado completo.
- Una vez seco todo el material vegetal se trituro, cortando muy finamente todas las partes del vegetal con una tijera.

2.6 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Para la obtención del extracto etanólico del Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*), se utilizó el vegetal excepto la raíz, mediante el siguiente procedimiento.

2.6.1 PROCEDIMIENTO

2.6.1.1 Se pesó la planta seca y triturada y se la colocó dentro de un recipiente de vidrio con tapa, seguidamente se humedeció el contenido con etanol al 96%, empleando 3mL por

cada gramo de material vegetal. Se agitó para conseguir que se mezclaran correctamente; y se dejó en maceración por 72 horas.

2.6.1.2 Después de haber transcurrido este tiempo, se filtró el líquido resultado de la maceración en un embudo con algodón para cubrir el orificio de salida del mismo, evitando el paso del material sólido, recibiendo la parte líquida en un recipiente ámbar limpio y seco; de esta manera se eliminó las impurezas que pudo contener el filtrado.

2.6.1.3 El líquido obtenido mediante la filtración se trasvasó a un balón esmerilado para concentrarlo en el rotavapor a una temperatura no mayor a 50°C y a 200rpm, hasta la completa eliminación del etanol.

2.6.1.4 A continuación se recogió la porción restante del balón (extracto concentrado), y se envasó en un recipiente ámbar, limpio y seco, dejándolo en refrigeración por 24 horas para conseguir la precipitación de las clorofilas.

2.6.1.5 Posterior a las 24 horas, se procedió a separar las clorofilas filtrando a través de algodón, recogiendo así el extracto libre de clorofilas (Extracto Etanólico A). Se tapó herméticamente y se almacenó en refrigeración.

2.7 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A).

2.7.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

A. Determinación del olor

Se introdujo un extremo de una tira de papel filtro de 1x10cm en el extracto, se percibió y determinó el olor que éste poseía.

B. Determinación del color

En un tubo de ensayo se colocó extracto hasta cubrir la base del mismo y se observó el color.

C. Determinación del aspecto

En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y a contra luz se determinó el aspecto del mismo, su transparencia y la presencia de partículas o de fases

2.7.2 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS FÍSICOS

A. Determinación de la densidad relativa

Se pesó el picnómetro vacío y seco, posterior se lo llenó con la porción de ensayo hasta el nivel indicado y se tapó, con una tira de papel se extrajo el exceso y se secó exteriormente el picnómetro. Luego se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{P2-P1}{VP}$$

Dónde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (ml)

B. Determinación del índice de refracción

Para ajustar el equipo, se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio, y se seleccionó la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termo prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidió sobre la apertura de entrada del prisma de medición, y se procedió igual que con el agua.

C. Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realiza la lectura.

2.8 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS EN EL EXTRACTO ETANÓLICO (A), POR PERMANGANOMETRÍA.

Procedimiento:

- En un erlenmeyer colocar 13 ml de extracto EtOH más 10ml de indicador índigo de carmín y 375 ml de agua destilada.
- Titular con KMnO_4 (0.01N) hasta obtener color amarillo.
- La muestra se tituló con 26ml de KMnO_4 de concentración 0.01N valorado con $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.01 N.

Datos: Muestra = 398ml solución Titulante = 26 ml KMnO_4 0.01 N

Dónde:

$$\#Eqqg_m = \#Eqqg_T$$

$$\#Eqqg_m = 0.01 \times 26\text{ml} \times \frac{11}{100\text{ml}}$$

$$\#Eqqg_m = 0.01 \times 2.6 \times 10^{-4} = 2.6 \times 10^{-4}$$

$$\#mEqg = 2.6 \times 10^{-4} \times 1000 = 0.26\text{mEqg}_m$$

2.9 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO EANÓLICO (A)

2.9.1 ENSAYO DE SUDAN

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 el agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo respectivamente.

2.9.2 ENSAYO DE WAGNER

Se parte de una solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner, y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

2.9.3 ENSAYO DE BALJED

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1 ml del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

2.9.4 ENSAYO DE BORNTRAGER

Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 0.5 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5%. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) o rojo, para lo cual se reporta (+++).

2.9.5 ENSAYO DE ESPUMA

Para reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 2 veces el volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.9.6 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.9.7 ENSAYO DE SHIDONA

Permite reconocer la presencia de flavonoides. 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.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

2.9.8 ENSAYO DE ROSENTER

Permite comprobar en los extractos etanólicos la presencia de terpenos. Se tomó una alícuota de extracto etanólico, se adicionó gotas de reactivo de Rosenthaler (solución 1% de vainillina en EtOH y 5mL de H₂SO₄ concentrado) y se calentó.

Se considera positivo cuando se forma una coloración en gama de rosada a violeta o pardas.

2.10 PREPARACIÓN DE LOS SUBEXTRACTOS

Con la finalidad de separar y purificar los metabolitos secundarios del Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*), se procedió a la preparación de los sub extractos, con otros solventes en orden de polaridad inmiscibles con el etanol, fragmentando el fitocomplejo, mediante el siguiente procedimiento.

2.10.1 PROCEDIMIENTO

2.10.1.1 En un embudo de separación se coloca 40 ml de extracto etanólico (A), poco a poco se fue añadiendo cloroformo, después de cada adición de cloroformo se agito y dejo en reposo, formándose así 2 fases, la etanólica superior (A1) y la clorofórmica inferior; posterior a esto se separó la fase clorofórmica en un balón esmerilado, este procedimiento se realizó hasta que el cloroformo añadido no tenga color, así completándose 90 ml de cloroformo añadido.

2.10.1.2 A la fase etanólica (A1) se añadió 2-butanol menos denso que el etanol, la fase superior fue butanólica y la inferior etanólica (A2), se separó la fase superior en un balón esmerilado, así completándose un volumen añadido de 2-butanol de 90ml.

2.10.1.3 A la fase clorofórmica se la concentro en el rotavapor a una temperatura máxima de 50 ° C, hasta eliminar el solvente, obteniéndose así el subextracto clorofórmico (B).

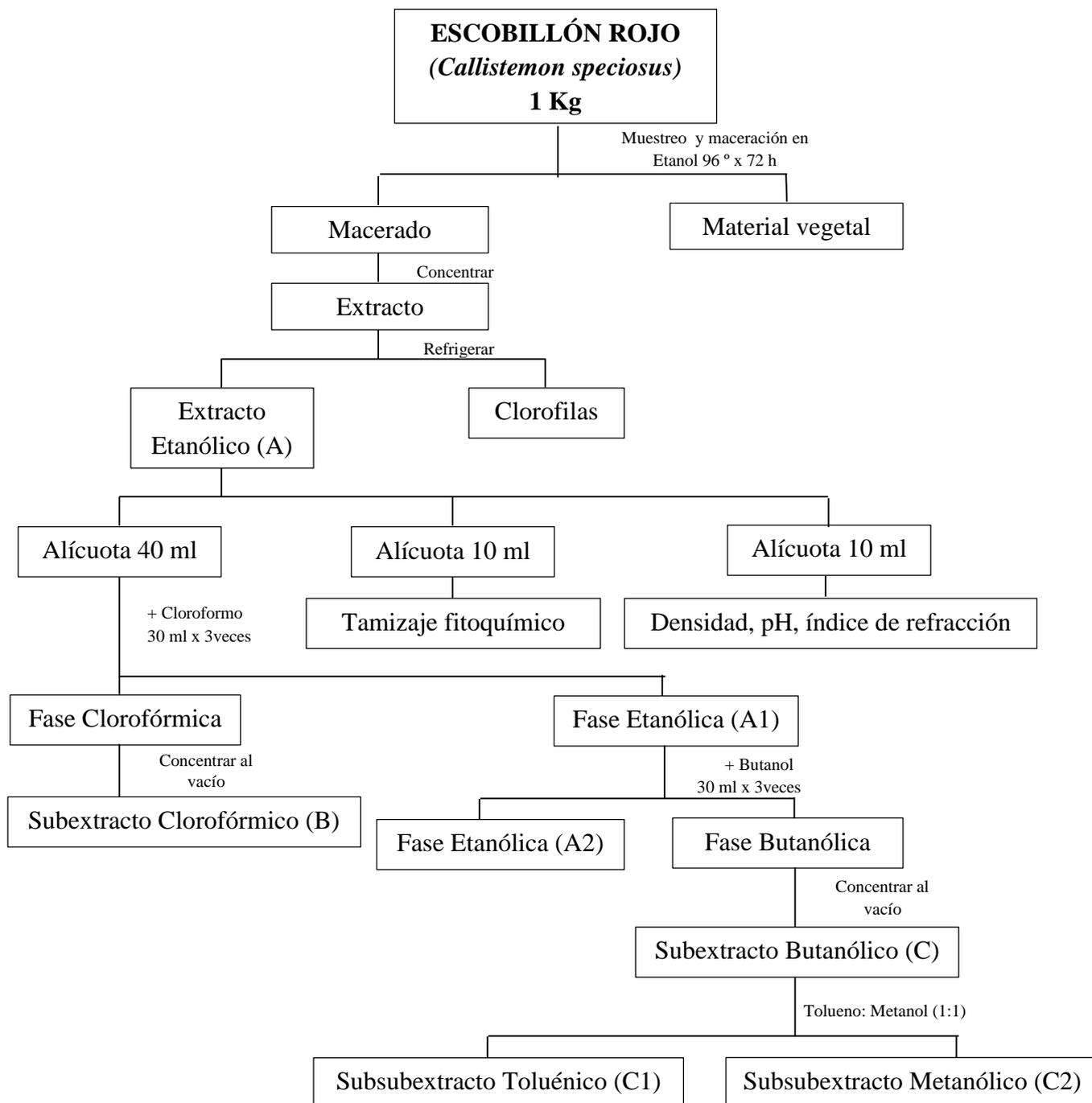
2.10.1.4 De igual manera a la fase butanólica se la concentro por destilación simple, obteniéndose el subextracto butanólico (C).

2.10.1.5 A la fase etanólica y a los sub extractos obtenidos se los coloco en frascos ámbar y conservo a temperatura ambiente (14-18 ° C).

CUADRO No. 4 DETERMINACIÓN DEL PESO DE LOS EXTRACTOS.

Extracto	W_1 Balón vacío	W_2 Balón + Muestra	g de Muestra
Extracto Etanólico (A)	101.3609 g	107.8915 g	6.5306 g
Subextracto Clorofórmico (B)	131.5052 g	132.4752 g	0.97 g
Subextracto Butanólico (C)	100.2353 g	101.4653 g	1.23 g

2.11 DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL ESCOBILLÓN ROJO.



2.12 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS DEL ESCOBILLÓN ROJO.

La cromatografía en capa fina permite utilizar solventes específicos como Tolueno: Acetato de Etilo (93:7) para terpenos de baja polaridad; Cloroformo: Metanol para sesquiterpenolactonas, y Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ácido fórmico: Agua (100:11:11:26) y revelador Rosentaler y Sulfato de Cerio. Se busca la presencia de manchas y determinar los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución, para seleccionar el método cromatográfico de separación y purificación para el extracto y subextractos.

2.13SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A2).

Para evaluar el contenido de metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico que dio positivo para saponinas, taninos catéquicos, alcaloides y de mayor evidencia sesquiterperno lactonas, flavonoides y triterpenos, se probó las cromatografías en: Butanol saturado de Agua, Tolueno: Acetato de Etilo (93:7), Acetato de etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26), Acetona: Etanol (50:50) y Cloroformo: Metanol (65:35); pero en ninguno de los casos el extracto etanólico (A2) presenta manchas. (TLC 1)

2.14 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

Con el solvente de corrido Cloroformo: Metanol (65:35) da la presencia de manchas no definidas en el tercio superior de la TLC1, se cambia el solvente de corrido para saponinas, Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15), observándose manchas redondeadas pero sobrepuestas ubicadas en la parte superior de la placa, de color pardo anaranjado, por lo que requieren de mayor espacio para separar. (TLC 2)

2.14.1 SEPARACIÓN DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO EN COLUMNA.

Debido que en la TLC 2 hay la presencia de manchas, para mejorar la separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el subextracto clorofórmico se realizó la cromatografía en columna de polaridad creciente, por lo que se procede de la siguiente manera:

- Se llena la columna cromatográfica con 20 g de sílica, a continuación se añadió, Cloroformo, una vez homogenizada se adiciona 0.98 g de subextracto, disuelto en el mismo solvente, por la parte superior, se abre la llave para que toda la muestra penetre en la sílica de la columna.
- Se inicia el corrido con cloroformo permitiendo la separación en franjas, si ya no hay separación entonces se varia la mezcla de solventes, hasta terminar con el de mayor polaridad, así tenemos:

CUADRO No. 5 FRACCIONES OBTENIDAS DEL SUBEXTRACTO B, SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Cloroformo	100	1-9
Cloroformo : Metanol	95:5	10-14
Cloroformo : Metanol	50:50	15-18
Cloroformo : Metanol	30:70	19-21
Metanol : Amoniaco	95:5	22
Metanol : Agua	70:30	23,24
Metanol : Agua	50:50	25-27
Agua	100	28

- Cada franja que se obtienen se recolecta en recipientes individuales. (CC 1)

2.14.2 DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA.

Las fracciones recolectadas tienen tonalidades diferentes para determinar la presencia de compuestos, reunión de fracciones y purificación de las mismas se muestrean por aspecto, color y cantidad de solvente eluido.

2.14.2.1 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 3, 5, 6 y 8.

Se realizó la cromatografía en capa fina de estas fracciones para evidenciar la presencia de metabolitos secundarios y su grado de pureza, por lo que se procedió a realizarla con

Cloroformo (100), se revelo con Sulfato de Cerio. La fracción 3 no presenta manchas lo que indica que hay una mínima cantidad de metabolitos o su ausencia, para lo que se unió con las fracciones 1,2 y 4 por presentar el mismo color y consistencia. Además la fracción 5 presenta 2 manchas redondeadas con Rf. de 0.06 y 0.41; la fracción 6 y 8 presentan varias manchas 3 y 4 respectivamente pero sin eficacia. (TLC 3)

2.14.2.2 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones unidas 4, 5, 6, 7 Y 8.

Despues de realizar la union de algunas fracciones, se procedio a realizar la cromatografia en capa fina de estas fracciones en cloroformo (100), y revelado con sulfato de cerio, en la cual la fraccio 4 presenta 2 manchas indefinidas, se unió la fraccion 5 con la 6 poque presentan similares Rf. 0.06, 0.11, 0.22, 0.36 para la primera, y 0.06, 0.10, 0.13, 0.22, 0.38 para la segunda. En el caso de las fracciones 7 y 8, presentan 5 manchas redondeadas con Rf. que van desde 0.06 hasta 0.41. (TLC 5)

A la fraccion 4 se adicionó hexano, con lo que poco a poco se formaba un precipitado, posterior a eso se separo la fase liquida que viene a ser la fraccion 4.1.

Las fracciones 6 a 8 tienen aspecto ceroso, se le adicionó una mezcla de etanol: acetona 1:1 v/v con lo cual precipitan cristales pardos blanquecinos. El aislamiento de los cristales se realiza por centrifugación a 5000 rpm. por 5 min. El líquido de cristalización forma la fracción 6.1 y 8.1 respectivamente.

A los cristales de la fracción 8 se tratan con hexano, se separar la fase hexánica de los cristales por centrifugación, formando así la fracción 8.2 que corresponde al hexano.

La fracción 8.1 presenta una pequeña cantidad de cristales, por lo tanto se añadió una mezcla de hexano: metanol 1:1 v/v, formándose 2 fases liquidas y cristales. Los cristales se quedan en la fracción 8.1, la fase hexánica se coloca en la fracción 81.1. y la fase metanólica denominada fracción 8.1.1.1.

A los cristales de la fracción 6 se le adiciona una mezcla de hexano: metanol 1:1 v/v, para purificar los cristales. La fase hexánica forma la fracción 6.2 y la fase metanólica la fracción 6.3.

En la fracción 7 se añadió 5 ml de acetato de etilo, se formaron cristales, se separó por centrifugación, los cristales quedan en la fracción 7 y la fase de acetato de etilo 7.1. A la última se añadió metanol y separo las fases, la fase metanólica es la fracción 7.1.1.

2.14.2.3 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 4, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 7, 7.1.

Para continuar con la separación y purificación se realizó la cromatografía en capa fina, para lo cual se usó como solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (93:7) y como revelador Sulfato de Cerio.

Se unió la fracción 4 con la 6, ya que las dos presentan una sola mancha redondeada y con el mismo Rf. 0.25. También se unió la fracción 6.1 con la 6.2, ya que presentan tres machas similares con los mismos Rf. que son 0.04, 0.07, 0.22.

Las fracciones 6.3 y 7 presentan una sola macha cada una con Rf de 0.26 y 0.22 respectivamente. La fracción 7.1 presenta dos manchas pero aún se evidencia que están sobrepuestas otras, lo que nos indica la presencia de compuestos pero falta purificarlos. (TLC 7)

2.14.2.4 Verificación cromatográfica de las fracciones 4, 4.1, 6.1, 6.3, 7, 7.1.

Para confirmar la pureza de estas fracciones se realizó la cromatografía en capa fina, la fase móvil fue Tolueno: Acetato de etilo (80:20) y el revelador Sulfato de Cerio.

La fracción 4 presenta una mancha redondeada con Rf. 0.66, por su parte las fracciones 4.1, 6.2 y 7.1, presentan tres manchas, con Rf. 0.05, 0.24, 0.59, los mismos para las tres, por lo que se las unió. Por su parte la fracción 6.3 presenta una sola mancha con un Rf. de 0.63, la 7 indica 3 manchas. (TLC 9)

2.14.2.5 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 7.1.1, 8.1, 8.1.1, 8.1.1.1, 8.2.

Después de realizar fraccionamientos se procede a la cromatografía en capa fina de estas fracciones para purificar los compuestos presentes, se utilizó como solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (93:7) y como revelador Sulfato de Cerio.

Se evidencia que la fracción 7.1.1 presenta dos manchas, sus Rf. son 0.06 y 0.31, la 8.1 presenta una mancha indicando que esta fracción esta pura con Rf. de 0.25.

Las fracciones 8.1.1, 8.1.1.1 y 8.2 presentan 3 manchas indicándonos la presencia de compuestos, con similares Rf. que van de 0.07 a 0.29, por lo que se las unieron. (TLC 8)

2.14.2.6 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 7.1.1, 8, 8.1, 8.1.1.

Se necesitó separar y purificar estas fracciones para lo cual se cromatografió con Tolueno: Acetato de etilo (80:20) como solvente de corrido y de revelador Sulfato de Cerio.

Las fracciones 7.1.1, 8, 8.1 y 8.1.1, presentan compuestos con similares Rf. que van de 0.06 a 0.68, se las unió. (TLC 10)

2.14.2.7 Comprobación de la presencia de metabolitos en la fracción 9, 10, 12 a 14.

Estas fracciones se corrieron en Cloroformo: Metanol (95: 5) y se revelaron con sulfato de Cerio, en todas las fracciones hay varias manchas o compuestos que presentan eficiencia distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente y sus Rf. van desde 0.6 hasta 0.8, no presenta eficacia; se unió la fracción 9 con la 10 por su similitud de color y de 11 a 14. (TLC 4)

Se realiza la cromatografía en capa fina de la fracción 9 en cloroformo (100), al revelar con sulfato de cerio presenta varias manchas con Rf. de 0.07, 0.09, 0.16, 0.22 y 0.45, pero es necesario mejorar su separación por lo que se debe realizar cromatografía en columna de esta. (TLC 5)

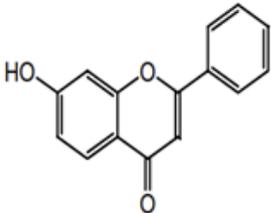
A la fracción 12 se la cromatografió en Tolueno: Acetato de etilo (80:20), con el mismo revelador antes usado, con lo que presenta 4 machas lo que nos indica la posible presencia de compuestos, con la adición de una mezcla de metanol: éter (1:1) v/v, forma un precipitado y 2 fases, se separó las fases dejando el precipitado en la fracción 12, a la fase superior o etérea es 12.1 y la inferior o metanólica 12.2. (TLC 10)

2.14.2.8 Verificación cromatográfica de las fracciones 12, 12.1 y 12.2.

Para establecer la pureza de estas fracciones se realizó la capa fina con solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (80:20) y revelador Sulfato de Cerio, en la cual la fracción 12 presenta una sola macha amarilla con un Rf. de 0.85 lo que indica la presencia de un posible compuesto y además esta puro. (TLC 11)

Con el análisis de espectroscopia UV de la fracción 12 se tiene:

CUADRO No. 6 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE ONDA DE LA FRACCIÓN 12 DETERMINADAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ)nm	Posible estructura
2.418	203 nm	
1.250	276 nm	
0.893	331 nm	

2.14.2.9 Comprobación de la presencia de metabolitos en la fracción 15, 17 y 18.

Se utiliza Cloroformo: Metanol (50:50) como solvente de corrido y Sulfato de Cerio como revelador para realizar la capa fina de estas fracciones. La fracción 15 presenta 6 machas, lo cual indica la presencia de compuestos pero no están puros, lo mismo ocurre con la fracción 17. Por lo tanto hay que fraccionarlas.

A la fracción 15 se le añadió éter, formándose un precipitado y 3 fases, se separaron en distintos tubos. La fase superior que es la metanólica se la llamo fracción 15.3, la fase intermedia o clorofórmica 15.2, la fase inferior o etérea 15.1, y el precipitado es la fracción

15, a esta última se añadió hexano para purificar el precipitado, se separó el precipitado en 15 y la fase hexánica en 15.5.

Se añadió hexano a la fracción 15.3, formándose precipitado, se centrifugo a 5000 rpm. por 5 min. y separó la fase hexánica a la cual se llamó 15.4, el precipitado queda como 15.3.

La fracción 17 formo precipitado, la fase líquida se trasvaso a otro tubo al cual se llamó 17.1, y el precipitado se quedó en 17. Por su parte la fracción 18 presenta una sola mancha redondeada de color marrón con un Rf de 0.83. (TLC 6)

La fracción 15.1 se cromatografio en Tolueno: Acetato de etilo (80:20) y al revelar con sulfato de cerio presentó una sola mancha redondeada color marrón y son Rf. de 0.11, por lo que nos indica que se encuentra pura. (TLC 10)

2.14.2.10 Verificación cromatográfica de las fracciones 15.2, 15.2.1, 15.3, 15.4.1, 15.4.1.1, 15.5.

Con la finalidad confirmar la presencia metabolitos secundarios en estas fracciones y su grado de pureza se aplica la cromatografía en capa fina, como fase móvil se utilizó Cloroformo: Metanol (90:10) y de revelador Sulfato de Cerio.

La fracción 15.2 presenta dos manchas con Rf. de 0.33 y 0.41, las fracciones 15.2.1, 15.4.1 y 15.5, presentan 3 machas, con Rfs. similares, que van desde 0.28 a 0.49, por lo que se las unió. La fracción 15.3 y 15.4.1.1 no presentan una buena separación por lo que se debe probar con otro solvente de corrido. (TLC 12)

2.14.2.11 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 16, 16.1, 17, 17.1, 19, 20.

Se aplica capa fina con solvente de corrido Cloroformo: Metanol (90:10) y revelador Sulfato de Cerio, en la cual la fracción 16, 17 y 20 no presenta ninguna mancha, la fracción 16.1 y 17.1, presentan seis manchas distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente, con los mismos Rfs., que van desde 0.06 a 0.98, por lo que se las unió, a esta

unión se podría realizar una microcolumna. La fracción 19 presenta manchas pero no tienen una buena separación, por lo que es necesario cambiar de fase móvil a una más polar. (TLC 13)

2.14.2.12 Comprobación de la presencia de metabolitos en las fracciones 20.1, 22, 23, 24, 25, 26.

Se realiza la cromatografía en capa fina de las últimas fracciones recolectadas en la columna cromatográfica, para poder verificar la presencia o no de metabolitos secundarios y de ser posible su separación y purificación, para lo cual se utilizó Cloroformo: Metanol (90:10) como solvente de corrido y Sulfato de Cerio de revelador.

La fracción 20.1 presenta ocho manchas o compuestos, las fracciones 22 y 25 presentan una sola mancha, con un Rf. de 0.54 y 0.98 respectivamente, las fracciones 23, 24 y 26 no presentan separación, además por ser las últimas fracciones se presume que sean resinas. (TLC 14)

2.14.2.13 Separación de la fracción 9 en columna.

La microcolumna de la fracción 9 se realiza porque en la TLC 5 presenta eficiencia, pero no tiene buena eficacia, lo que implica que no tiene resolución, presentan Rf. de 0.07, 0.09, 0.16, 0.22 y 0.45.

Se llenó la microcolumna con sílica y cloroformo, a continuación se añadió 0.35 g de la fracción 9, posterior a esto se eluyó con cloroformo y recolecto 20 fracciones, con cloroformo: metanol (90:10) 12 fracciones, con cloroformo: metanol (50:50) 3 y con metanol (100) 1 fracción (CC2), así tenemos:

CUADRO No. 7 FRACCIONES OBTENIDAS SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO EN LA MICROCOLUMNA DE LA FRACCIÓN 9.

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Cloroformo	100	1-20
Cloroformo : Metanol	90:10	21-32
Cloroformo : Metanol	50:50	33-35
Metanol	100	36

2.14.2.14 Determinación cromatográfica de las fracciones de microcolumna de la fracción 9.

Para verificar la presencia de metabolitos, reunir fracciones y purificar se cromatografían en capa fina como se indica a continuación.

2.14.2.15 Verificación de la presencia de metabolitos en las fracciones 1, 2, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20.

Se procedió a realizar la capa fina, como solvente de corrido se utilizó Cloroformo (100) y como revelador sulfato de cerio, con la finalidad de evidenciar la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones.

Presentan manchas redondeadas, de la fracción 1 a la 5 de color que van del celeste al lila, de la 9 a la 20 en tonos que van desde el amarillo al marrón, la fracción 7 no tiene manchas. (TLC 15)

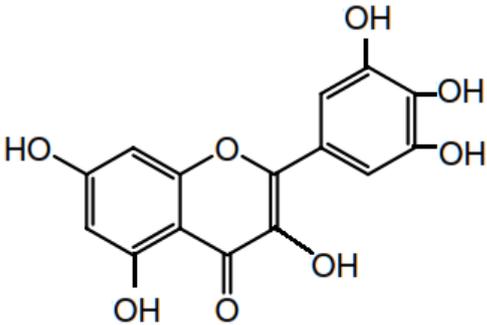
2.14.2.16 Verificación de la pureza de las fracciones 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Para establecer las fracciones puras se realizó la cromatografía en capa fina con Cloroformo (100) como solvente de corrido y sulfato de cerio como revelador. (TLC 16)

Se unió las fracciones 2, 3 y 4, ya que presentan dos manchas redondeadas con los mismos Rfs, 0.35 y 0.94. Se concentró y se formaron cristales blanquecinos.

En el análisis de espectroscopia UV estos cristales presentan las siguientes absorbancias y longitudes de onda.

CUADRO No. 8 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE LOS CRISTALES FORMADOS POR LAS FRACCIONES 2, 3 Y 4, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm	Posible estructura
4.071	224 nm	
4.244	238 nm	
4.237	246 nm	
3.658	267 nm	

Así mismo se unió la fracción 5 con 6, por presentar 2 manchas con iguales Rf. 0.78 y 0.88, por su parte la fracción 7 no presenta manchas.

2.14.2.17 Verificación de la pureza de las fracciones 8, 10 a 14.

Se continua con las cromatografías en capa fina con la finalidad de separar y purificar los metabolitos secundarios presentes en estas fracciones, para lo que se utilizó de solvente de corrido cloroformo (100) y de revelador sulfato de cerio, la fracción 8 no presenta ninguna mancha, indicando la ausencia de compuestos. La fracción 10 y 11 presentan una mancha lo que indica la presencia de un posible compuesto puro, con Rf. de 0.69 y 0.54 respectivamente, se unieron la fracción 12 con la 13 y 14 porque presentan 2 manchas con similares Rf., que van de 0.14 a 0.35. (TLC 17)

2.14.2.18 Verificación de la pureza de las fracciones 15 a 21.

Se realizó la capa fina con solvente de corrido Cloroformo (100) y de revelador sulfato de cerio, mediante lo que se tuvo que unir las fracciones 15 con la 16 y 17, ya que presentan dos manchas iguales para las tres, con los mismos Rf. 0.08 y 0.16; también las fracciones 18, 19, 20 y 21, se unieron, porque presentan una sola mancha redondeada de color lila, con un Rf. de 0.05. (TLC 18)

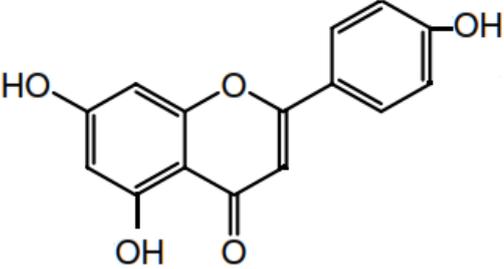
2.14.2.19 Verificación de la pureza de las fracciones 22 a 27.

A estas fracciones se le realiza la capa fina con Tolueno: Acetato de Etilo (80:20) como solvente de corrido ya que en la columna se eluyeron con este, se utiliza como revelador Sulfato de Cerio. La fracción 22 muestra una mancha redondeada de color pardo oscuro, que no es similar a ninguna de las demás fracciones, indicando la posible presencia de un compuesto puro.

Se unió de las fracciones 23 con la 24, ya que presentan una sola mancha de color gris con el mismo Rf. 0.10, además indica que esta purificada. También se unió la fracción 25 con la 26 y 27, ya que presentan dos machas con los mismos Rf. 0.10 y 0.16. (TLC 19)

Al realizar el análisis espectrofotométrico de la fracción 22 se obtuvo lo siguiente:

CUADRO No. 9 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE LA FRACCIÓN 2 OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm	Posible estructura
1.721	202 nm	
0.742	225 nm	
0.459	282 nm	

2.14.2.20 Verificación de la pureza de las fracciones 28, 29, 33, 30, 34.

En busca de la separación y purificación de los metabolitos secundarios de estas fracciones se realizó la cromatografía en capa fina con Tolueno: Acetato de Etilo (80:20) como fase móvil y Sulfato de Cerio como revelador.

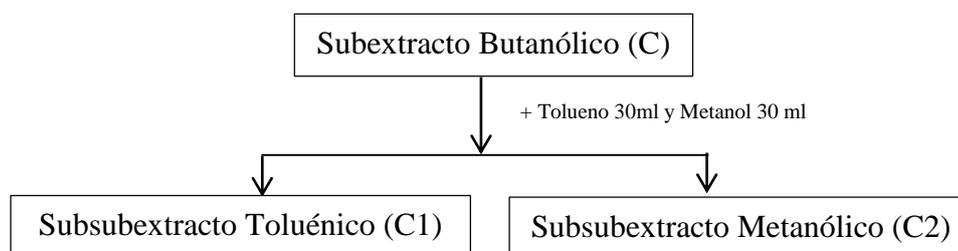
La fracción 28 y la 29 presentar una sola mancha de tonalidad amarilla, con Rf de 0.12 y 0.15 respectivamente. Por su parte la fracción 33 presenta 4 machas pero no tiene una buena resolución, se le podría realizar una placa preparativa o fraccionar con la ayuda de solventes inmiscibles. La fracción 30 y 34 presenta dos machas redondeadas con una buena separación. (TLC 20)

Con esta última placa se terminó la determinación cromatográfica de las fracciones de microcolumna de la fracción 9, las fracciones que no se llegaron a purificar es porque no se contaba con más muestra.

2.15 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C).

En la TLC1 ya se obtienen manchas alargadas del subextracto butanólico, pero es necesario mejorar la eficiencia, eficacia y resolución para poder separar y purificar los metabolitos secundarios presentes, por lo que se realizó la cromatografía en capa fina con Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) como solvente de corrido y de revelador H_2SO_4 vainillina. El subextracto presenta manchas pero aún no tiene buena separación, además su consistencia era semisólida y mucilaginosa lo que no permitía una correcta aplicación en la placa cromatográfica, por lo que se disolvió con tolueno: metanol (1:1) v/v, lo que formo dos fases las mismas que se las separo formando así los subsubextractos toluénico y metanólico. (TLC 21)

2.15.1 DIAGRAMA DEL FRACCIONAMIENTO DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C)



2.16 FRAGMENTACIÓN DEL SUBSUBEXTRACTO TOLUÉNICO (C1) EN COLUMNA.

En vista que en la TLC 21 ya se presentan manchas con eficacia, pero sin eficiencia, por lo que para la adecuada separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el subsubextracto toluénico se realizó la cromatografía en columna. Así se tiene.

CUADRO No. 10 FRACCIONES OBTENIDAS SEGÚN EL ELUYENTE UTILIZADO EN LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DEL SUBSUBEXTRACTO TOLUÉNICO.

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Cloroformo	100	1, 2, 3
Cloroformo : Metanol	50:50	4, 5
Metanol	100	6-10
Metanol : Ácido acético	99:1	11, 12
Metanol : Ácido acético	95:5	13-17
Metanol : Ácido acético	90:10	18, 19
Metanol : Ácido acético	80:20	20, 21

- Cada franja que se obtienen se recolecta en recipientes individuales.
- La fracción 2 presenta precipitado, se separó el líquido de cristalización etiquetado como 2.1. Esta última presenta dos fases, la superior 2.2 y la inferior 2.1.
- Las fracciones 8 a 10, 13 a 16 y 18 a 21 presentan precipitado, se separó el líquido de cristalización obteniendo así las fracciones 8.1, 9.1, 10.1, 13.1, 14.1, 15.1, 16.1, 18.1, 19.1, 20.1, 21.1, respectivamente.

2.16.1 DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA DEL SUBSUBEXTRACTO TOLUÉNICO.

Para verificar la presencia de metabolitos, reunir fracciones y purificar se cromatografían en capa fina como se indica a continuación.

2.16.2 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 1, 2.1, 2.2, 3, 4 Y 5.

Se aplicó la cromatografía en capa fina a estas fracciones con Cloroformo (100) como solvente de corrido y de revelador Sulfato de Cerio, la fracción 1 presenta manchas pero sin separación, lo mismo sucede con la fracción 2.1, por otra parte se procede a unir las fracciones 2.2, 3, 4 y 5 ya que tienen iguales Rf. que van de 0.26 a 0.50. (TLC 22)

2.16.3 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 1, 2.1, 2.2.

Para la verificación del contenido de compuestos en estas fracciones se realizó cromatografía de capa fina con Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:14:10) como solvente de corrido y de revelador Sulfato de Cerio, con lo que se tuvo la presencia de 6 mancha o compuestos en la fracción 1 por lo que se debe realizar una placa preparativa; en el caso de la fracción 2.1 y 2.2 como presentan machas con los mismo Rf. que van de 0.18 a 0.60, por lo que se las unió.(TLC 27)

2.16.3.1 Separación en placa preparativa de la fracción 1 obtenida de la cromatografía en columna del subextracto toluénico.

- Para la realización de la placa preparativa se necesitó una placa de sílica gel G_{F254} , con una dimensión 10 * 10 cm, como solvente de corrido se utilizó Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:14:10).
- Se aplica a un centímetro de la base de la placa una línea continua de la fracción con un capilar, se repite el procedimiento por varias veces hasta tener una concentración visible de la fracción aplicada en la placa cromatográfica.
- Se procede al corrido de la placa con el respectivo solvente de corrido antes mencionado, hasta un centímetro antes del borde superior de la placa, posterior a esto se revela con sulfato de cerio, únicamente medio centímetro de uno de los lados de la placa y se calienta.
- Se presentaron 6 franjas, se recupera estas franjas, colocando cada una en recipientes individuales, se disolvió en metanol, agito y dejo en reposo por una hora.
- Posterior a esto se centrifugo cada una de las franjas a 5000 rpm por 5 minutos, se separó el líquido de la sílica, concentró y realizó una cromatografía en capa fina de cada franja.

2.16.3.2 Verificación cromatográfica de los compuestos separados en placa preparativa de la fracción 1.

Después de realizada la placa preparativa es necesario corroborar la presencia de compuestos en las bandas recuperadas, por lo tanto se realizó la capa fina de las mismas con Cloroformo: Metanol (80:20) como fase móvil y de revelador Sulfato de Cerio, en las

bandas 1 a 5 presentan sola una mancha redondeada, además cristalizó, la franja 6 no presenta ninguna mancha. Las franjas 2 y 3 presentan el mismo Rf. 0.41 por lo que se las unió. (TLC 28) Al realizar el análisis de espectroscopia UV de estas fracciones se tiene lo siguiente:

CUADRO No. 11 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE ONDA DE LAS BANDAS 4 Y 5 DE LA PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN 1, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Banda	Absorbancia(Abs)	Longitud de onda (λ) nm
4	2.967	208
	0.562	279
5	2.617	205
	0.502	279
	0.075	559

2.16.4 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 6, 7, 8.1, 9.1, 10.1 Y 11.

Con Cloroformo: Metanol (80:20) de solvente de corrido y Sulfato de Cerio de revelador se realizó la capa fina de estas fracciones con la finalidad de verificar la presencia de metabolitos secundarios, la fracción 6 presenta manchas pero sin buena separación, la fracción 7 y 8.1 también tienen manchas alargadas. Se procedió a unir las fracciones 9.1, 10.1, 11, porque sus Rf. son los mismos, 0.06 y 0.14. (TLC 23)

2.16.4 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 6, 7, 8.1, 9.1, 12, 13.1 Y 14.1.

Se realizó la cromatografía de capa fina para determinar la presencia de compuestos, se utilizó Metanol (100) como fase móvil y Sulfato de Cerio como revelador, en la cual todas la fracciones presentan manchas, la fracción 6 no tiene una buena separación.

La fracción 9.1 y 12 presentan una mancha alargada y de color amarillo por lo que se las unió. A la fracción 8.1, 9.1 y la fracción 14.1 se añadió acetato de etilo: ácido acético:

ácido fórmico: agua (100:11:11:26). Se formaron dos fases, se las separó, la inferior quedando como 8.1, 9.1, 14.1 y la superior 8.2, 9.2 y 14.2 respectivamente. (TLC 24)

2.16.5 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 8.1, 8.2, 9.2, 14.2.

Se utilizó para esta capa fina Metanol (100) como solvente de corrido y sulfato de cerio como revelador.

La fracción 8.1 presenta una buena separación con dos manchas redondeadas de color marrón, en cambio la fracción 8.2 no presenta una buena separación con manchas alargadas sobrepuestas. La fracción 9.2 y 14.2 presentan cuatro manchas con una buena separación y con los mismos Rf. que van de 0.42 a 0.65, por lo que se las unió, después de la unión y al evaporarse el solvente formó cristales de color pardo oscuro. (TLC 25)

Al realizar el análisis por espectroscopia UV de los cristales se obtuvieron las siguientes longitudes de onda y su respectiva absorbancia.

CUADRO No. 12 ABSORBANCIA Y LONGITUDES DE ONDA DE LOS CRISTALES DE LA FRACCIÓN 9.2 OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Absorbancia	Longitud de onda
(Abs)	(λ) nm
2.209	203 nm
0.859	261 nm
0.589	359 nm

2.16.6 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS EN LAS FRACCIONES 15.1, 16.1, 17, 18.1, 19.1, 20.1 Y 21.1.

Para esta cromatografía se utilizó como fase móvil Metanol (100) y de revelador sulfato de cerio, en la misma que hay la presencia de una mancha redondeada con tonalidades amarillas en todas las fracciones con una buena separación, excepto la fracción 19.1, la cual se encuentran 2 manchas sobrepuestas. (TLC 26)

2.17 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBSUBEXTRACTO METANÓLICO (C2).

Se realizó la cromatografía en capa fina con Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) como solvente de corrido y Sulfato de Cerio de revelador, en la cual hay la presencia de tres manchas redondeadas bien definidas con eficacia, eficiencia y resolución, con Rf. de 0.31, 0.60 y 0.66, por lo que se puede proceder a la realización de una placa preparativa del subsubextracto metanólico. (TLC 29)

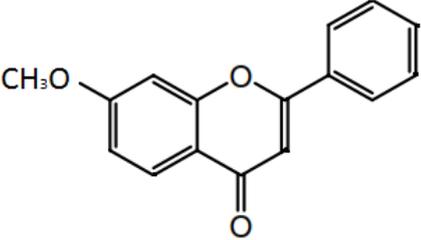
2.17.1 VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE LAS FRANJAS OBTENIDAS DE LA PLACA PREPARATIVA DEL SUBSUBEXTRACTO METANÓLICO.

En la placa preparativa se obtuvieron 3 bandas las mismas que se sometieron a cromatografía de capa fina para verificar la presencia de compuestos puros, para lo que se utilizó como solvente de corrido Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) y de revelador Sulfato de Cerio.

En la banda 1 no se presenta compuestos, la banda 2 presenta una mancha con un Rf. de 0.33, indicando la posible presencia de un compuesto puro, la banda 3 por su parte muestra tres manchas redondeadas con Rf. 0.29, 0.37 y 0,46, por lo que es necesario realizar una placa preparativa para purificar los compuestos presentes. (TLC 30)

Con el análisis de espectroscopia UV de la banda 2, se tiene lo siguiente:

CUADRO No. 13 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE ONDA DE LA BANDA 2, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia(Abs)	Posible estructura
203 nm	2.145	
267 nm	0.457	
319 nm	0.221	

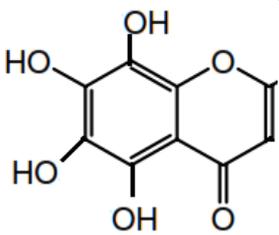
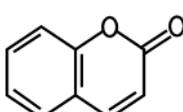
2.17.2 VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE LAS FRANJAS OBTENIDAS DE LA PLACA PREPARATIVA DE LA BANDA 3.

En la placa preparativa de la banda 3 se tuvieron 3 bandas, por lo que se realizó la capa fina de estas para verificar la presencia de metabolitos secundarios, para lo cual se utilizó de fase móvil Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) y de revelador Sulfato de Cerio.

Se evidencia que la banda 3.1 presenta una sola mancha redondeada de tonalidad café con un Rf. de 0.17, en el caso de la banda 3.2 presenta dos manchas redondeadas, con Rf. de 0.46 y 0.71, la banda 3.3 por su parte muestra una sola mancha en la parte superior de la placa con un Rf. de 0.97, indicando la posible presencia de un compuesto puro. (TLC 31)

Mediante el análisis espectroscópico UV de la banda 3.1 y 3.3 se obtiene lo siguiente:

CUADRO No. 14 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE ONDA DE LAS BANDAS 3.1 Y 3.3, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Banda	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)	Posible estructura
3.1	301	0.072	
	320	0.065	
3.3	203	2.105	
	319	0.141	

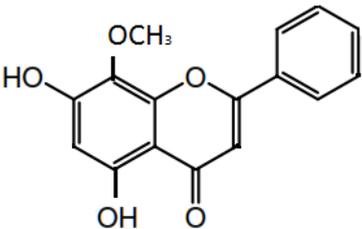
2.17.3 VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE LAS FRANJAS OBTENIDAS DE LA PLACA PREPARATIVA DE LA BANDA 3.2.

En la TLC 31 la banda 3.2 presentaba 2 manchas por lo que se realizó la placa preparativa de esta, donde se obtuvieron 3 bandas y se verificó la presencia de compuestos mediante cromatografía de capa fina con solvente de corrido Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) y revelador Sulfato de Cerio, en la cual la banda 3.2.1 presenta una sola mancha redondeada de color naranja con un Rf de 0.61, de igual manera de la banda 3.2.2 presenta una sola mancha redondeada de color amarillo con un Rf. de 0.57, indicándonos la posible

presencia de un compuesto puro; la franja 3.2.3 por su parte no muestra ninguna mancha indicando la ausencia de compuestos.(Ver TLC 32)

Con el análisis de espectroscopia UV, se obtuvo lo siguiente:

CUADRO No. 15 ABSORBANCIAS Y LONGITUDES DE ONDAS DE LAS BANDAS 3.2.1 Y 3.2.2, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Banda	Absorbancia (Abs)	Longitud de onda (λ) nm	Posible estructura
3.2.1	1.230	202	
	0.052	274	
	0.012	306	
	0.018	580	
3.2.2	1.766	203	
	0.557	223	
	0.106	274	

2.18 PLACAS DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA (TLC) Y COLUMNA CROMATOGRÁFICA (CC).

2.18.1 PLACA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO A2 Y DE LOS SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICO (B) Y BUTANÓLICO (C).

TLC 1	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol (65:35)
Revelador	H ₂ SO ₄ vainillina



Muestras	
1	Extracto etanólico
2	Subextracto clorofórmico
3	Subextracto butanólico

2.18.2 PLACA CROMATOGRÁFICA DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

TLC 2	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15)
Revelador	H ₂ SO ₄ vainillina



Muestra	1. Subextracto clorofórmico
----------------	-----------------------------

2.18.3 SEPARACIÓN DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO EN COLUMNA (CC1).



2.18.4 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS FRACCIONES DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

TLC 3		TLC 4	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo (100)	Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol (95:5)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio
Fracción	Rf	Fracción	
3		10	
5	0.06 0.41	12	
6	0.06 0.28 0.41	13	
8	0.06 0.19 0.38 0.51	14	

TLC 5	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo (100)
Revelador	Sulfato de Cerio



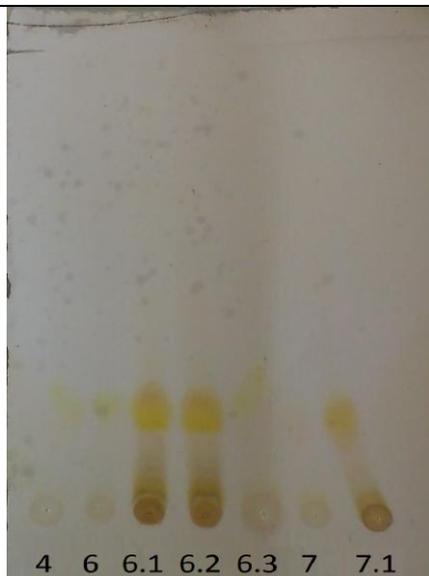
Fracción	Rf
4	
5	0.06
	0.11
	0.22
	0.36
6	0.06
	0.10
	0.13
	0.22
	0.38
7	0.06
	0.10
	0.13
	0.22
	0.41
8	0.06
	0.10
	0.13
	0.22
	0.41
9	0.07
	0.09
	0.16
	0.22
	0.45

TLC 6	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol (50:50)
Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf
15	0.09
	0.20
	0.40
	0.51
	0.63
	0.76
17	0.23
	0.39
	0.60
	0.71
18	0.80
	0.76
18	0.83

TLC 7		TLC 8	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (93:7)	Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (93:7)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción	Rf
4	0.25	7.1.1	0.06
			0.31
6	0.25	8.1	0.25
6.1	0.04	8.1.1	0.07
	0.07		0.21
	0.22		0.29
6.2	0.04	8.1.1.1	0.07
	0.07		0.29
	0.22		
6.3	0.26	8.2	0.07
			0.23
			0.29
7	0.22		
7.1	0.04		
	0.23		

TLC 9		TLC 10	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)	Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción	Rf
4	0.66	7.1.1	0.28
			0.62
			0.68
4.1	0.05	8	0.06
	0.24		0.11
	0.59		0.17
			0.28
			0.62
			0.68
6.1	0.05	8.1	0.06
	0.24		0.11
	0.59		0.17
			0.28
			0.62
			0.68
6.3	0.63	8.1.1	0.06
			0.11
			0.17
			0.28
			0.62
			0.68
7	0.21	12	0.06
	0.56		0.14
	0.63		0.20
			0.28
7.1	0.05	15.1	0.11
	0.24		
	0.59		

TLC 11		TLC 12	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)	Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol (90:10)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)	Fracción	Rf
12	0.85	203 nm	2.418	15.2	0.33
		276 nm	1.250		0.41
		331 nm	0.893		
12.1				15.2.1	0.28
					0.39
					0.48
12.2				15.3	0.28
					0.39
					0.48
				15.4.1.1	0.28
			0.39		
			0.48		
				15.5	0.28
					0.39
					0.49

TLC 13		TLC 14	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido		Solvente de corrido	
Cloroformo: Metanol (90:10)		Cloroformo: Metanol (90:10)	
Revelador		Revelador	
Sulfato de Cerio		Sulfato de Cerio	
			
Fracción	Rf	Fracción	Rf
16		20.1	0.06
			0.13
			0.19
			0.31
			0.46
			0.56
			0.69
			0.88
16.1	0.06	22	0.54
	0.11		
	0.15		
	0.22		
	0.32		
	0.98		
17		23	
17.1	0.06	24	
	0.11		
	0.15		
	0.22		
	0.32		
	0.98		
19	0.06	25	0.98
	0.11		
20		26	

2.18.5 SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN 9 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO EN COLUMNA (CC2).



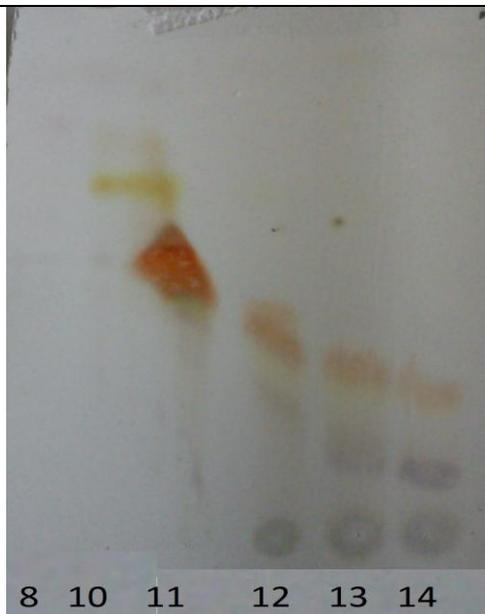
2.18.6 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS FRACCIONES DE LA FRACCIÓN 9 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

TLC 15	
Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo (100)
Revelador	Sulfato de Cerio



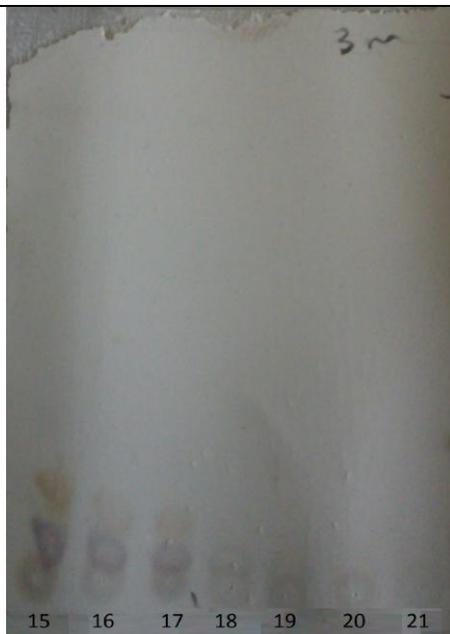
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.13	11	0.13
	0.32		0.19
	0.43		0.35
	0.82		0.52
			0.65
2	0.27	14	0.08
5	0.26		0.16
7			
9	0.26	17	0.08
	0.39		0.19
	0.49		0.35
	0.61	20	0.08
	0.19		

TLC 16		TLC 17	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo (100)	Solvente de corrido	Cloroformo (100)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción	Rf
2	0.35	8	
	0.94		
3	0.35	10	0.69
	0.94		
4	0.35	11	0.54
	0.94		
5	0.78	12	0.18
	0.88		0.35
6	0.78	13	0.17
	0.88		0.34
7		14	0.14
			0.29

TLC 18		TLC 19	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo (100)	Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
15	0.08 0.18	22	0.15	202 nm	1.721
16	0.08 0.16	23	0.10	225 nm	0.742
17	0.08 0.16	24	0.10	282 nm	0.459
18	0.05	25	0.10 0.16		
19	0.05	26	0.10 0.16		
20	0.05	27	0.10 0.16		
21	0.05				

TLC 20

Placa de sílica gel G_{F254}

Solvente de corrido	Tolueno: Acetato de Etilo (80:20)
----------------------------	-----------------------------------

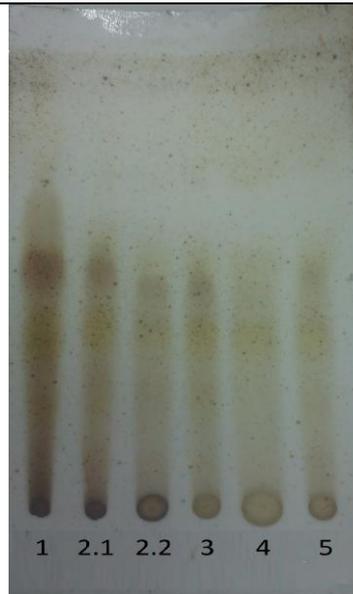
Revelador	Sulfato de Cerio
------------------	------------------



Fracción	Rf
28	0.12
29	0.15
33	0.12
	0.18
	0.24
	0.39
30	0.08
	0.15
34	0.05
	0.21

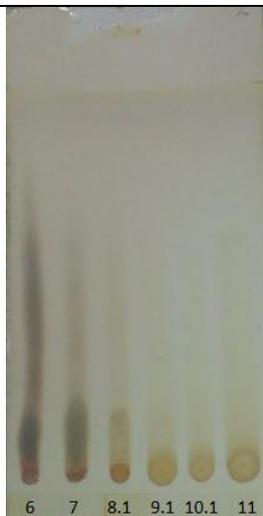
2.18.7 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C) Y DEL SUBSUBEXTRACTO TOLUÉNICO (C1).

TLC 21		TLC 22	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15)	Solvente de corrido	de Cloroformo (100)
Revelador	H_2SO_4 vainillina	Revelador	Sulfato de Cerio



Muestras	Fracción	Rf	
1	Subextracto Butanólico	1	
		2.1	
		2.2	0.26
			0.40
			0.50
		3	0.26
			0.40
			0.50
		4	0.26
			0.40
			0.50
		5	0.26
			0.40
			0.50

TLC 23		TLC 24	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Cloroformo: (80:20)	Metanol	Solvente de corrido Metanol (100)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción
6	Ninguno	6
7	Ninguno	7
8.1	Ninguno	8.1
9.1	0.06 0.14	9.1
10.1	0.06 0.14	12
11	0.06 0.14	13.1
		14.1

TLC 25		TLC 26	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Metanol (100)	Solvente de corrido	Metanol (100)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Fracción	Rf	Fracción	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
8.1	0.42 0.48	15.1	0.79		
8.2	Ninguno	16.1	0.80		
9.2	0.42 0.48 0.59 0.65	17	0.78		
14.2	0.42 0.48 0.59 0.65	18.1	0.83		
		19.1	0.73 0.84		
		20.1	0.77	300	0.201
		21.1	0.71		

TLC 27			TLC 28			
Placa de sílica gel G_{F254}			Placa de sílica gel G_{F254}			
Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol: (100:14:10)	Agua	Solvente de corrido	Cloroformo: Metanol (80:20)		
Revelador	Sulfato de Cerio		Revelador	Sulfato de Cerio		
						
Fracción	Rf	Banda	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)	
1	0.18	1	0.35			
	0.32					
	0.44					
	0.63					
	0.72					
2.1	0.90	2	0.41			
	0.18					
	0.32					
	0.43					
2.2	0.60	3	0.41			
	0.18					
	0.32			4	208	2.967
	0.43				279	0.562
	0.60				5	205
	279	0.502				
		6		559	0.075	

2.18.8 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL SUBSUBEXTRACTO METANÓLICO (C2).

TLC 29		TLC 30	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10)	Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio
			

Subsubextracto	Rf	Banda	Rf	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
Metanolico	0.31	1			
	0.60	2	0.33	203 nm	2.145
	0.66			267 nm	0.457
				319 nm	0.221
		3	0.29		
				0.37	
	0.46				

TLC 31		TLC 32	
Placa de sílica gel G_{F254}		Placa de sílica gel G_{F254}	
Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10)	Solvente de corrido	Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10)
Revelador	Sulfato de Cerio	Revelador	Sulfato de Cerio



Banda	Rf	(λ) nm	(Abs)	Banda	Rf	(λ) nm	Absorbancia (Abs)
3.1	0.17	301	0.072	3.2.1	0.61	202	1.230
		320	0.065			274	0.052
			306			0.012	
			580			0.018	
3.2	0.46			3.2.2	0.57	203	1.766
	0.71					223	0.557
						274	0.106
3.3	0.97	203	2.105	3.2.3			
		319	0.141				

2.19 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO, SUBSUBEXTRACTO TOLUÉNICO Y SUBSUBEXTRACTO METANÓLICO.

Después de realizadas las distintas cromatografías se procedió a la lectura en el espectrofotómetro ultra violeta (UV), en un rango de longitud de onda de 200 a 700 nm. Para la lectura se tomaron todas las fracciones que se encuentran purificadas y además que hayan sido reveladas con sulfato de cerio; así también se tomaron las fracciones en las cuales se formaron cristales.

A continuación presentamos la tabla de las fracciones que en la lectura en el UV presentaron espectros adecuados para analizarlos.

CUADRO No. 16. LONGITUDES DE ONDA Y ABSORBANCIAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS, OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA UV.

Extracto clorofórmico	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
Compuesto 1	203 nm	2.418
Fracción 12	276 nm	1.250
	331 nm	0.893
Compuesto 2	224 nm	4.071
Franja 2 de la fracción 9	238 nm	4.244
	246 nm	4.237
	267 nm	3.658
Compuesto 3	202 nm	1.721
Franja 22 de la fracción 9	225 nm	0.742
	282 nm	0.459

Subsubextracto Toluénico	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
Compuesto 4	208 nm	2.719
Fracción 2	257 nm	1.594
Compuesto 5	203 nm	2.209
	261 nm	0.859
	359 nm	0.589
Compuesto 6	208 nm	3.348
	259 nm	1.879
	302 nm	0.825
	361 nm	1.333
Compuesto 7	286 nm	0.119
	Fracción 19	
Compuesto 8	300 nm	0.201
	Fracción 20.1	

Compuesto 9	262 nm	0.162
Fracción 21	296 nm	0.139
Compuesto 10	208 nm	2.967
Banda 4 de la fracción 1	279 nm	0.562
Compuesto 11	205 nm	2.617
Banda 5 de la fracción 1	279 nm	0.502
	559 nm	0.075
<hr/>		
Subsubextracto Metanólico	Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia (Abs)
Compuesto 12	203 nm	2.145
Banda 2	267 nm	0.457
	319 nm	0.221
Compuesto 13	301 nm	0.072
Banda 3.1	320 nm	0.065
Compuesto 14	203 nm	2.105
Banda 3.3	319 nm	0.141
Compuesto 15	202 nm	1.230
Banda 3.2.1	274 nm	0.052
	306 nm	0.012
	580 nm	0.018
Compuesto 16	203 nm	1.766
Banda 3.2.2	223 nm	0.557
	274 nm	0.106

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 ANÁLISIS DE LA ESPECIE VEGETAL

3.1.1 COMPROBACIÓN TAXONOMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el curador del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el Ing. Jorge Caranqui, el mismo que reportó que se trata de un arbusto perteneciente a la familia Myrtace, género *Callistemon*, especie *speciosus*, su nombre científico es *Callistemon speciosus*, conocido comúnmente como escobillón rojo, hisopo, isopo, calistemo, calistemon y cepillo, gusanillo, limpia tubos, cultivada en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; originario de Australia y Tasmania, de crecimiento medio. Requiere libre exposición solar. Tolera suelos pobres, secos y algo de salinidad.

3.1.2 ESTUDIO MACROMORFOLÓGICO DEL VEGETAL

El *Callistemon speciosus* es un arbusto perennifolio, erecto y compacto, es una planta de porte pequeña a mediana que puede alcanzar hasta los 8 m de alto. Presenta un tronco más o menos recto y de aproximadamente 13 cm diámetro, con ramas erguidas y las ramillas jóvenes sedoso-pelosas; corteza rugosa, agrietada o papirácea, de tonalidad oscura, con hojas alternas, cortamente pecioladas, gruesas, rígidas, de color verde oscuro, de lineares a elípticas, de ápice con punta estrecha, con nerviación y márgenes prominentes y abundantes glándulas esenciales. Sus inflorescencias en espigas densas, con ejes pelosos. De flores hermafroditas, actinomorfas, con 5 sépalos y 5 pétalos verdosos; filamentos libres, de color rojo brillante, con anteras amarillas; estilo ligeramente más largo que los estambres. Sus estambres con los filamentos libres o ligeramente unidos en la base, de color rojo intenso, rara vez blancos, con las anteras amarillas. El fruto tipo cápsula, cupuliforme, serótino.

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICOS, SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO Y SUBSUB EXTRACTOS TOLUÉNICO Y METANÓLICO.

Se utilizó ramas, hojas, flores y frutos limpios y troceados del Escobillón rojo (*Callistemon speciosus*), para la extracción de los metabolitos secundarios se utilizó el método de maceración con etanol 96 %. El hinchamiento del material vegetal aumenta la permeabilidad de la pared celular y difusión de los compuestos en el solvente.

Se partió de 6.5306 g del extracto alcohólico total, preparado a partir de las ramas, hojas flores y frutos del Escobillón rojo. Los subextractos y subsubextractos tienen un rendimiento en peso de: Subextracto clorofórmico 0.97 g, Subextracto butanólico 1.23 g, Subsubextracto toluénico 0.61 g y el Subsubextracto metanólico 0.53g

3.3 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

Se determinó las características organolépticas y físicas al extracto alcohólico total obteniendo una densidad e índice de refracción mayor al del agua, y su pH indican que es ácido, los resultados se reportan en el cuadro No. 17.

CUADRO No. 17 CARACTERISTICAS ORGANOLÉTICAS Y FISICAS DEL EXTRACTO ETANOLICO.

PARÁMETRO	ESCOBILLON ROJO
ASPECTO	Líquido
COLOR	Verde obscuro
OLOR	Aromático
DENSIDAD	1,0592 g/ml
pH	3,45
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	1,34

3.3.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS CUALITATIVO MEDIANTE REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN.

Los resultados obtenidos a partir de reacciones de coloración o precipitación del tamizaje fitoquímico se aprecian en el cuadro No. 18.

CUADRO No. 18 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN Grupo Fitoquímico	EXTRACTO DEL ESCOBILLON ROJO <i>Callistemon speciosus</i>
ESPUMA Saponina	(+) más de 2 min.
CLORURO FÉRRICO Compuestos fenólicos Taninos catéquicos Taninos pirogálicos	(-) (+) verde oscuro (-)
SHINODA Flavonoides	(++) rojo intenso
WAGNER Alcaloides	(+) pardo oscuro y precipitado rojo
BALJET Sesquiterpenolactonas	(++) color mostaza y precipitado rojo
SUDAN III Monoterpenos	(-)
LIEBERMANN BURCHARD Triterpenos - esteroides	(++) verde oscuro

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia.

El cuadro indica los grupos fitoquímicos del extracto del Escobillón rojo y es así que tenemos una cantidad considerable de saponinas, taninos catéquicos, flavonoides, sesquiterpeno lactonas, triterpenos y/o esteroides y también una mínima presencia de alcaloides.

3.3.3 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA EN EL EXTRACTO ETANÓLICO (A).

Mediante el método de permanganometría se cuantifico el contenido de taninos, que es de 0.26 mEqg de taninos pirocatécolicos expresados como consumo de permanganato de potasio.

3.4 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL ESCOBILLÓN ROJO (*Callistemon speciosus*).

Para la posible identificación de los metabolitos secundarios presentes en el Escobillón rojo se procedió al análisis cromatográfico, el cual permitió aislar compuestos puros para su determinación espectrofotométrica.

3.4.1 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A2).

Al realizar varias cromatografías del extracto etanólico (A2) y por último la TLC 1. No se tiene la presencia manchas; lo que presume que mediante los tratamientos que se dieron al extracto etanólico (A) con varios solventes orgánicos, se extrajeron todos los compuestos presentes en el mismo, así quedando el extracto etanólico (A2) sin la presencia de algún compuesto.

3.4.2 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

Se obtuvo la separación en manchas en la TLC 2 con Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) como solvente de corrido y se revelo con H_2SO_4 vainillina, pero no presenta una buena resolución, por lo que se aplicó cromatografía en columna.

3.4.2.1 Separación del subextracto clorofórmico (B) en columna.

Se separó 28 fracciones con el solvente de corrido determinado, a estas se aplicó TLC para aislar las fracciones puras, a la fracción 9 se realizó una microcolumna porque mediante TLC, como solvente de corrido Cloroformo (100) y sulfato de cerio como revelador, presentó eficiencia y eficacia con $R_f = 0.07, 0.09, 0.16, 0.22$ y 0.45 .

Al realizar semiextracciones con metanol: éter (1:1) v/v a la fracción 12, se la purifico, ya que mediante TLC con solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (80:20) y sulfato de cerio como revelador, se tiene un $R_f = 0.85$, λ_{max} 203 nm, 276 nm, 331 nm.

3.4.2.2 Separación de la fracción 9 en columna.

Se logró separar 36 fracciones; mediante TLC con solvente de corrido Cloroformo (100) y de revelador sulfato de cerio, se evidencio que la fracción 2, 3 y 4 presentan el mismo $R_f = 0.35, 0.94$, por lo que se las unió resultando la formación de cristales los mismo que indican una λ_{max} de 224 nm, 238 nm, 246 nm y 267 nm.

La fracción 22 al realizar cromatografía en capa fina con solvente de corrido Tolueno: Acetato de Etilo (80:20) y de revelador sulfato de cerio, indicó un $R_f = 0.15$, con λ_{max} de 202 nm, 225 nm y 282 nm.

3.4.3 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C).

Mediante la cromatografía de capa fina se obtuvo que el subextracto butanólico no presenta buena separación, además su consistencia era semisólida lo que no permitía una buena aplicación en la placa cromatográfica, por lo que se disolvió con tolueno y metanol, obteniendo dos fases, los subsubextractos toluénico y metanólico.

3.4.2.3 Fragmentación del subsubextracto toluénico (C1) en columna.

Con cloroformo se recolecto 3 fracciones, cloroformo: metanol (50:50) 2, metanol (100) 5, Metanol: Ácido acético (99:1) 2, Metanol: Ácido acético (95:5) 5, Metanol: Ácido acético (90:10) 2 y con Metanol: Ácido acético (80:20) 2. A las mismas que se aplicó TLC. Como solvente de corrido Metanol (100) y revelador sulfato de cerio, la fracción 9.2 y 14.2 presentan los mismo R_f s. por lo que se las unió, formando cristales, así se tiene $R_f = 0.42, 0.48, 0.59, 0.65$, con λ_{max} 203 nm, 261 nm y 359 nm.

La cromatografía de capa fina de la fracción 20.1, con solvente de corrido Metanol (100) y revelador sulfato de cerio presenta un $R_f = 0.77$, con λ_{max} 300 nm.

Al aplicar TLC para la fracción 1 con solvente de corrido Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:14:10) y revelador sulfato de cerio, presenta varias manchas con buena separación y $R_f = 0.18, 0.32, 0.44, 0.63, 0.72$ y 0.90 , por lo que se realizó placa preparativa, obteniendo 6 bandas, a las mismas que sea aplico TLC con solvente de corrido Cloroformo: Metanol (80:20) y sulfato de cerio como revelador, indicando para la banda 4 un $R_f 0.32$, con λ_{max} de 208 nm y 279nm, y para la 5 un $R_f 0.61$ que además formo cristales con una λ_{max} de 205 nm, 279 nm y 559 nm.

Las fracciones 2, 10, 19 y 21son precipitados que con anterioridad se los separo de la fase liquida, así la fracción 2 presenta una λ_{max} de 208 nm y 257 nm, la fracción 10 una λ_{max} de 208 nm, 259 nm, 302 nm y 361 nm, la fracción 19 una λ_{max} de 286 nm y la fracción 21 una λ_{max} de 262 nm y 296 nm.

3.4.2.4 Separación y purificación del subsubextracto metanólico (C2).

Se realizó una cromatografía en capa fina para este subsubextracto con solvente de corrido Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) y como revelador sulfato de cerio, con lo que se obtuvo la separación en manchas indicando $R_f = 0.31, 0.60$ y 0.66 , por lo que se realizó una placa preparativa con el solvente de corrido y revelador antes indicado, obteniéndose 3 bandas, a las que se realizó cromatografía en capa fina, la banda 2 muestra un $R_f = 0.33$ y λ_{max} de 203 nm, 267 nm y 319nm, la 3 presenta separación de 3 manchas con $R_f = 0.29, 0.37, 0.46$, por lo que se procede a realizar placa preparativa de esta.

De la placa preparativa de la banda 3, se obtienen 3 bandas a las cuales se les aplico TLC, la banda 3.1 indica un $R_f = 0.17$ y con λ_{max} de 301 nm, 320nm, la 3.2 presenta $R_f = 0.46$ y 0.71 , por lo que es necesario realizar una placa preparativa de esta, por su parte la 3.3 muestra un $R_f = 0.97$ con λ_{max} de 203nm y 319 nm.

De la placa preparativa de la banda 3.2 con el solvente de corrido y revelador determinado, se obtuvieron 3 bandas, a las que se realizó TLC, la 3.2.1 mostro un $R_f = 0.61$ con λ_{max} de 202nm, 274 nm, 306 nm y 580 nm, por su parte la banda 3.2.2 indico un $R_f = 0.57$ con λ_{max} de 203 nm, 223 nm y 274 nm. La 3.2.3 no presenta mancha.

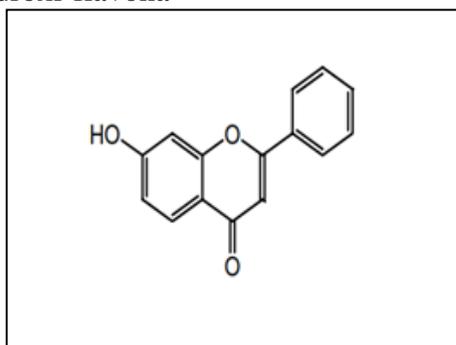
3.5 POSIBLES ESTRUCTURAS DADAS POR ESPECTROSCOPIA UV

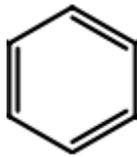
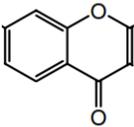
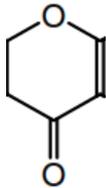
3.5.1 FLAVONOIDES

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FOTOQUÍMICO (BI 245-275 nm); (BII 310-330 nm)

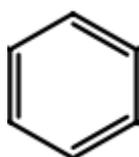
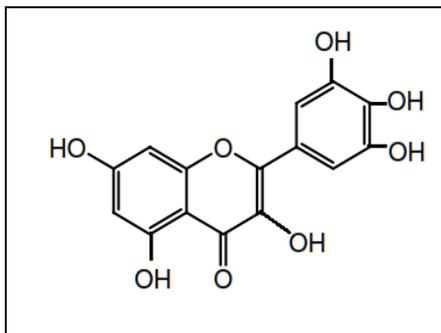
Longitudes de onda calculadas para flavonoides aplicando las reglas de WOODWARD Y FIESER.

COMPUESTO 1: 7-hidroxi-flavona

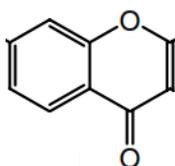


					
Anillo base	180 nm	Benzo γ pirona	246 nm	Pirona	315 nm
OH (p)	25 nm	Extensión	5 nm	3 Extensiones	15 nm
λ_{max} calculada	205	OH (p)	25 nm	λ_{max} calculada	330 nm
λ_{max} experimental	203	λ_{max} calculada	276nm	λ_{max} experimental	331 nm
		λ_{max} experimental	276 nm		

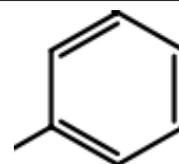
COMPUESTO 2: Miricetina



Anillo base	180 nm
OH (p)	25 nm
Extensión	3 nm
OR (m)	7 nm
OH (o)	7 nm
λ_{max} calculada	222 nm
λ_{max} experimental	224 nm

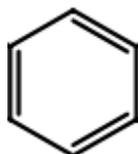
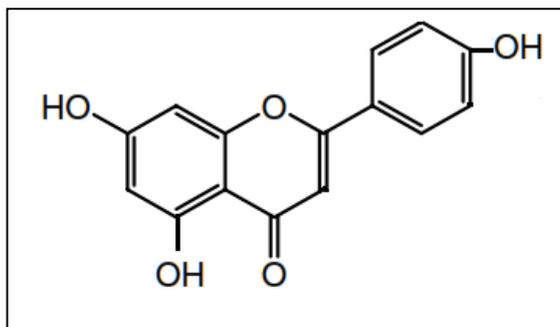


Benzo γ pirona	246 nm
OH (p)	25 nm
λ_{max} calculada	271 nm
λ_{max} experimental	267 nm

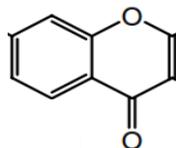


Benceno	204 nm
OH (p)	25 nm
2 OH (m)	14
λ_{max} calculada	243 nm
λ_{max} experimental	238 nm
λ_{max} experimental	246 nm

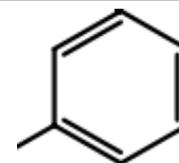
COMPUESTO 3: 5, 7-dihidro-4'-hidroxi-flavona



Anillo base	180 nm
OH (p)	25 nm
λ_{max} calculada	205 nm
λ_{max} experimental	202 nm

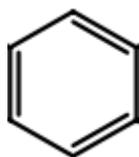
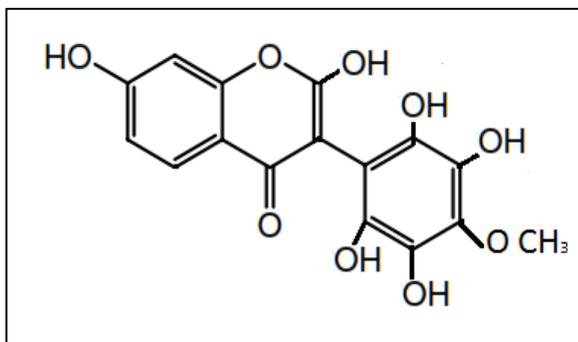


Benzo γ pirona	246 nm
OH (p)	25 nm
OR (o)	7 nm
OH (o)	7 nm
λ_{max} calculada	285 nm
λ_{max} experimental	282 nm

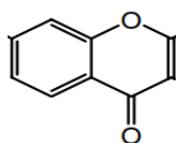


Benceno	204 nm
OH (p)	25 nm
λ_{max} calculada	229 nm
λ_{max} experimental	225 nm

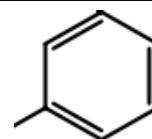
COMPUESTO 6: 2, 7-dihidroxi-2',3',5',6'-tetrahidroxi-4'-metoxi-isoflavona



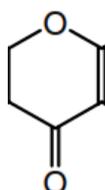
Anillo base	180 nm
OH (p)	25 nm
Extensión	5 nm
λ_{max} calculada	210 nm
λ_{max} experimental	208 nm



Benzo γ pirona	246 nm
2 OH (p)	50 nm
R (m)	7 nm
λ_{max} calculada	303 nm
λ_{max} experimental	302 nm

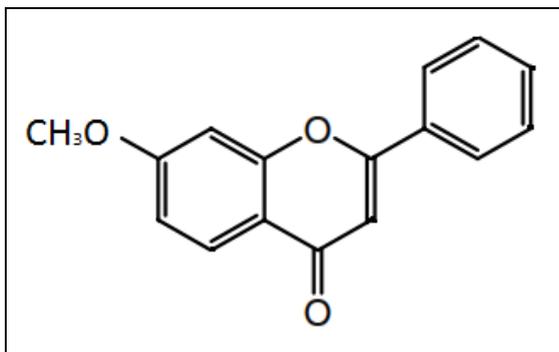


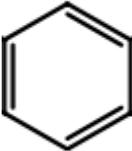
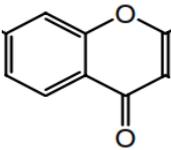
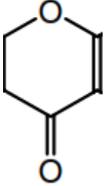
Benceno	204 nm
OR (p)	25 nm
2 OH (o)	14 nm
2 OH (m)	14 nm
λ_{max} calculada	257 nm
λ_{max} experimental	259 nm



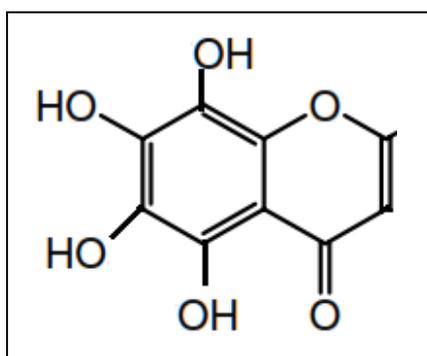
Pirona	315 nm
3 Extensiones	15 nm
OH (p)	25 nm
λ_{max} calculada	355 nm
λ_{max} experimental	361 nm

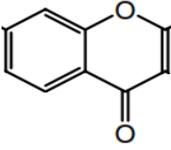
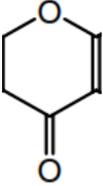
COMPUESTO 12: 7-metoxi-flavona



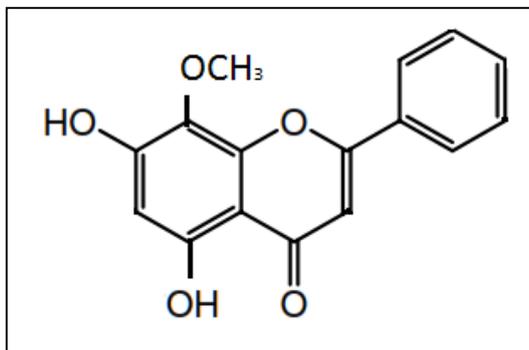
																										
<table border="1"> <tr><td>Anillo base</td><td>180 nm</td></tr> <tr><td>OR (p)</td><td>25 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>205 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>203 nm</td></tr> </table>	Anillo base	180 nm	OR (p)	25 nm	λ_{max} calculada	205 nm	λ_{max} experimental	203 nm	<table border="1"> <tr><td>Benzo γ pirona</td><td>246 nm</td></tr> <tr><td>OR (p)</td><td>25nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>271 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>267 nm</td></tr> </table>	Benzo γ pirona	246 nm	OR (p)	25nm	λ_{max} calculada	271 nm	λ_{max} experimental	267 nm	<table border="1"> <tr><td>Pirona</td><td>315 nm</td></tr> <tr><td>Extensión</td><td>5 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>320 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>319 nm</td></tr> </table>	Pirona	315 nm	Extensión	5 nm	λ_{max} calculada	320 nm	λ_{max} experimental	319 nm
Anillo base	180 nm																									
OR (p)	25 nm																									
λ_{max} calculada	205 nm																									
λ_{max} experimental	203 nm																									
Benzo γ pirona	246 nm																									
OR (p)	25nm																									
λ_{max} calculada	271 nm																									
λ_{max} experimental	267 nm																									
Pirona	315 nm																									
Extensión	5 nm																									
λ_{max} calculada	320 nm																									
λ_{max} experimental	319 nm																									

COMPUESTO 13: 5, 6, 7, 8-tetrahydroxi-benzopirona



																					
<table border="1"> <tr><td>Benzo γ pirona</td><td>246 nm</td></tr> <tr><td>OH (p)</td><td>25 nm</td></tr> <tr><td>2 OH (m)</td><td>14 nm</td></tr> <tr><td>OH (o)</td><td>14 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>299 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>301 nm</td></tr> </table>	Benzo γ pirona	246 nm	OH (p)	25 nm	2 OH (m)	14 nm	OH (o)	14 nm	λ_{max} calculada	299 nm	λ_{max} experimental	301 nm	<table border="1"> <tr><td>Pirona</td><td>315 nm</td></tr> <tr><td>Extensión</td><td>5 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>320 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>320 nm</td></tr> </table>	Pirona	315 nm	Extensión	5 nm	λ_{max} calculada	320 nm	λ_{max} experimental	320 nm
Benzo γ pirona	246 nm																				
OH (p)	25 nm																				
2 OH (m)	14 nm																				
OH (o)	14 nm																				
λ_{max} calculada	299 nm																				
λ_{max} experimental	301 nm																				
Pirona	315 nm																				
Extensión	5 nm																				
λ_{max} calculada	320 nm																				
λ_{max} experimental	320 nm																				

COMPUESTO 16: 5,7-dihidroxi-8-metoxi-flavona



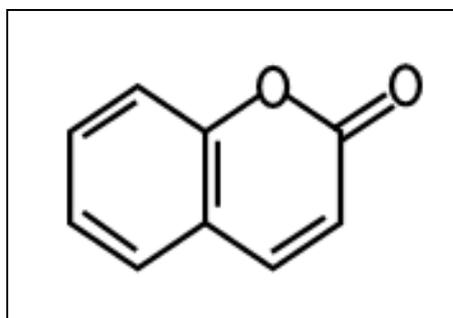
<table border="1"> <tbody> <tr><td>Anillo base</td><td>180 nm</td></tr> <tr><td>OH (p)</td><td>25 nm</td></tr> <tr><td>OH (o)</td><td>7 nm</td></tr> <tr><td>OR (m)</td><td>7 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>219 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>223 nm</td></tr> </tbody> </table>	Anillo base	180 nm	OH (p)	25 nm	OH (o)	7 nm	OR (m)	7 nm	λ_{max} calculada	219 nm	λ_{max} experimental	223 nm	<table border="1"> <tbody> <tr><td>Benzo y pirona</td><td>246 nm</td></tr> <tr><td>OH (p)</td><td>25 nm</td></tr> <tr><td>Extensión</td><td>3 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>274 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>274 nm</td></tr> </tbody> </table>	Benzo y pirona	246 nm	OH (p)	25 nm	Extensión	3 nm	λ_{max} calculada	274 nm	λ_{max} experimental	274 nm	<table border="1"> <tbody> <tr><td>Benceno</td><td>204 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>204 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>203 nm</td></tr> </tbody> </table>	Benceno	204 nm	λ_{max} calculada	204 nm	λ_{max} experimental	203 nm
Anillo base	180 nm																													
OH (p)	25 nm																													
OH (o)	7 nm																													
OR (m)	7 nm																													
λ_{max} calculada	219 nm																													
λ_{max} experimental	223 nm																													
Benzo y pirona	246 nm																													
OH (p)	25 nm																													
Extensión	3 nm																													
λ_{max} calculada	274 nm																													
λ_{max} experimental	274 nm																													
Benceno	204 nm																													
λ_{max} calculada	204 nm																													
λ_{max} experimental	203 nm																													

3.5.2 CUMARINAS

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FOTOQUÍMICO λ_{max} 274 y 311 nm.

Longitudes de onda calculadas para cumarinas aplicando las reglas de WOODWARD Y FIESER.

COMPUESTO 14



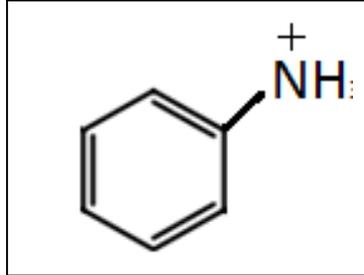
<table border="1"> <tbody> <tr><td>Anillo base</td><td>315 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>315 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>319 nm</td></tr> </tbody> </table>	Anillo base	315 nm	λ_{max} calculada	315 nm	λ_{max} experimental	319 nm	<table border="1"> <tbody> <tr><td>Benceno</td><td>204 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} calculada</td><td>204 nm</td></tr> <tr><td>λ_{max} experimental</td><td>203 nm</td></tr> </tbody> </table>	Benceno	204 nm	λ_{max} calculada	204 nm	λ_{max} experimental	203 nm
Anillo base	315 nm												
λ_{max} calculada	315 nm												
λ_{max} experimental	319 nm												
Benceno	204 nm												
λ_{max} calculada	204 nm												
λ_{max} experimental	203 nm												

3.5.3 DERIVADOS BENCÉNICOS

COMPUESTO 4: Ion anilino

λ_{max} calculada 203 nm , 254 nm.

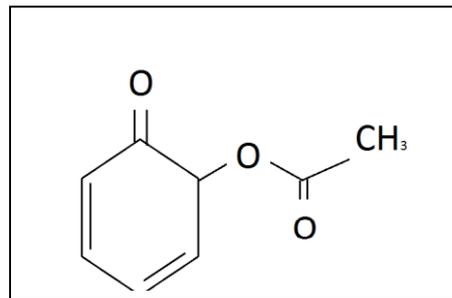
λ_{max} experimental 208 nm , 257 nm.



COMPUESTO 8: Acetato de 2,3-dien-hexanona

λ_{max} calculada 300 nm

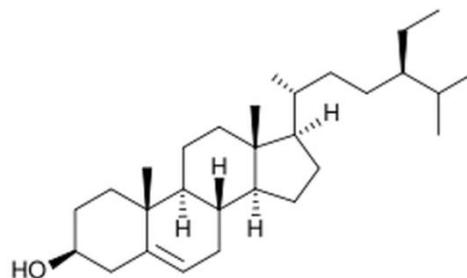
λ_{max} experimental 300 nm



3.5.4 ESTEROLES

COMPUESTO 7: β -SITOSTEROL

($\lambda_{max} = 286$ nm)



La posible estructura de los probables compuestos 5, 9, 10, 11 y 15 no se pudo determinar, pero se tiene indicios por sus características físico-químicas y las longitudes de onda que presentan, de que se trae de compuestos fenólicos.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. El Escobillón rojo (*Callistemon speciosus*) presente en Ecuador es originario de Australia y Tasmania, introducido y cultivado en las zonas tropicales, subtropicales y andinas como en el caso de la provincia de Chimborazo.
2. De 1.5 kg de polvo de parte aérea del vegetal por maceración dio 6.5306 g de extracto líquido verde oscuro no transparente, olor agradable, con una densidad de 1.0592, pH de 3.45 e índice de refracción de 1.34. El subextracto clorofórmico es de 0.97 g, el butanólico 1.23g, el toluénico 0.61g y el metanólico 0.53 g.
3. El extracto etanólico de *Callistemon speciosus*, contiene saponinas, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenolactonas, triterpenos comprobados por reacciones de coloración. Los taninos catequicos, se cuantificaron por permanganometría y corresponde a 0.26 mEqg en 13 ml de extracto, expresado en función al consumo de permanganato de potasio.
4. La cromatografía en capa fina del subextracto clorofórmico corrido en Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) y revelador H_2SO_4 vainillina, presento manchas redondeadas sobrepuestas que posteriormente se separan y purifican en columna cromatográfica en 28 fracciones, la 12 tratada con metanol: éter (1:1) v/v, y evaluada con solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (80:20) y asperzada con sulfato de cerio tiene un $R_f = 0.85$ y λ_{max} 203, 276, 331 nm correspondientes a la 7-hidroxi-flavona.

La fracción 9 evaluada en Cloroformo da $R_f = 0.07, 0.09, 0.16, 0.22$ y 0.45 , por lo que se separa en microcolumna, se recogen 36 fracciones, la 22 corrida en Tolueno: Acetato de Etilo (80:20) y revelada con sulfato de cerio, dio un $R_f = 0.15$, con λ_{max} de 202, 225 y 282 nm que corresponde a 5, 7-dihidro-4'-hidroxi-flavona.

5. El subsubextracto toluénico se fracciona en columna, la fracción 1 se purifica en placa preparativa con Cloroformo: Metanol (80:20) y sulfato de cerio como revelador, define 6 franjas, la banda 4 un $R_f 0.32$, da λ_{max} 208 y 279nm, y la 5 un R_f de 0.61, la cual formo cristales con una λ_{max} de 205, 279 y 559 nm.

Las fracciones 2, 10, 19 y 21 con precipitados, filtrados dan un sólido ceroso y un líquido. El sólido de la fracción 2 da una λ_{max} de 208 y 257 nm correspondiente al ion anilinio. El sólido de la fracción 10 una λ_{max} de 208, 259, 302 y 361 nm correspondientes a la 2, 7-dihidroxi-2',3',5',6'-tetrahidroxi-4'-metoxi-isoflavona. El sólido de la fracción 19 una λ_{max} de 286 nm, perteneciente al β -sitosterol y el sólido de la fracción 21 una λ_{max} de 262 y 296 nm.

Las fracciones 9 a 14 se tratan con mezcla de solventes hexano: metanol, 9.2 y 14.2 corresponden a la fase metanólica, tienen $R_f = 0.42, 0.48, 0.59, 0.65$, la unión cristaliza y da UV con λ_{max} 203, 261 y 359 nm.

La fracción 20.1, líquida filtrado el precipitado y corrida en Metanol y revelador sulfato de cerio presenta un $R_f = 0.77$, con λ_{max} 300 nm correspondiente al acetato de 2,3-dien-hexanona.

6. El subsubextracto metanólico en TLC corrido con Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:24:10) y revelado con sulfato de cerio, da $R_f = 0.31, 0.60$ y 0.66 , se separa en placa preparativa, dan 3 bandas, la banda 2 muestra un $R_f = 0.33$ y λ_{max} de 203, 267 y 319 nm que corresponde a la 7-metoxiflavona.

La banda 3 presenta 3 manchas en la comprobación de purificación con $R_f = 0.29, 0.37, 0.46$. Se aplicando una placa preparativa con R_f . la banda 3.1 de 0.17 y con

λ_{max} de 301 y 320nm correspondiente a la 5,6,7,8-tetrahidroxi-benzopirona, la 3.2 presenta Rf= 0.46 y 0.71, por lo que es necesario realizar una placa preparativa de esta, por su parte la banda 3.3 muestra un Rf= 0.97 con λ_{max} de 203 y 319 nm que corresponde a una cumarina.

La placa preparativa de la banda 3.2 permitió el aislamiento de la banda 3.2.1 que mostró un Rf= 0.61 con λ_{max} de 202, 274, 306 y 580 nm, por su parte la 3.2.2 indicó un Rf= 0.57 con λ_{max} de 203, 223 y 274 nm que corresponden a la 5,7-dihidroxi-8-metoxi-flavona.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Ser sumamente cuidadosos al momento de trabajar en el laboratorio, principalmente cuando se trata de solventes y/o reactivos corrosivos, volátiles, inflamables; en lo posible usar mascarilla, guantes, mandil.
2. Mantener todas las sustancias ya sean extractos, subextractos, fracciones y demás fuera de la incidencia de la luz y oxígeno para evitar la degradación de los compuestos presentes y así tener resultados más verídicos.
3. Seguir con el estudio del vegetal ya que existen muchas técnicas con las que se cuenta en la actualidad que permitirían mayor especificidad de resultados, además con la presencia de varios metabolitos, se debería determinar para que otras actividades farmacológicas es óptimo este vegetal.
4. Realizar convenios con otras universidades en el caso de no ser posible la adquisición de equipos, materiales y reactivos, como el espectrofotómetro de masas o de resonancia magnética nuclear, ya que mediante estos se pueden obtener resultados más concretos, claros y específicos, así para tener un conocimiento más profundo del vegetal en estudio.

CAPITULO VI

6. RESUMEN

El presente trabajo “SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y POSIBLE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL Escobillón rojo (*Callistemon speciosus*)”, se realizó en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias, para lo cual, se realizó la identificación botánica con el nombre de *Callistemon speciosus*, en el herbario de la ESPOCH, un extracto etanólico de la parte aérea por maceración y eliminación del solvente obteniéndose un líquido al que se determinó la propiedades físicas, los grupos fitoquímicos por reacciones de coloración, un primer fraccionamiento con cloroformo y butanol, los mismos que se determinan TLC, con diferentes solventes como Tolueno: Acetato de Etilo (93:7), Acetato de etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26), Cloroformo: Metanol (65:35) y revelado con sulfato de cerio. La presencia de manchas redondeadas y coloreadas determina la presencia de compuestos, los mismos que se purifican en cromatografía de columna y capa fina dependiendo de la complejidad y del número de manchas. Una vez purificadas se determinan los valores de UV. en aquellos que presentan grupos cromóforos.

Los grupos fitoquímicos son saponinas, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenolactonas, triterpenos. Los taninos catequicos, se cuantificaron por permanganometría dan 0.26 mEqg/13 ml. En el subextracto clorofórmico identificaron los siguientes compuestos: 7-hidroxi-flavona, 5,7-dihidroxi-3',4',5'-trihidroxi-flavonol y la 5, 7-dihidro-4'-hidroxi-flavona.

Del subsubextracto toluénico se logró establecer la estructura de los siguientes compuestos: ion anilino, 2,7-dihidroxi-2',3',5',6'-tetrahidroxi-4'-metoxi-isoflavona, β -sitosterol y el acetato de 2,3-dien-hexanona. En el subsubextracto metanólico se identificaron los siguientes compuestos: 7-metoxi-flavona, 5,6,7,8-tetrahidroxi-benzopirona, cumarina y 5,7-dihidroxi-8-metoxi-flavona.

Se recomienda realizar el análisis de espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear para establecer la estructura exacta de los metabolitos secundarios.

ABSTRACT

This work "SEPARATION, PURIFICATION AND POSSIBLE IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES of Escobillónrojo (*Callistemon speciosus*)", was held at the Natural Products Laboratory, Faculty of Sciences, for which, botanical identification was made with the name of *Callistemon speciosus*, in the herbarium of the ESPOCH, an ethanol extract of the aerial parts by maceration and solvent removal to give a liquid which was determined physical properties phytochemicals groups by color tests, a first fractionation with chloroform and butanol, the same determining TLC with different solvents such as: ethyl acetate (93:7), ethyl acetate: acetic acid: formic acid: water (100:11:11:26), chloroform: methanol (65:35) and developed with cerium sulfate, the presence of colored spots rounded determine the presence of compounds, they are purified by column chromatography and thin layer depending on the complexity and number of spots, once purified determining UV values, to those which have chromophores groups.

Phytochemicals groups are saponins, flavonoids, alkaloids, sesquiterpenolactonas, triterpenos, the catechic tannins were quantified by permanganometria giving, mEqg/13 0,26 ml. In chloroform subextracto identified the following compounds, 7-hydroxy flavone, 5, 7-dihydroxy-3',4',5'-trihydroxy-flavonol and 5, 7-dihydro-4'-hydroxyflavone.

From subsubextracto of toluene was possible to establish the structure of the following compounds: anilinium ion, 2, 7-dihydroxy-2', 3', 5', 6'-tetrahydroxy-4'-methoxy-isoflavone, B-sitosterol and ethyl 2,3-dien-hexanone. In methanolic subsubextracto were identified the following compounds: 7-methoxy-flavone, 5,6,7,8-tetrahydroxy-benzopyrone, coumarin and 5,7 -dihydroxy-8-methoxy-flavone.

It is recommended the analysis of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance to establish the exact structure of the metabolites.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **CUMANDÁ, J.**, Principios de Farmacognosia., Riobamba – Ecuador., CDR., 2000., pp.5.
2. **CUMANDÁ, J.**, Texto Básico de Farmacognosia., Riobamba – Ecuador., 2004., pp.10.
3. **DE RAFOLS, W.**, Aprovechamiento industrial de los productos agrícolas., 1era. Edición., Barcelona – España., Salvat., 1981., pp. 40-60.
4. **DOMÍNGUEZ, A.**, Métodos de Investigación Fitoquímica., DF. México – México., LIMUSA., 1979., pp.39,40.
5. **HOYOS-F, J.**, Arboles Tropicales Ornamentales Cultivados en Venezuela –Caracas., 2da Edición., Caracas – Venezuela., Nacional Venezuela., 1992., pp. 272.
6. **LOCK, O.**, Manual de Fitoterapia., Lima – Perú., 1era. Edición., Fondo Editorial PUCP., 1994., pp.41-44.
7. **MORALES, M. Y OTROS.**, Plantas medicinales y Medicina natural., 2a.Edicion., Santiago de Chile-Chile., Sociedad Chilena de Fitoterapia., 2009., pp. 20-30

8. **ALVARADO, B.,** Plantas Ornamentales., Revista forestal mesoamericana kurú., Vol. 9., No 22., Cartago – Costa Rica., 2012., pp. 23 – 29.

9. **GONZALES, A.,** Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Callistemon speciosus* DC. recolectado en los Estados Carabobo, Lara y Mérida., Revista de la Facultad de Farmacia Universidad de los ANDES Mérida- Venezuela., Vol. 45., Mérida – Venezuela., 2003., pp. 51-53.

10. **VOGELSANG, E.,** **Plantas** Ornamentales y Fitomedicina., Revista de la Facultad de Agronomía., La Plata - Venezuela., LUZ., 2011., pp. 157.

11. ***Callistemon speciosus***
<http://www.arbolesornamentales.es/Callistemon.htm>
http://www.conservacion.unalmed.edu.co/resultados_generales.php?sic_id=3921
http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/abril_junio2011/v28n2a2011157173.pdf
Consultado: 13-09-2012

12. **COMPOSICION QUIMICA “*Callistemon speciosus*”**
http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23845/1/carlos_guerra.pdf
Consultado: 13-09-2012

13. **CROMATOGRAFÍA**
http://organica1.org/1311/1311_6.pdf
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Thin.htm>
Consultado: 15-09-2012

14. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

<http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/cromatografias.htm>

http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

Consultado: 15-09-2012

15. DESCRIPCION BOTANICA “*Callistemon speciosus*”

http://asignatura.us.es/abotcam/especies/Callistemon_speciosus.html

Consultado: 13-09-2012

16. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

<http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>

Consultado: 16-09-2012

17. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

<http://html.monografias.com/espectroscopia-uv.html>

Consultado: 16-09-2012

18. EXTRACTO

<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/extractos/>

Consultado: 19-09-2012

19. FITOMEDICINA

<http://www.fitomedicina.cl/files/publicacion/Plantas%20Medicinales,%20Fitofarmacos%20y%20Fitomedicamentos.pdf>

Consultado: 08-09-2012

20. FITOMEDICINA Y FITOTERAPIA

<http://phytomedchile.blogspot.com/2006/04/fitomedicina-y-fitoterapia.html>

Consultado: 08-09-2012

21. LOS FITOFÁRMACOS

http://www.nexusediciones.com/pdf/gine2005_1/gi-6-1-004.pdf

Consultado: 08-09-2012

22. MACERACION

<http://herbolaria.wikia.com/wiki/Maceraci%C3%B3n>

Consultado: 16-09-2012

23. METABOLITOS SECUNDARIOS

<http://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-las-plantas>

Consultado: 16-09-2012

24. METODOS DE EXTRACCION

<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/>

Consultado: 16-09-2012

25. NOMBRES COMUNES “*Callistemon speciosus*”

<http://www.photomazza.com/?Callistemon-speciosus&lang=es>

Consultado: 13-09-2012

26. PLANTAS MEDICINALES

<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/introduccion-a-la-farmacognosia/plantas-medicinales/>

Consultado: 18-09-2012

27. PRINCIPIO ACTIVO

www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/farmacognosia/principio-activo/

Consultado: 19-09-2012

28. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

<http://farmacognosia-farmacologia.blogspot.com/>

Consultado: 23-09-2012

29. TAXONOMIA DEL “*Callistemon speciosus*”

[www.tec.ac.cr/sitios/.../Hisopo%20\(Callistemon%20speciosus\).pdf](http://www.tec.ac.cr/sitios/.../Hisopo%20(Callistemon%20speciosus).pdf)

Consultado: 13-09-2012