



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (*ACACIA FARNESIANA* (L.)
WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

José Gilberto Santos Solórzano

Asesorado por Ingeniero César Alfonso García Guerra

Guatemala, marzo de 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (*ACACIA FARNESIANA* (L.)
WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA

FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

JOSÉ GILBERTO SANTOS SOLÓRZANO

ASESORADO POR INGENIERO CÉSAR ALFONSO GARCÍA GUERRA

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, MARZO DE 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de López
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL VI	Br. Kenneth Issur Estrada Ruiz
VOCAL V	Br. Elisa Yazminda Videz Leiva
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivonne Véliz Vargas

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Sydney Alexander Samuels Milson
EXAMINADOR	Ing. Rodolfo Francisco Espinoza Smith
EXAMINADOR	Ing. Estuardo Monroy Benitez
EXAMINADOR	Ing. Adolfo Narciso Gramajo Antonio
SECRETARIO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (*ACACIA FARNESIANA* (L.) WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO”,

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha marzo de 2004.



José Gilberto Santos Solórzano



Guatemala, 11 de mayo de 2006

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director Escuela Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

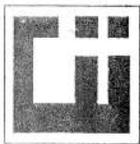
Estimado Ingeniero Álvarez.

Atentamente me dirijo a usted para informarle que ha sido concluido satisfactoriamente el trabajo de graduación titulado: **"IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (ACACIA FARNESIANA (L) WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO"** desarrollado por el estudiante de Ingeniería Química **JOSÉ GILBERTO SANTOS SOLÓRZANO** carné No. 97-12561.

Me permito informarle que después de haber realizado la revisión del respectivo informe y haberle hecho las correcciones pertinentes, considero que llena los requisitos para su aprobación.

Atentamente,

Ing. Qco. César Alfonso García Guerra
COORDINADOR AREA DE QUÍMICA
ASESOR



Guatemala, 19 de julio de 2006

Ing. Williams Alvarez Mejía
Director
Escuela de Ingeniería Química

Respetado Ing. Alvarez Mejía:

Atentamente me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que he revisado el informe final del trabajo de graduación del estudiante de Ingeniería Química José Gilberto Santos Solórzano, con número de carné 9712561, titulado "Identificación de las Principales familias de metabolitos secundarios de la flor del subín (*Acacia farnesiana* (L.) Willd) mediante un tamizaje fitoquímico".

Considero que el trabajo de graduación cumple con los requisitos para su aprobación.

Sin otro particular, me suscribo de usted.

Respetuosamente,


Inga. Telma Maricela Cano Morales
Revisora del trabajo de graduación
Colegiado 433

Jefa de la Sección de Química Industrial/CII





FACULTAD DE INGENIERIA

El Director de la Escuela de Ingeniería Química Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía M. Sc. Después de conocer el dictamen del Asesor con el Visto Bueno del Jefe del Departamento al trabajo de Graduación del José Gilberto Santos Solórzano titulado: "IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (ACACIA FARNESIANA (L.) WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FITOQUÍMICO.", procede a la autorización del mismo.



Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR ESCUELA INGENIERIA QUÍMICA



Guatemala, marzo de 2,007



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FLOR DEL SUBÍN (ACACIA FARNESIANA (L.) WILLD) MEDIANTE UN TAMIZAJE FOTOQUÍMICO**, presentado por el estudiante universitario **José Gilberto Santos Solórzano**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos
DECANO

Guatemala, marzo de 2007

/gdech



ACTO QUE DEDICO A

DIOS

Por darme la oportunidad de vivir y guiarme en el camino del bien.

MI MADRE

Odeth Solórzano, por apoyarme siempre en todos mis actos y decisiones.

MI PADRE

Gilberto Santos, por enseñarme y darme su ejemplo de ser una mejor persona.

MI ESPOSA

Rocío Alvarado, por su apoyo incondicional y amor profundo.

MIS HERMANOS

Luis Fernando y Rodrigo, por su ayuda, amistad y paciencia.

FAMILIA PINEDA

Por haberme ayudado y apoyado en la realización de este trabajo de graduación.

A MIS AMIGOS

Gustavo, Luisa, Julio, Pablo, Valeria, Carlota, Miguel y a todos los que saben que nuestra amistad es sincera y duradera.

AGRADECIMIENTOS A

Mi asesor, Ing. César García, Inga. Telma Cano Morales y la Licda. Zuly Cabrera, por el tiempo y paciencia dedicado a la elaboración del presente trabajo de graduación.

1. MARCO TEÓRICO

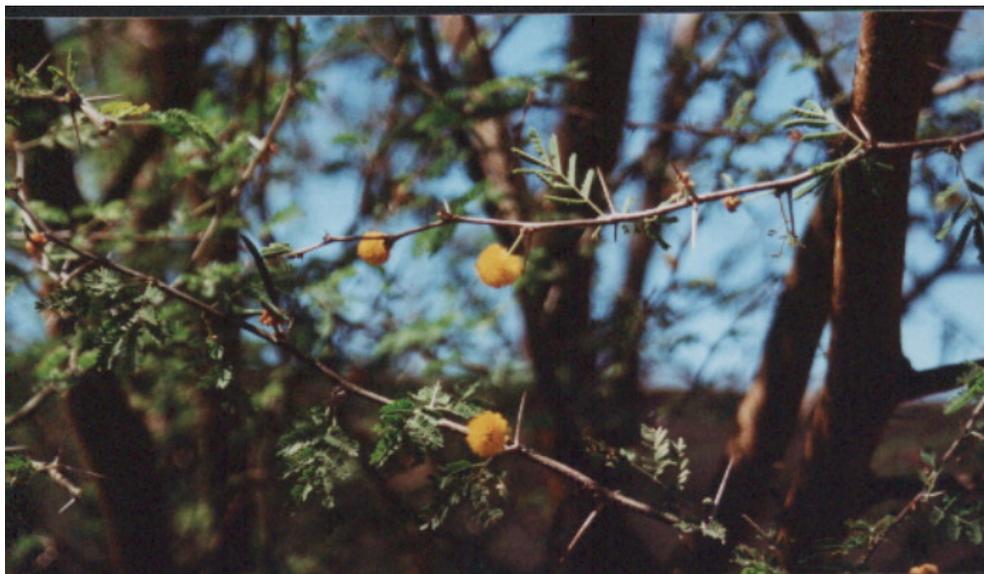
1.1 *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Subín.

Leguminosae Familia de las leguminosas.

Mimosoideae Subfamilia de las mimosas.

Acacia farnesiana (L.) Willd., conocido comúnmente como subín o huisache, es un arbusto o árbol pequeño caducifolio y de tallos múltiples caracterizado por una copa esparcida y densa, ramas espinosas y flores fragantes. El subín es nativo probablemente de las costas del Mediterráneo, aunque se ha naturalizado en muchas partes de los trópicos y subtrópicos del Nuevo y Viejo Mundo en donde ha sido introducido. **Es una especie útil para la reforestación de tierras secas degradadas; se usa también de manera extensa para combustible y para obtener maderos pequeños y, en el sur de Francia, en la industria del perfume.** En algunos lugares se le considera como una plaga debido a su habilidad para colonizar pastizales y otros hábitats perturbados. (Ref. 1)

Figura 1 Fotografía de la flor de subín



1.1.1 Habitat

1.1.1.1 Área de Distribución Natural y de Naturalización

El subín se considera como nativo solamente el sur de Francia, Italia y a otras partes a lo largo de la costa norte del Mediterráneo. Fue introducido al Nuevo Mundo durante los primeros años de la colonización española. El ejemplar botánico tipo descrito por Lineo fue recolectado en la República Dominicana. Después de su introducción, el subín fue esparcido por el ganado y por perturbaciones relacionadas al pastoreo, tales como el fuego, la corta de matorrales y el forrajeo. Se ha naturalizado a través de las Indias Occidentales; en el sur de los Estados Unidos, desde California hasta la Florida; México, la América Central; América del Sur hasta Chile y Argentina; y en muchas partes de los trópicos y subtropicos del Viejo Mundo, incluyendo la India, el Norte de África y Nigeria. Se encuentra presente en todos los continentes (entre las latitudes 30° N. y 40°.) y **es la especie de *Acacia* de distribución más extensa.** (Ref. 1)

Figura 2 Fotografía de arbustos del subín



1.1.2 Clima

El subín por lo general requiere de una precipitación anual promedio de entre 500 y 750 mm para un buen crecimiento, aunque puede sobrevivir en áreas que reciben una precipitación de tan solo 400 mm anuales, con una temporada seca de 4 a 6 meses de duración. En México, el subín crece en áreas con una precipitación de hasta 900 mm. La especie es resistente a la sequía y a los incendios, a la vez que susceptible a las heladas. El subín prospera en áreas en donde las temperaturas anuales promedio varían entre 15 y 28 °C, con unas temperaturas promedio de entre 25 y 32 °C durante los meses más calientes y unas temperaturas promedio de entre 2 y 10 °C durante los meses más helados. Sin embargo, en áreas en donde se ha naturalizado en la India, las temperaturas máximas promedio varían entre 30 y 40 °C durante los meses más calientes y las temperaturas mínimas promedio entre 4 y 24 °C durante los meses más fríos. (Ref. 1)

1.1.3 Suelos y Topografía

En México, el subín crece sobre una gran variedad de suelos, desde arcillas pesadas hasta arenas, aunque el mejor crecimiento ocurre en suelos bien drenados. En las áreas en la India en donde el subín se ha naturalizado, el árbol crece en suelos aluviales y se cultiva a través de la planicie Indo-Gangética en una variedad de tipos de suelos aluviales. Crece bien en arenas pobres en nutrientes en bosques secos y se considera como útil para la estabilización del suelo en tierras secas degradadas. El subín no es muy particular en cuanto al pH del suelo y tolera los suelos salinos. El árbol crece en rodales naturales a altitudes que van desde el nivel del mar hasta aproximadamente 2,000 m en México, y hasta una elevación de 1,000 m en la América Central. (Ref. 1)

1.1.4 Cobertura Forestal Asociada

En los bosques y matorrales xéricos de la Planicie de la Costa del Golfo en el noreste de México, el subín se encuentra asociado con *Acacia berlandieri* Benth., *A. rigidula* Benth., *A. wrightii* Benth., *Helietta parviflora* (A. Gray) Benth., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Pithecellobium flexicaule* (Benth.) Coulter, *P. pallens* (Benth.) Standl., *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. y *P. laevigata* (H. & B. ex Willd.) M.C. Johnst. En el oeste de México, el subín se encuentra asociado con *A. pennulata* (Schlecht. & Cham.) Benth. En áreas degradadas de bosques caducifolios; en el Estado de Morelos, está asociada con *A. bilimekii* Macbride, *A. cochlia-cantha* Humb. & Bonpl., *Cassia pringlei* Rose y *Willardia parviflora* Rose en matorrales secundarios. En bosques secos subtropicales a altitudes de hasta 2,000 m en Jalisco y Aguascalientes, el subín crece en asociación con *A. pennulata*, *Bursera bipinnata* (DC.) Engl., *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., *Heliocarpus terebinthaceus* (DC.) Hochr., *Hyptis albida* H.B.K., *Ipomea intrapilosa* Rose, *I. murocoides* Roem. & Schult, *Mimosa monancistra* Benth., *Opuntia fuliginosa* Griffiths y *Tecoma stans* (L.) H.B.K.

En otras partes de México, el subín forma rodales sucesionales densos en el suroeste de Puebla, en sitios con suelos bien drenados y profundos. En estos sitios, el subín es eventualmente reemplazado por *Prosopis* y *Pithecellobium*. **El subín es también común en bosques secundarios derivados de bosques subtropicales espinosos** en el sureste de San Luis Potosí, en donde crece asociado a *A. amentacea* DC., *Caesalpinia mexicana* Gray, *Cordia alba* (Jacq.) Roem. & Schult., *Diphysa minutifolia* Rose, *Harpalyce arborescens* A. Gray, *Pithecellobium calostachys* Standl., *Sapindus saponaria* L. y *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. En bosques caducifolios tropicales y arboledas espinosas en el Istmo de Tehuantepec, el subín se asocia comúnmente con *A. cornigera* (L.) Willd., *A. pringlei* Rose, *A. cymbispina* Sprague & Riley, *Amphipterygium adstringes* (Schlecht.) Schiede, *Bauhinia albiflora* Britt. & Rose, *B. pauletia* Pers., *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd., *C. eriostachys* Benth., *Caesaria*

nitida Jacq., *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem & Schult., *Croton guatemalensis* Lotsy, *D. floribunda* Peyr., *Haematoxylum brasiletto* Karst., *Jacquinia aurantiaca* Ait., *Pereskia konzattii* Britt. & Rose, *Piptadenia flava* Benth., *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. *P. tortum* Mart., *Prosopis laevigata* y *Randia aculeata* L. Es un componente menor en bosques dominados por *P. laevigata* a altitudes que varían entre 1,000 y 2,000 m en muchas partes de México, incluyendo gran parte del área al oeste del Istmo de Tehuantepec. (Ref. 1)

En Puerto Rico, el subín se ha naturalizado en matorrales y bosques en muchas regiones costeras secas y de piedra caliza seca y crece por lo común en asociación con *Pithecellobium dulce* y *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. En Barbados, el subín crece en formaciones arbustivas xerofíticas en laderas rocosas con *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Pisonia aculeata* L., *Psidium guajava* L., *Tecoma stans* y *Ziziphus mauritiana* Lam. (Ref. 1)

En la India, en donde el subín se ha cultivado y naturalizado a través de gran parte de las regiones más secas del país, ocurre con mayor frecuencia en bosques caducifolios secos, en particular en los lechos de río secos, en rodales puros o en asociación con *Dalbergia sissoo* Roxb. y *Tamarix dioica* Roxb. (Ref. 1)

En Guatemala se localiza en el oriente del país, en la parte baja del Valle del Motagua, principalmente sobre laderas o planicies secas, a menudo formando rodales densos de amplia extensión superficial. Se encuentra subín en los departamentos de: Guatemala, El Progreso, Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa y Santa Rosa también se encuentra en Huehuetenango y El Quiché. (Ref. 1)

1.2 Ciclo vital

1.2.1 Reproducción y Crecimiento Inicial

1.2.1.1 Flores y Fruto.

El subín puede florecer tan temprano como durante el segundo año después de la germinación, siendo capaz de producir vainas durante el tercer año. **La temporada de florescencia varía con el clima local**; en Puerto Rico los árboles se reportan en flor de noviembre a febrero, **de diciembre a marzo en la América Central** de enero a abril en el noroeste de la India y de septiembre a febrero en el este de la India. Las numerosas flores amarillas forman agregaciones globosas y fragantes, las cuales aparecen solas o en grupos de hasta tres al final de pedúnculos vellosos de 1.8 a 3.6 cm de largo. Las flores individuales consisten de un cáliz tubular (de 6 mm de largo) con cinco indentaciones, muchos estambres filiformes de 6 mm de largo y un pistilo (de 4.8 mm de largo) con un ovario estrecho y un estilo delgado. Las frutas, que generalmente se producen en gran abundancia a partir de los 3 años de edad aproximadamente, consisten de unas vainas gruesas y ligeramente aplastadas, de color pardo oscuro a casi negro a la madurez, de 3.6 a 7.6 cm. de largo y de 3 a 12 mm de ancho. Las frutas se forman rápidamente después de la florescencia, alcanzando su tamaño pleno en 2 a 4 meses y madurándose en 2 meses después. Una muestra de vainas recolectadas en Puerto Rico contuvo entre 11 y 23 semillas, con un promedio de 14.4 ± 1.2 , semillas por vaina (Ref. 1)

1.2.1.2 Producción de Semillas y su Diseminación.

Las semillas del subín son pequeñas, elípticas y ligeramente aplastadas, de 8 mm de largo y de color pardo con una testa dura. Mientras que la literatura indica que hay aproximadamente de 11,000 a 13,000 semillas por kilogramo, dos muestras de 100 semillas secadas al aire en Puerto Rico promediaron 0.132 ± 0.004 g y 0.130 ± 0.006 g

por semillas, respectivamente, o aproximadamente 7,600 semillas por kilogramo (observación personal del autor).¹ Mientras que el ganado es probablemente el principal medio de dispersión en pastizales, los vertebrados de menor tamaño que consumen semillas, tales como las lagartijas, se han reportado dispersando las semillas de subín hasta una distancia de 500 m del árbol materno en los bosques caducifolios de la América Central. A menos que sean ingeridas por el ganado, las vainas maduras permanecen adheridas al árbol por varios meses y caen al suelo por lo general sin mostrar dehiscencia. Las semillas se liberan de las vainas a consecuencia de la pudrición o por el daño por insectos. Las vainas (Ref. 1)

1.2.1.3 Desarrollo de las Plántulas.

La germinación en el subín es epigea. Las semillas pueden sembrarse sin tratamiento previo, aunque se reporta que el baño en agua fría por 48 horas o en agua caliente por entre 10 y 20 minutos mejora enormemente la germinación. Se ha observado que la incubación de las semillas a temperaturas de entre 60 y 70 °C por un período de 6 a 12 horas aumenta grandemente los porcentajes de germinación. La escarificación en ácido sulfúrico concentrado por entre 20 y 60 minutos o en ácido nítrico concentrado resultó de acuerdo a reportes en una germinación del 65 al 70 por ciento. La escarificación mecánica con papel lija parece ser la mejor técnica de tratamiento previo, resultando en una germinación de hasta el 98 por ciento. Parece ser que no hay una diferencia significativa en las tasas de germinación cuando la escarificación se efectúa antes o después del almacenamiento. Las semillas escarificadas mecánicamente colocadas sobre papel filtro en un plato petri comienzan a germinar dentro de un período de 6 días, con una tasa de germinación del 57 por ciento después de 13 días.¹ La germinación de las semillas es por lo común de entre el 10 y 40 por ciento para semillas frescas y sin tratar. Las semillas permanecen viables por 30 días o más cuando se almacenan bajo condiciones secas a temperatura ambiente. En el vivero, la profundidad óptima para la siembra es de entre 2 y 4 cm. Las plántulas del subín tienden

a producir una raíz pivotante profunda en suelos bien drenados. La regeneración natural del subín es abundante en rodales naturales. Las semillas germinan a menudo dentro de la vaina desprendida, resultando en una agrupación densa de plántulas. La germinación tiene lugar durante la temporada lluviosa, pero muchas de las semillas permanecen en etapa inactiva por un año completo antes de germinar. Debido a su producción prolífica de semillas, a ser preferidas por el ganado y a su germinación rápida en suelos perturbados, el subín puede colonizar pastizales con rapidez, formando a menudo rodales densos. Las plantaciones se pueden establecer mediante la siembra directa de las semillas o con plántulas en contenedores o plantas con las raíces desnudas. La siembra al vuelo de semillas escarificadas en pastizales en el estado de Tejas resultó de acuerdo a reportes en un 1 a un 2 por ciento de las semillas sembradas convirtiéndose en plántulas establecidas. El crecimiento durante el primer año puede ser rápido bajo las condiciones controladas del vivero; en pruebas efectuadas en la India, las alturas máximas de las plántulas 1 año después de la siembra fueron de 63 y 210 cm en almácigos de vivero abiertos a la lluvia e irrigados, respectivamente. Bajo condiciones de campo en sitios semiáridos, las alturas de las plántulas después de 1 año son típicamente de 30 a 50 cm. (Ref. 1)

1.2.1.4 Reproducción Vegetativa.

Se reporta que el subín se puede propagar de manera vegetativa mediante estacas. A pesar de que no existe información disponible sobre la reproducción vegetativa bajo condiciones de campo, la persistencia del subín en pastizales bajo forrajeo intenso, cortados mecánicamente y tratados con herbicidas, sugiere que la especie rebrota bien al ser cortada. (Ref. 1)

1.2.2 Etapa del Brinjal hasta la Madurez

1.2.2.1 Crecimiento y Rendimiento.

Los árboles maduros se caracterizan por tallos múltiples; una corteza pardo-oscuro y lisa; una copa muy ramificada y esparcida con ramitas en zigzag presentando espinas blanquecinas y apareadas, y un follaje verde claro. Las hojas son bipinadas compuestas, 5 a 10 cm. de largo, con 2 a 6 pares de pinas, cada una con 10 a 25 pares de hojuelas estrechas y sin pecíolos, de 3 a 9 mm de largo. La altura a la madurez generalmente varía entre 3 y 5 m (ocasionalmente hasta 10 m), dependiendo de la localidad. En plantaciones de 3 años de edad establecidas a un espaciamiento de 2 por 2 m en un sitio en México con suelos similares al tipo Vertisol y alcalinos y una precipitación anual promedio de 750 mm, el diámetro basal promedio y la altura arbórea promedio fueron de 3.9 cm y 1.5 m, respectivamente. La altura y el d.a.p. promedios se registraron como de 2.8 m y 4.3 cm, respectivamente, en plantaciones de 3 años de edad establecidas con un espaciamiento de 2 por 2 m en un sitio en Tamil Nadú, en la India, que recibió una precipitación anual promedio de 830 mm. Se reportó una altura arbórea promedio de 1.5 m en una plantación de 4 años de edad establecida mediante la siembra directa de semillas en un sitio en el Punjab que recibió una precipitación anual promedio de 760 mm. (Ref. 1)

1.2.2.2 Comportamiento Radical

La morfología de los sistemas radicales del subín es variable y puede ser dominada ya sea por raíces pivotantes profundas o raíces laterales de un alcance extenso, dependiendo de la profundidad a la que se encuentre el agua subterránea. **A igual que otros miembros del género *Acacia*, el subín forma por lo común asociaciones simbióticas con bacterias rizobiáceas, permitiéndole por lo tanto fijar el nitrógeno**

atmosférico. Se ha reportado que el hongo tipo micorriza *Endogone calospora* mejora el crecimiento de las plántulas. (Ref. 1)

1.2.2.3 Reacción a la Competencia

El subín es intolerante a la sombra y requiere de espacio para su crecimiento libre en viveros y plantaciones; de otra manera, la plántula de menor tamaño se ven suprimidas rápidamente por los individuos más vigorosos. Se ha interplantado exitosamente con *Pinus brutia* Ten. para la fijación del nitrógeno, a un espaciamiento de 1 por 1 m en sitios semi-áridos e infértiles en Irak. El subín es un competidor agresivo en pastizales y otros sitios perturbados. (Ref. 1)

1.2.2.4 Agentes Dañinos

El subín es susceptible al ataque por el anillador de las ramitas *Oncideres pustulatus* LeConte (Coleoptera: Cerambycidae) en el sur de Tejas. En Puerto Rico, las semillas y las vainas del subín son susceptibles al ataque por los escarabajos brúcidos. En otras partes, el ataque por *Mimosestes nubigens* ha sido reportado en Costa Rica y el ataque por el escarabajo brúcido del tamarindo (*Caryedon gonagra* Fabricius) en la India. Las vainas, cuando verdes, son atacadas por la mariposa de la granada *Virachola livia* Klug (Lepidoptera-Rhopalocera: Cycaenidae) en Egipto. Varios patógenos de las hojas y el tallo han sido reportados infectando al subín. *Corticium salmonicolor* Berk. & Br., la causa de la “enfermedad rosa”, ha sido reportado en Sierra Leone. Los patógenos fungales incluyen a *Ravenelia australis* Dict. & Neger, *R. hieronymi* Speg. y *R. siliquae* Long en Tejas; *R. spegazziniana* Lindquist **en Hawaii, los Estados Unidos continentales, México, Guatemala, Cuba y Puerto Rico**; *R. Acaciae farnesiana* P. Henn. en Brasil; *R. formosana* Syd. en Taiwán; una especie sin identificar de *Ravenelia* en Myanmar, Nueva Caledonia, Zambia y Etiopía, y *Uromycladium notabile* (Ludw.) McAlp en Nueva Zelandia y Australia. Otros patógenos. 9 foliares de menor importancia

incluyen a *Phyllachora acaciae* P. Henn. en las Indias Occidentales y Ecuador y *Camptomeris albizziae* (Petch) Mason en Dominica, Sudan, Kenya y Sudáfrica. Las enfermedades de las raíces que afectan al subín incluyen la pudrición de las raíces causada por *Clitocybe tabescens* Scop. ex Bres., reportado en la Florida, y *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dug., reportado en Tejas. El subín es el huésped del nematodo del nudo radical *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood en la India. La muerte de terminales sería causada por una especie de *Dothiorella* ha sido observada en Italia. (Ref. 1)

1.3 Usos

El subín se considera como una especie útil para rompevientos, la reforestación de bosques secos y áreas de pastizales degradados y para la estabilización de arenas móviles en regiones semi-áridas degradadas. En la India, el subín es cultivado y podado como un arbusto para jardines y como huésped del insecto de la laca. La albura es de blanca a amarillenta, el duramen de rojo a pardo rojizo. La madera es dura, de fibra estrecha y durable, con un peso específico de 0.79 a 0.84 g por cm. 3, y es útil para postes, el torneado, la ebanistería, implementos agrícolas y, particularmente, combustible. **La madera secada al aire tiene un valor calórico de 4.6 Kcal. /g. El perfume obtenido de las flores, conocido como “cassie”, se tiene en alta estima y ha llevado al cultivo en el sur de Francia y en otras partes del Mediterráneo.** En la América tropical, las flores secas se colocan entre las sábanas y en los armarios como un aromatizador. Las vainas y la corteza son ricas en taninos y se usan para el curtido, aunque al presente no en una escala industrial. **El árbol produce una goma de alta calidad que semeja en alto grado, y es a veces superior a, la goma arábiga obtenida de *Acacia nilotica* (L.) Delile. Un tinte negro, usado para tinta y para teñir cuero, se produce a partir de las vainas. El jugo espeso de las vainas es útil como un mucílago.** Se reporta que las hojas contienen compuestos cianogénicos. En México, el subín tiene muchos usos en la medicina tradicional. **Los extractos de las flores se usan**

en remedios para los dolores de cabeza y en el tratamiento de la indigestión. La fruta verde es muy astringente y una decocción de la fruta se usa para tratar la disentería y las inflamaciones de la piel. En San Luis Potosí, una decocción de las raíces se usa como un remedio que se cree efectivo para la tuberculosis. Las hojas secas y pulverizadas se aplican a veces como un cataplasma para las heridas. (Ref. 2)

En el África Occidental, las raíces a veces se mastican para aliviar la irritación de la garganta, y la corteza y **las flores astringentes se usan en una loción para las llagas y las enfermedades de la piel y en una poción para la diarrea. Las flores secas en polvo se toman oralmente por la tribu de los Bhils en Rajasthan (en la India) como un tratamiento para las enfermedades venéreas. El subín es una fuente importante de néctar y polen para la producción de miel en Cuba, dependiendo de la estación.** A través de su área de distribución, las hojas y las vainas del subín se utilizan como forraje para el ganado. (Ref. 2)

1.4 Genética

Entre las leguminosas mimosoides, pocas especies exhiben la complejidad sistemática de *A. farnesiana*, la cual se considera como un agregado de especies o microespecies. Entre las especies muy relacionadas pero segregadas del complejo de *A. farnesiana* se encuentran *A. smallii*, con una distribución en el sur de los Estados Unidos y el norte de México; *A. pinetorum* en el sur de la Florida, y *A. caven*, una especie extra-tropical de la América del Sur. Los sinónimos botánicos incluyen *A. cavenia* Bert, *A. leptophylla* DC. *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn. y *Mimosa farnesiana*. El subín es una especie tetraploide. (Ref. 1)

2. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA

Para la investigación fitoquímica de la flor del Subín, es necesario realizar extracciones reproducibles y cualitativas.

2.1 Tamizaje fitoquímico

Consiste en realizar una extracción por maceración a temperatura ambiente, con varios disolventes de diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua. Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes, **es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada** hasta alcanzar un estado de miel (rota evaporación). (Ref. 3-6)

En el caso de los extractos acuosos, se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar. **Además de extraer la planta con solventes apropiados, se aplican posteriormente reacciones de coloración que permiten la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.** (Ref. 3)

3. FAMILIAS DE COMPUESTOS A IDENTIFICAR

3.1 Aceites Esenciales

Son aceites muy livianos, contenidos en diferentes partes de las llamadas plantas aromáticas, algunas de las cuáles contienen la esencia principalmente en sus semillas (anís, eneldo, coriandro), en las cáscaras de su fruto (limón, bergamota, naranja), en las hojas (menta, eucalipto, tea-tree), en la madera (canela, sándalo, cedro), en las flores (jazmín, lavanda, ylang-ylang) en sus raíces (vetiver, jengibre, angélica) y otras finalmente en su resina (incienso, benjuí, mirra). (Ref. 6-7)

Estos aceites son, debido a su estructura molecular específica, tan livianos, que algunas de sus fracciones se evaporan a temperatura ambiente, hecho que es determinante para su uso en perfumes. Los "aceites esenciales" generalmente no dejan manchas, tal como sus parientes más pesados que son los aceites vegetales normales (girasol, sésamo, soja, etc.), los que a su vez tampoco dejarían manchas (por lo menos no de grasa), si se "evaporan" en su punto de evaporación, valga la redundancia, el cuál, a presión atmosférica, está arriba de 700 °C. (Ref. 6-7)

Se obtienen a partir de diferentes plantas mediante destilación, prensado o extracción por agentes. Usados diferentemente para fabricar fragancias, también tienen aplicación como sustancia beneficiosa en la aromaterapia y son muy apreciados para perfumar ambientes o como productos de baño. (Ver figura 1, anexo I)

3.2 Ácidos Grasos

Son compuestos constituyentes de las grasas, producto de la hidrólisis básica de grasas animales o vegetales. Éstos pueden ser saturados, monoinsaturados o

poliinsaturados. Si un ácido graso tiene todos los átomos de hidrógeno que puede soportar, se le llama saturado (serie esteórica). En cambio, si algunos de los átomos de hidrógeno están ausentes y la unión sencilla entre los átomos de carbón se ha reemplazado por una unión doble, es insaturada (serie oleica). Si hay sólo una unión doble, es monoinsaturada. Si hay más de una es polinsaturada (series linoleica y linolénica). (Ver figura 2, anexo I)

3.3 Agliconas de Flavonoides

Grupo alquilo o arilo que se encuentra unido a un azúcar (residuo glucósido) y constituyente parte de los denominados glucósidos naturales, que son sustancias derivadas de la glucosa, que se obtienen por el metabolismo de la misma, dando lugar a una parte activa en forma de aglucón (ésta posee efectos terapéuticos). Se extraen de las plantas mediante quimiosíntesis. Se usan en fitoterapia y medicina como laxantes (ruibardo, cambronería), reguladoras del ritmo cardíaco (digital, lirio de los vales, eléboro), aromáticas (sauce, arándano, brezo). (Ref. 6-7)

3.4 Alcaloides

Compuestos nitrogenados de origen vegetal. Pueden ser sólidos, solubles en alcohol o insolubles en el agua. Se extraen mediante el agua, alcohol, con álcalis y con disolvente. Son el resultado del metabolismo de los aminoácidos. Su función es reguladora y protege a la planta contra los insectos y parásitos. En medicina, farmacología y fitoterapia se emplean en estado puro o por infusiones se utiliza su cafeína (café, té) y en bebidas refrescantes (colas). Existen innumerables plantas que contienen alcaloides: opio, cafeto, té, cornezuelo del centeno, ruda, cicuta, belladona, eléboro. (Ver figura 3, anexo I)

3.5 Amidas

Cada uno de los compuestos orgánicos que se pueden considerar derivados de un ácido carboxílico por sustitución del grupo —OH del ácido por un grupo —NH₂, —NHR o —NRR (siendo R y R radicales orgánicos). Formalmente también se pueden considerar derivados del amoníaco, de una amina primaria o de una amina secundaria por sustitución de un hidrógeno por un radical ácido, dando lugar a una amida primaria, secundaria o terciaria, respectivamente. (Ref. 6-7)

Todas las amidas, excepto la primera de la serie, son sólidas a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición son elevados, más altos que los de los ácidos correspondientes. Presentan excelentes propiedades disolventes y son bases muy débiles. Uno de los principales métodos de obtención de estos compuestos consiste en hacer reaccionar el amoníaco (o aminas primarias o secundarias) con ésteres.

Las amidas son comunes en la naturaleza, y una de las más conocidas es la urea, una diamida que no contiene hidrocarburos. Las proteínas y los péptidos están formados por amidas. Un ejemplo de poliamida de cadena larga es el nailon. Las amidas también se utilizan mucho en la industria farmacéutica. (Ref. 6-7)

3.6 Antocianinas

Técnicamente, son conocidos como Flavonales. Son pigmentos hidrosolubles, a los que las flores, las hojas (sobre todo amarillas u otoñales) y los frutos, deben sus tintes rojos, violetas o azules. Fortalecen y hacen de puente entre las proteínas de colágeno. Las antocianidinas, siendo solubles en agua, también recogen radicales libres que se encuentran en los fluidos de los tejidos. Esta es una potente habilidad que beneficia especialmente a atletas y otras personas dedicadas a la actividad deportiva y física, debido a que el ejercicio extenuante genera gran cantidad de radicales libres. Se emplea como antioxidantes. (Ver figura 4, anexo I).

3.7 Antraquinonas y antracénoides

Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico, cuyos carbonos se enumeran.

Los compuestos antracénicos vegetales pueden clasificarse según su estado de oxidación en siete grupos estructurales:

- Antraquinonas
- Antronas
- Diantronas
- Antranoles
- Oxantronas
- Naftodiantronas
- Antrahidroquinonas
- Emoides

Las estructuras básicas de estos siete clases de compuestos antracénicos. Puede observarse en el caso de las diantronas (dímeros de las antronas), que el enlace que une las dos unidades básicas, es decir el enlace entre los carbonos 10 y 10', genera la posibilidad de isómeros CIS y TRANS a través del mismo. Además, si las dos unidades básicas son idénticas, se dice que son HOMODIANTRONAS (por ejemplo las senidinas A y B), mientras que si son diferentes, se las llama HETERODIANTRONAS (por ejemplo las senidinas C y D), **los emoides son derivados de ácido de la antraquinona, relacionado con pigmentos en plantas, hongos, líquenes e insectos.** (Ver figura 10, anexo I).

3.8 Carotenoides

Son polisoprenoides. Responsables del color amarillo, naranja, verde y rojo de diversas frutas y vegetales, como el tomate, perejil, naranja, espinaca, entre otros, y en algunos alimentos de origen animal como la yema del huevo. **Algunos de los carotenoides tienen la capacidad de transformarse en vitamina A en nuestro cuerpo de acuerdo a las necesidades.** Presentan una importante acción antioxidante. El alto consumo de carotenoides se asocia con un menor riesgo de cáncer. Además, tienen un efecto favorable sobre el sistema inmunológico y protegen a la piel de la radiación ultravioleta. (Ver figura 5, anexo I).

3.9 Compuestos Reductores

Compuestos que poseen una o varias funciones alcohólicas y una función pseudo aldehídica (aldosas) o cetónica (cetosas). Son importantes en la alimentación, la glucosa y la fructosa, que son directamente asimilables. La glucosa es producida en la escala industrial por la hidrólisis ácida del almidón. Se utiliza para preparar el suero glucosado en medicina y líquidos fisiológicos. (Ref. 6-7)

3.10 Cumarinas

Sustancia que se encuentra en muchos vegetales, siendo más abundantes cuando se secan. Se encuentra en hojas, frutas, semillas y raíces, mayormente en las gramíneas y umbelíferas. Da un olor agradable en el espliego, la asperilla olorosa, el tabaco, etc. Tipo de lactosas, se prohíbe su uso como saborizante por ser tóxico. Anticoagulante y aromatizante. (Ref. 6-7)

Características generales: Compuestos ampliamente repartidos en el Reino Vegetal. presentan una estructura básica de 2H-1-benzopiran-2-ona. Se originan por lactonización del ácido cis-O-hidroxicinámico o ácido cumarínico.

Clasificación: Hidroxi o metoxi cumarinas, Cumarinas isoprenílicas,
Piranocumarinas, Furanocumarinas. (Ver figura 6, anexo I).

3.11 Esteroles

En la naturaleza se encuentran una gran cantidad y **diversidad de sustancias con el núcleo esteroide, las cuales incluyen a los esteroides (o 3-hidroxiesteroides)**, los esteroides con grupos carbonilo (también denominados oxa- o cetoesteroides), los esteroides con grupos amino en el núcleo o la cadena lateral (alcaloides esteroideos) y los cardenólidos (o cardiotónicos) entre otros.

Estos a su vez se les encuentra en forma libre, esterificados con ácidos grasos o glicosidados .A continuación se describen algunos aspectos generales de los esteroides más distribuidos, haciendo un énfasis especial en su elucidación estructural. (Ref. 4)

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (También llamados agliconas esteroideos), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales o esteroides insaturados poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5.

En los animales superiores (Incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (Hormonas, Ácidos biliares, Vitamina D, etc.). **En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados**

fitosteroles: β -Sitosterol, ampesterol y Estigmasterol. Un esteroles menos común es el Fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco (*Cocos nucifera L*). (Ver figura 7, anexo I).

Los esteroides naturales conocidos presentan las siguientes características estructurales:

- Los enlaces dobles en el núcleo se presentan principalmente en C-5, C-7, C-8 y C-9.
- Los enlaces dobles en la cadena lateral se presentan especialmente en C-22, y con menor frecuencia en C-24 y C-25.
- Además de los grupos metilos 18, 19, 21, 26 y 27, es frecuente encontrar grupos metilo en C-24, menos frecuente en el C-4.
- La cadena lateral presenta grupos alquilo (metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc.) principalmente en C-24.
- Algunos organismos poco evolucionados (invertebrados marinos, orquídeas, etc.) presentan esteroides con modificaciones en la cadena lateral (anillos ciclopropano, dobles enlaces alénicos, metilaciones en C-26 y C-27, ausencia del C-25, etc.), y con núcleos modificados.

3.12 Flavonoides

Derivados polihidroxilados de las estructuras básicas del 2 fenil cromano. Reduce fragilidad capilar, protegen frente a estados tóxicos, antiinflamatorios y colorantes, combaten alergias, agregados plaquetarios, radicales libres, microbios, virus, tumores, hipertensión, protegen el sistema circulatorio. Reducen el riesgo de varios tipos de cáncer y algunos trastornos de la vista. Se encuentra, por ejemplo, en la manzanilla. (Ver figura 8, anexo I).

3.13 Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de -lactona , β -insaturada o -lactona- , β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca. Se conocen entonces según el anillo lactónico dos grandes clases de cardiotónicos: Los CARDENOLIDOS, con anillo de -lactona, y los BUFANOLIDOS O ESCILANOLIDOS, con anillo de -lactona. Dentro de las recetas o pócimas que utilizaban las brujas para curar enfermedades estaba como ingrediente la piel de sapo, muchos años después se comprobó la presencia de sustancias bioactivas: Los bufanólidos, presentes en ranas del género Bufus.

3.14 Mucílagos

Se componen en su mayor parte de polisacáridos (pentosanas y hexosanas), fermentos, productos de oxidación y elementos minerales. Al mezclarse con el agua da como resultado una sustancia viscosa de aspecto gelatinosa. Poseen un amplio espectro de actuación: como antiinflamatorias, emolientes (ablandan) y vulnerarias (cicatrizan), protectoras de las mucosas antidiarréicas (baja dosis) y laxantes (altas dosis), antibióticas. En fitoterapia se emplean a modo de infusiones para resolver problemas del aparato respiratorio y como cataplasmas para aliviar los dolores producidos por traumatismos. Se encuentran en gran proporción en algas, algunos bulbos, tubérculos, plantas carnosas. Dentro de los mucílagos, se distinguen también las pectinas que se hallan en frutas y verduras. (Ver figura 9, anexo I). (Ref. 4)

3.15 Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros de cadena lineal o ramificada, unidos a través de enlaces glicosídicos, sus monosacáridos son galactosa, fructosa y glucosa,

siendo esta última la mayoritaria, pues está presente en un gran número. Estos carbohidratos tienen un alto peso molecular y son insolubles en agua. De los polisacáridos más utilizados en la industria de alimentos se tiene almidones, celulosas, pectinas, gomas, exudados de plantas, entre otros. (Ref. 4)

3.16 Saponinas

Son glucósidos presentes en muchas plantas. Son compuestos solubles en agua, incoloros y amorfos. Forman emulsiones muy espumosas y coloideas, por lo que son empleadas para la fabricación de jabones y lejías. La solubilidad en agua de estos compuestos está facilitada por su alto peso molecular y la presencia de los residuos de monosacáridos y de otros grupos polares en la aglicona. En fitoterapia, se usan porque produce un aumento en la liberación de glóbulos rojos (esto hace de ellas sustancias peligrosas, pues pueden llegar a ser tóxicas). En medicina se emplean como diuréticos, expectorantes, desinfectantes del aparato genitourinario. Plantas ricas en saponinas son el gordolobo, ginseng y saponaria, entre otras. **Presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida:** a) **producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cual es la base de la reacción de selivoflo empleada en el tamizaje fitoquímico;** b) producción de hemólisis de los glóbulos rojos por la mayoría de ellas, propiedad que se aprovecha en las técnicas en que se cuantifica la potencia de estas sustancias; c) producción de una reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchad. Por lo general, las saponinas esféricas en esta prueba manifiestan colores que van desde el azul hasta el verde, y las saponinas triterpénicas, rosada, rojo o violeta. Además, la mayoría de las saponinas son solubles en diferente grado en soluciones de etanol al 80% propiedad que se emplea en diversas técnicas para su extracción y purificación. (Ver figura 11, anexo I). (Ref. 4)

3.17 Taninos Catéquicos y Taninos Gálicos

Son cada uno de los compuestos ternarios del carbono, hidrógeno y oxígeno. Suelen en la familia de las fanerógamas (roble, encinas) y en algunas criptógamas. Son solubles en agua, acetona y alcohol. En medicina natural se emplean para combatir la tos, la bronquitis, las quemaduras, heridas (coagulante), hemorroides, diarreas, excesiva sudoración. Industrialmente se usan para dar al cuero un aspecto más curtido. Los taninos catéquicos son sustancias que los ácidos no hidrolizan; los ácidos fuertes con calor o los agentes de oxidación, los convierten en rojas u oscuras. (Ref. 4)

Tienen propiedades astringentes de uso externo y antidiarreico. **Los taninos gálicos son ésteres del ácido gálico y ácido digálico con dos osas, generalmente la glucosa y la hamamelosa (derivado de la ribosa).**

3.18 Triterpenos

Constituyen los llamados aceites esenciales, que son compuestos de varias sustancias orgánicas volátiles o aromáticas, que pueden estar constituidos por alcoholes, acetonas, cetonas, éteres aldehídos y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae, preferentemente, por arrastre de vapor o por solventes orgánicos. Las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las Labiadas y las Umbelíferas. Las propiedades curativas son variadas y abundantes. Por lo general, poseen propiedades sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes. Dado que son compuestos volátiles, son eliminados por las vías respiratorias y actúan como expectorantes. (Ref. 4,6-7)

Algunas plantas poseen aceites esenciales que aumentan la diuresis (caléndula) y otras poseen efectos anti-histamínicos (manzanilla). Útiles en perfumería, farmacia y en la preparación de determinados alimentos. Previenen las caries y actúan

como agentes anti-ulcerativos. Se unen al estrógeno e inhiben los procesos inflamatorios por supresión de la actividad de ciertas enzimas. (Ver figura 12, anexo I).

4. METODOLOGÍA

4.1 Muestra

Tres extractos diferentes, en solventes de naturaleza distinta Hexano, Etanol y Agua, extraídos por lixiviación y proceso de extracción Soxhlet de la flor del Subín.

4.2 Materiales

4.2.1 Recursos humanos

José Gilberto Santos Solórzano (Tesisista).

Ing. César Alfonso García Guerra (Asesor).

4.2.2 Institucionales

Laboratorio de Química del Centro de Investigaciones de Ingeniería, edificio T5 ciudad universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.

4.2.3 Equipo

Baño de María ($60^{\circ}\text{C} \pm 1$).

Cronómetro.

Equipo de destilación por arrastre de vapor.

Equipo de filtración al vacío.

Unidad Soxhlet

Unidad de extracción por maceración a temperatura ambiente.

4.2.3 Materiales

- Beacker de 10 ml
- Beacker de 100 ml
- Beacker de 250 ml
- Beacker de 5 ml
- Beacker de 50 ml
- Capilares.
- Cámara de cromatografía (cromato cámara).
- Cromato placas Silicagel 60F254.
- Gradilla.
- Lámpara UV 366 mm.
- Macropipeteador.
- Masking Type o Crayon Graso.
- Mechero.
- Papel filtro.
- Papel parafilm.
- Pinzas para crisol.
- Pinzas para tubo de ensayo.
- Pipetas de 1 ml serológicas
- Pipetas de 2 ml serológicas
- Pipetas de 3 ml serológicas
- Pipetas de 5 ml serológicas
- Pipetas de 300 ml serológicas
- Tubo de ensayo de 20 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Cajas de Petri con agar sangre.

4.2.4 Reactivos

- Acetato de etilo (grado analítico).
- Ácido acético (grado analítico).
- Ácido fórmico (grado analítico).
- Ácido sulfúrico 99% (grado analítico).
- Anisaldehído.
- Hematoxilina.
- KOH 0.5 M.
- Lugól.
- Magnesio metálico.
- NH_4OH 25%.
- Reactivo de Carr-Price.
- Reactivo de Fehling.
- Reactivo de Kedde.
- Reactivo de Komarowsky.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de productos naturales (NP/PEG).
- Reactivo de sangre/agar sangre.
- Reactivo de Séller-Killiani.
- Reactivo de Wagner.
- Reactivo Dragendorff.
- Reactivo Liebermann-Bouchard.
- Solución gelatina al 1%.(p/V).
- Solución gelatina-sal.
- Solución KOH etanólica al 5%.
- Test de amonio.
- Timol.
- Vainillina.

4.2.5 Estándares

- Antraquinonas al 0.1% en metanol.
- Colesterol en cloroformo 0.1%.
- Cumarinas al 1% en metanol.
- *Digitalis Purpúrea* en metanol.
- Flavonoides al 0.05% en metanol.
- *Papaverina*
- *Atropina*
- *Respina*
- *Naringenina*
- *Quercetina*
- *Ácido Clorogénico*
- *Saponinas*
- *Rojo Sudán*
- *Ácido para-cumarínico*
- *Rutina*

4.3 Métodos

4.3.1 Obtención de la muestra vegetal

Se colectaron las flores del Subín en el municipio de Guastatoya, departamento El Progreso. Con una latitud de 14° 51'18'' y una Longitud de 90° 04'12''. Luego las flores fueron secadas con Silicagel.

El total de recolección para las extracciones fue de 100 g

4.3.2 Preparación de los extractos vegetales del Subín

Los extractos se prepararon en dos condiciones diferentes de temperatura: en caliente (60°C-85°C) y a temperatura ambiente.

Para la preparación del extracto en caliente se pesó 10g de la muestra para cada solvente y se colocó en un dedal de extractor Soxhlet, previamente secado. Luego se realizó los ciclos de extracción por ebullición del solvente.

Al sistema Soxhlet armado se le agregaron 100 ml de solvente, se realizó con hexano, etanol y agua, cada uno por separado.

A cada extracto se le aplicó 70, 80 y 90°C respectivamente durante 24 horas continuas en reflujo.

Para la preparación del extracto en frío se pesó 20 g de la muestra y se agregó 175 ml de cada solvente hexano, etanol y agua. Se colocó en un earlenmeyer de 250 ml, agitándolo con un agitador magnético durante 24 horas.

En ambos procedimientos, en caliente y en frío, se filtró utilizando equipo de filtrado al vacío y papel filtro Watmann 1.

4.3.3 Determinación de las principales familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano, etanol y agua de la flor del Subín (*marchas analíticas*)

Tanto en los extractos obtenidos en frío y en caliente se le realizaran la totalidad de las pruebas descritas a continuación (Ref. 8):

4.4 Determinación de la presencia de aceites esenciales

Se tomarán 5 gramos de la muestra vegetal, se extraerá el aceite mediante un equipo de extracción de aceites esenciales mediante arrastre de vapor, durante 3 horas, luego se separa y se determinará la cantidad de aceite.

4.4.1 Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más aceites esenciales

Se tomarán 10 ml de una alícuota disuelta en etanol y se destilarán con arrastre de vapor, al destilado, se le efectuaran extracciones con éter (2 X 20 ml), con la porción etérea obtenida se realizará CCF hexano/éter 8:2 manchas coloreadas en la cromato placa representaran la presencia de aceites esenciales.

4.4.2 Determinación de la presencia de azúcares reductores

Se tomará una alícuota de 5 ml y se le agregaran 5 ml de reactivo de Fehling, se dejará en reflujo durante 30 min. , un precipitado de color ladrillo, representa la presencia de compuestos reductores.

4.4.3 Determinación de la presencia de Agliconas flavonoides

Se tomará una alícuota de 5 ml y se evaporará, el residuo se disolverá en 2 ml de Metanol caliente, se adicionarán limaduras de Magnesio más 1 ml de HCl concentrado. Se deja reposar 10 minutos, una **coloración rubia rojiza** representa la presencia de agliconas flavonoides.

4.4.4 Determinación de la presencia de Alcaloides

Se tomará una alícuota de 10 ml, se evaporará a sequedad en baño de maría, el residuo que se obtendrá se disolverá en 3 ml de HCl al 2%, esta suspensión se dividirá en 3 alícuotas de 1 ml cada una; a cada una de esas alícuotas se les agregará Reactivo de Meyer, Reactivo de Wagner y Reactivo de Dragendoff, reacciones de precipitación representa la presencia de alcaloides.

4.4.5 Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más alcaloides

Esta prueba se realizará si y solo si la prueba química da resultados positivos. De las mismas alícuotas de origen se realizará una aplicación de la muestra de un volumen de 100µl en la cromato placa de silicagel 60F₂₅₄. Se utilizarán como estándar: Soluciones al 1% de atropina y papaverina en metanol (10 µl) como fases móviles: Tolueno-ácido acético – dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1), Detección: Reactivo de Dragendorff a 254 VIS.

4.4.6 Determinación de la presencia de Antocianinas

Se tomará una alícuota de 5 ml, se elevará el pH de la solución a 9-10, **coloración verde, castaño o azul** representa la presencia de antocianinas.

4.4.7 Prueba CCF para determinar la presencia de Antocianinas

De las mismas alícuotas de origen se realizará una aplicación de la muestra de un volumen de 100µl en la cromato placa de silicagel 60F₂₅₄. Se utilizarán como estándar: antocianinas, azul de metileno, amarillo naftol y rojo de sudán; como fases móviles: n-butanol-ácido acético glacial-agua(40:10:20) Detección:

forma zonas rojas, violetas o azules (VIS); anisaldehído-ácido sulfúrico zonas rojo-violetas (VIS)

4.4.8 Determinación de la presencia de Antraquinonas

Se tomará una alícuota de 10 ml y se concentrará hasta 2ml, el residuo se disolverá en 30 ml de agua, se filtrará y se realizará una extracción con 10 ml de benceno. A la fase bencénica se le añadirán 5 ml de la solución de test de amonio y se agitará, **cambio de color rojo a rosado en la fase alcalina** denota la presencia de antraquinonas.

4.4.9 Determinación de la presencia de Antracénoides

Se tomará una alícuota de 5 ml y se evaporará, el residuo se disolverá en 3ml de hidróxido de amonio al 25%, **una coloración roja** representa la presencia de antracénoides.

4.4.10 Determinación de la presencia de Carotenos

Se tomará una alícuota de 5 ml, se evaporará, se adicionará 3 gotas de cloroformo y se le agregará en gotas reactivo de Carr-Price, la **reacción de precipitación** de este reactivo, representa la presencia de carotenos.

4.4.11 Determinación de la presencia de Chalconas y Flavofenos

Se tomará una alícuota de 10 ml y se evaporará, el residuo se disolverá en 20 ml de HCl al 10%, se calentará durante 10 min. una **coloración roja** inmediata representa la presencia de chalconas y la formación de polímeros insolubles de **color café-rojizo**, representa la presencia de flavofenos.

4.4.12 Determinación de la presencia de Cumarinas

Se tomará una alícuota de 5 ml y se evaporará, el residuo se disolverá en 1 ml de agua hirviendo, se aplicará con microcapilar 2 manchas en papel filtro, se aplicará en una de las dos manchas 1 gota de KOH 0.5M, **fluorescencia a la longitud de onda de 366 nm**, representa la presencia de cumarinas.

4.4.13 Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Cumarinas

Se tomará una alícuota de 10 ml se concentrará hasta 1 ml, se aplicará con microcapilar 20 µl en una cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄.

Se utilizará como estándar solución de cumarinas al 1% en metanol (10 µl), como fases móviles: Tolueno-Acetato de etilo (93:7), Tolueno-éter (1:1, saturado con ácido acético al 10%) y para la determinación: solución etanólica de KOH al 5%, UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

4.4.14 Determinación de la presencia de Flavonoides

Se tomará una alícuota de 10 ml y se evaporará, el residuo se disolverá en metanol al 50%, seguidamente se le agregaran limaduras de Mg y 1ml de HCl concentrado y se esperará 10 minutos la reacción, una **coloración roja** representa la presencia de flavonoides.

4.4.15 Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Flavonoides

Se tomará una alícuota de 10 ml se concentrará hasta 1 ml, se aplicará 25-30 µl en una cromato placa de silicagel 60F₂₅₄. Como estándares se utilizaran: soluciones de flavonoides al 0.05% en metanol (10), como fases móviles: acetato de etilo-ácido fórmico- ácido acético (100:11:11:27) y para la detección: Reactivo de productos

naturales (NP/PEG) y se le aplicará fluorescencia intensiva en UV-365 nm, **fluorescencia varias**, representa la presencia de flavonoides.

4.4.16 Determinación de la presencia de Glucósidos cianogénicos

Se pesaran 2-5 g de material vegetal pulverizado en un earlenmeyer de 125 ml, humedecerlo con agua y agregar un 1 ml de cloroformo. Introducir una tira de papel filtro Whatman No.1 en picrato de sodio recién preparado, y secar, insertar la tira en el earlenmeyer conteniendo el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar el papel a una distancia de 1 cm de la muestra, doblar el papel y tapar el recipiente con un corcho, calentar en baño de maría (37°C) durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (**de color amarillo a rojo o rojo-café**) presencia de Glucósidos cianogénicos.

4.4.17 Determinación de la presencia de Lactosas insaturadas

Se tomará una alícuota de 30 ml y se concentrará hasta 5 ml, se colocarán 3 manchas de (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro, se dejará secar y se les agregarán a cada mancha unas gotas de reactivo de Kedde, se dejará secar el papel filtro y observaran los **cambios de color en una anillo o mancha púrpura**, lo que indica la presencia de lactosas insaturadas, se utilizará un estándar de *Digitales purpúrea* en metanol al 80%.

4.4.18 Determinación de la presencia de principios amargos

Se tomará una alícuota de 10 ml y se concentrará hasta 2ml, se aplicará 40µl en una cromato placa de silicagel 60F₂₅₄. Se utilizará como estándar: Solución de sustancia de referencia artemisina al 1% en metanol (20µl) y como fases móviles: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8), cloroformo-metanol (95:5) y para la detección:

vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zona **rojas-violetas, café-rojas, azules-verdes**, Reactivo de Lieberman-Buchard: UV-365nm, gris, café; VIS: **café oscuro, gris**, denotan la presencia de principios amargos.

4.4.19 Determinación de la presencia de Saponinas

Se tomará una alícuota de 5 ml, se le agregará 45 ml de agua, se calentará la mezcla a 60°C durante media hora, se agitará durante 10 min. Si se mantiene la **espuma 30 min. a más de 3 cm de altura**, representa la presencia de saponinas.

4.4.20 Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Saponinas

Se tomará una alícuota de 10 ml se concentrará hasta 5 ml, se aplicará 25-40 µl en una cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄. Se utilizarán como estándar: solución de saponinas al 0.1% en metanol (10µl) y como fases móviles: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40), la detección: reactivo de sangre: zonas hemolíticas **blancas en fondo rojo**; reactivo de Liebermann-Bouchard: UV 365nm o VIS **zonas azules y verdes** de saponinas esteroidales, **rojas y violetas** de triterpenoides. Reactivo de Komarowsky: **zonas azules, amarillas y rojas**. Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: **zonas azules, violetas, amarillas**, representan la presencia de saponinas.

4.4.21 Determinación de la presencia de Taninos gálicos y catéquicos

Se tomará una alícuota de 5 ml, se le agregará 2 ml de agua caliente, se dejará enfriar y se separa en 4 tubos de ensayo (a, b, c, d).

Al tubo “a” con la porción de alícuota, se le agregará 4-5 gotas de gelatina al 1% (p/v).

Al tubo “b” con la porción de alícuota, se le agregará 4-5 gotas de solución gelatina sal.

Al tubo “c” con la porción de alícuota, se le agregará 5 gotas de FeCl_3 al 1%.

Al tubo “d” se conserva como blanco.

Precipitados y cambios de color, representa la presencia de taninos gálicos si el color es **azul** y de taninos catéquicos si el color es **verde**.

4.4.22 Determinación de la presencia de Triterpenos/esteroles

Se tomará una alícuota de 5 ml se le agregará reactivo de Liebermann-Bouchard, **reacción coloreada**, representará la presencia de triterpenos/esteroles.

5. RESULTADOS

Tabla I. Resultados obtenidos de la presencia de familias de metabolitos secundarios a la flor del Subín

METABOLITOS PRESENTES	Prueba por Análisis Químico						Prueba por Cromatografía					
	Extracción con soxleth			Extracción a 20°C			Extracción con soxleth			Extracción a 20°C		
	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACUOSO
Aceites esenciales			+			+						
Agliconas flavonoides	+	-	+	+	-	+						
Alcaloides	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Antocianinas	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Antracenooides	-	-	-	-	-	-						
Antraquinonas	-	-	+	-	-	+						
Cardenolicos y bufadienolicos *Lactonas insaturadas	-	-	-	-	-	-						
Carotenoides	+	+	+	+	+	+						
Chalconas	-	-	+	-	-	+						
Compuestos reductores	+	-	+	+	-	+						
Cumarinas	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Flavones	-	-	-	-	-	-						
Flavonoides	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Glucosidos cianogenicos			-			-						
Mucílagos	+	+	+	+	+	+						
Principios amargos							+	+	+	+	+	+
Saponinas	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Taninos catéquicos	+	-	+	+	-	-						
Taninos gálicos	-	-	-	-	-	-						
Triterpenos/esteroles	-	-	-	-	-	-						

Positivo	+
Negativo	-
No se realizó análisis	

Fuente: Análisis realizado por Jose Santos

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación de las familias de metabolitos secundarios de la flor del subín (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.), se realizó en tres extractos, el proceso de la extracción se realizó por medio de dos técnicas diferentes, una aplicando calor con reflujo en extractores Soxhlet y otra por medio de agitación a temperatura ambiente (20°C), denominada lixiviación. El objetivo principal de estas extracciones fue determinar **cual era la mejor técnica para recuperar compuestos activos de la planta, siendo esta, la técnica de lixiviación**, debido a que con esta la cantidad de compuestos que se degradan es mínima.

Las técnicas utilizadas para la determinación de familias de metabolitos secundarios son referidas por Sharapin (Ref No. 8) las cuales son técnicas cualitativas libre de procedimientos instrumentales, con un espectro más amplio de indentificación. Además **se utilizó cromatografía de capa fina como una técnica confirmatoria opcional para las familias de alcaloides, antocianinas, cumarinas, flavonoides, principios amargos y saponinas**.

El criterio que se utilizó para determinar la presencia o ausencia de un metabolito en la flor del Subín es que **si el mismo extracto comparado en frío y caliente uno da resultado positivo(+)** y **otro da resultado negativo (-)**, se concluye que la técnica tiene restricciones por la temperatura.

Con los extractos utilizando como solvente el etanol, se determinó que para **las familias de agliconas flavonoides, carotenoides, compuestos reductores, mucílagos, y taninos catéquicos no hubo restricción de temperatura, pero si para las familias de alcaloides y cumarinas**. Las cuales no coinciden con el resultado en la

prueba de cromatografía, las cuales confirman que para el etanol no existe restricción de temperatura

Con el solvente del hexano y en la prueba cualitativa, la detección es bajo para las dos familias de metabolitos: carotenoides y mucílagos, contrario a las pruebas por cromatografía, en las que se lograron identificar antocianinas, cumarinas, flavonoides, principios amargos y saponinas, existiendo solamente una restricción de temperatura para las cumarinas.

Utilizando **el agua como solvente extractor, resultó un mejor rendimiento para la extracción de familias de metabolitos secundarios** siendo estos: los aceites esenciales, agliconas flavonoides, alcaloides, antocianinas, antraquinonas, carotenoides, chalconas, compuestos reductores, flavonoides, mucílagos, principios amargos y saponinas, confirmándose algunas de estas con sus respectivas pruebas cromatográficas.

No fue posible en este estudio evidenciar los siguientes familias de metabolitos secundarios, antracénoides, cardenólicos y bufadienólicos, flavonoides, gluosidos cianogénicos, taninos gálicos y triterpenos/esteroles, concluyéndose que estos no se encuentran presentes en la flor del Subín.

Para los aceites esenciales también se determinó presencia de familia de metabolitos secundarios por medio de arrastre de vapor, **donde se determinó un rendimiento del 0.18%**

Con estos resultados solo se confirma degradación o restricción de temperatura para las familias alcaloides y cumarinas las cuales tiene un efecto directo sobre estas cuando se les aplica calor.

Se concluye que la técnica implementada de tamizaje fitoquímico es posible determinar una amplia gama de familias de metabolitos secundarios, aunque se observó que se logra detectar mejor la presencia de familias de metabolitos secundarios cuando se realiza por medio de placas cromatográficas, teniendo el inconveniente que este proceso a parte de ser más costoso, es más difícil de realizarlo por lo complejo.

CONCLUSIONES

1. Con base al tamizaje fitoquímico la flor del Subín presenta los siguientes familias de metabolitos: aceites esenciales, agliconas flavonoides, alcaloides, antocianinas, antraquinonas, carotenoides, chalconas, compuestos reductores, cumarinas, flavonoides mucílagos, principios amargos, saponinas, taninos catéquicos.
2. Las dos familias de metabolitos secundarios que se encontraron con mayor fuerza en las pruebas químicas fueron los carotenoides y los mucílagos.
3. En la cromatografía de placas (CCF) las familias de metabolitos secundarios que se lograron determinar en todos los extractos fueron los flavonoides, principios amargos y las saponinas.
4. El agua es el mejor solvente extractor para identificar la mayoría de familias de metabolitos secundarios.
5. La restricción por la temperatura influyó en las familias de alcaloides y cumarinas, para las demás familias no se observó degradación de los metabolitos secundarios por la aplicación de calor al lixiviar.
6. Por la cromatografía de placas (CCF) es más efectiva y confiable para la identificación de las familias de metabolitos secundarios.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el tamizaje fitoquímico para las demás partes de la planta Subín, ya que esta tiene muchas propiedades farmacéuticas e industriales que no han sido explotadas.
2. Esta investigación puede ser utilizada como una guía práctica para la realización de otros tamizajes fitoquímicos en plantas que se observe potencial en su aprovechamiento medicinal.
3. Implementar la técnica de cromatografía de placas (CCF), para seguir realizando tamizajes fitoquímicos en otras plantas medicinales.

BIBLIOGRAFÍA

1. ACACIA FARNESIANA.PDF
www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/Acaciafarnesiana.pdf
Marzo 2004.
2. ACACIA FARNESIANA.HTML
www.semarnat.gob.mx/pfnm/AcaciaFarnesiana.html
Abril 2004.
3. DE LA LLANA Parra, Rossana Mireya. Tamizaje fitoquímico del colpalchi (*Croton reflexifolius* HBK). Guatemala, USAC. 2001.
4. DOMINGUEZ, Xorge Alejandro. Métodos de investigación fitoquímicos. Washington D.C. 1975.
5. PALOMERA Avalos, Verónica. Acacia Farnesiana.
www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/plts_mex/huizache.html
Abril 2004.
6. RÍOS Tello, Mildred Julissa. Tamizaje fitoquímico preliminar del fruto, semilla y corteza de *Hylocereus undatus* (pitaya o pitahaya). Tesis Ingeniero Químico. Guatemala. Universidad de San Carlos Guatemala. Facultad de Ingeniería. 2001. Páginas 1-48.

7. SANTIZO Rodas, Ivo Mahelly. Protocolo de tesis: Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera L.*. Guatemala. USAC, 2003.
8. SHARAPIN N, Screening fitoquímico. Brazil 1999.
9. WAGNER H, Blatt. S, Zgainski E.M., Plant Drug Analysis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1984.

ANEXO I

Figura 3 Aceites esenciales

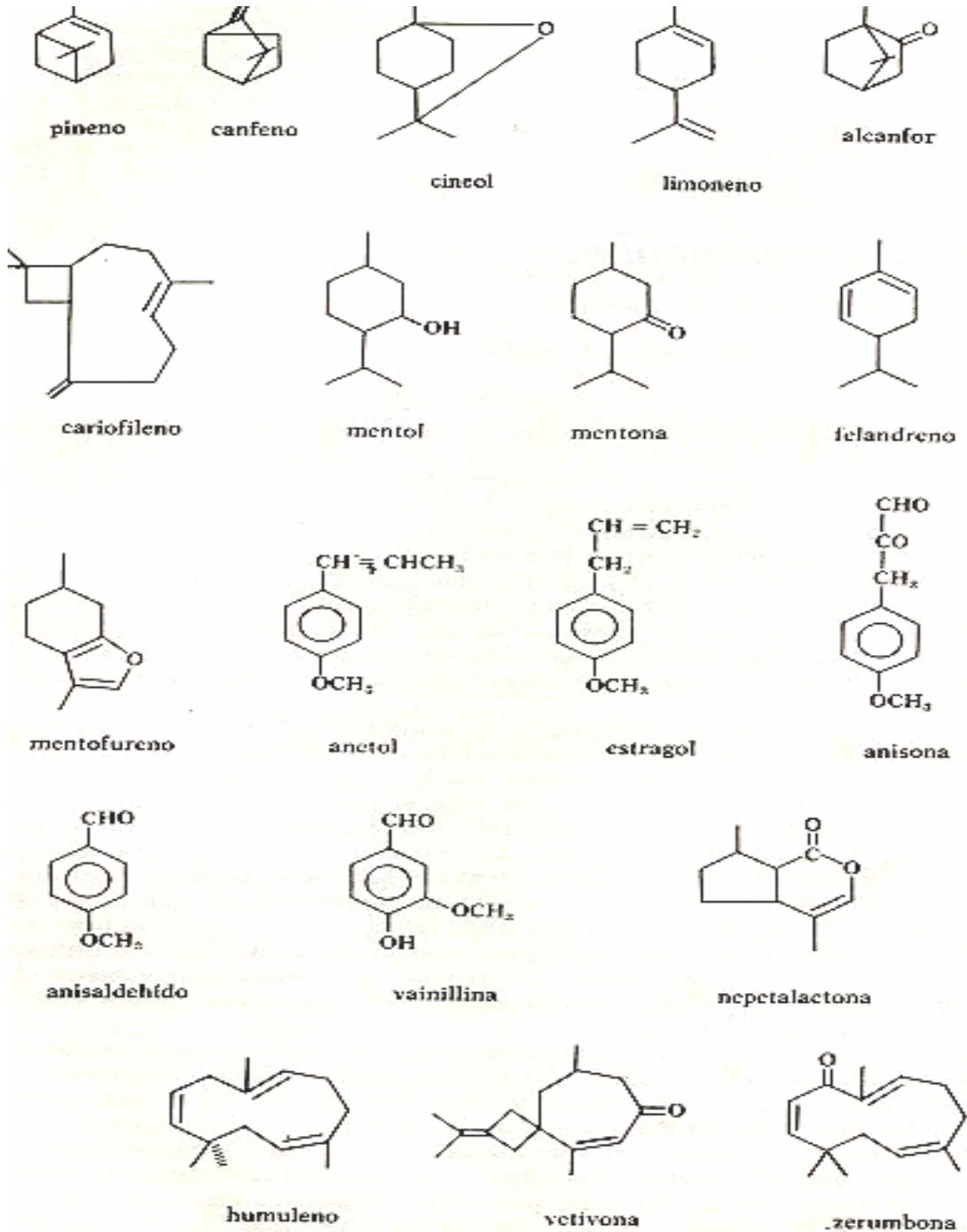
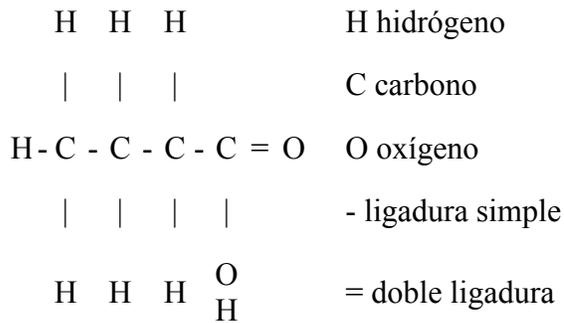
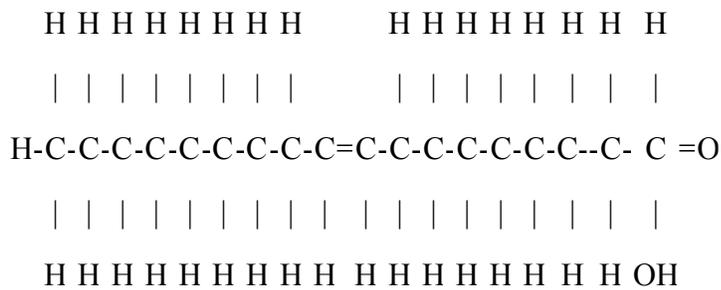


Figura 4 Ácidos grasos

ácido butírico



ácido oléico



ácido linoléico (primera doble ligadura en el 6o carbono: posición n-6)

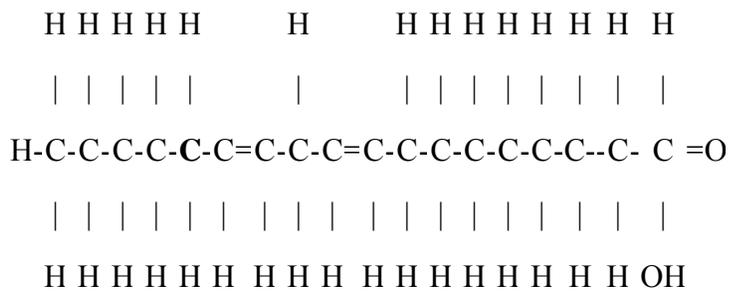
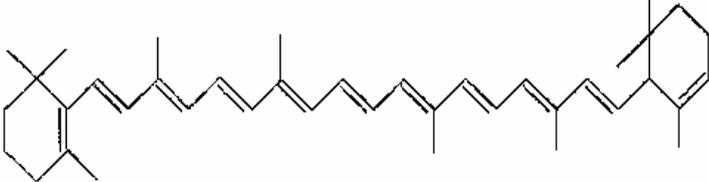
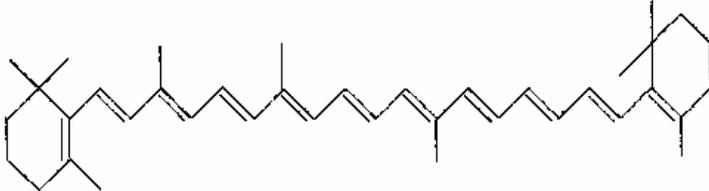


Figura 7 Carotenoides

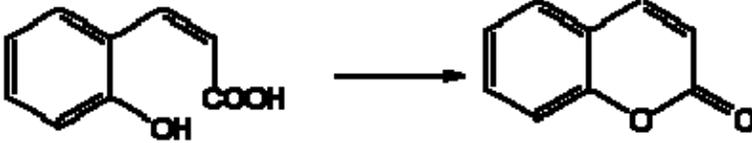


α - caroteno



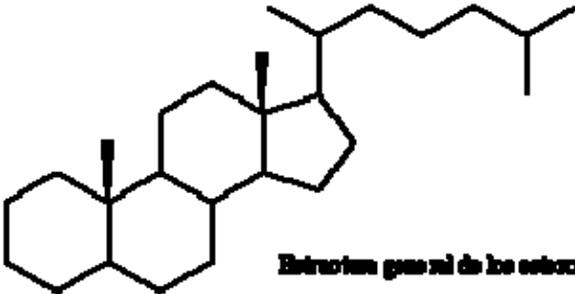
β - caroteno

Figura 8 Cumarinas



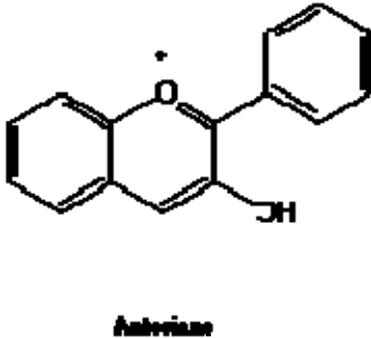
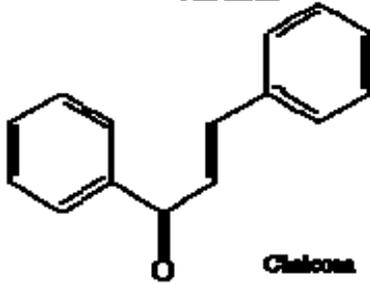
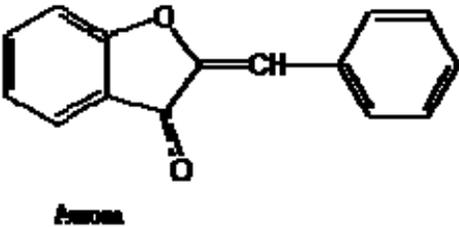
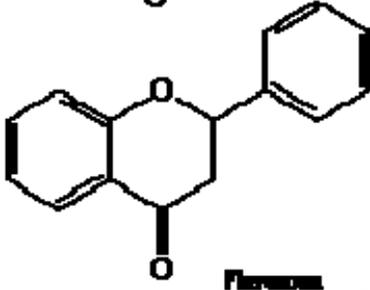
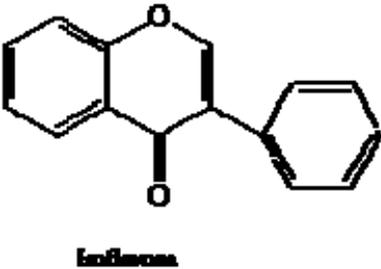
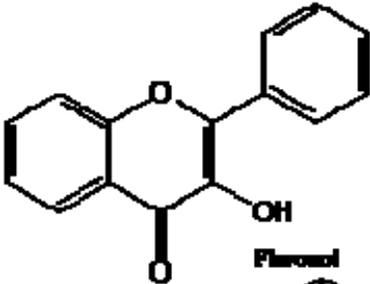
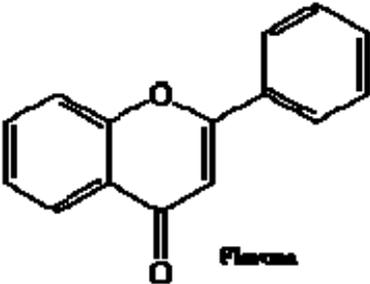
Las transformaciones del ácido cumárico

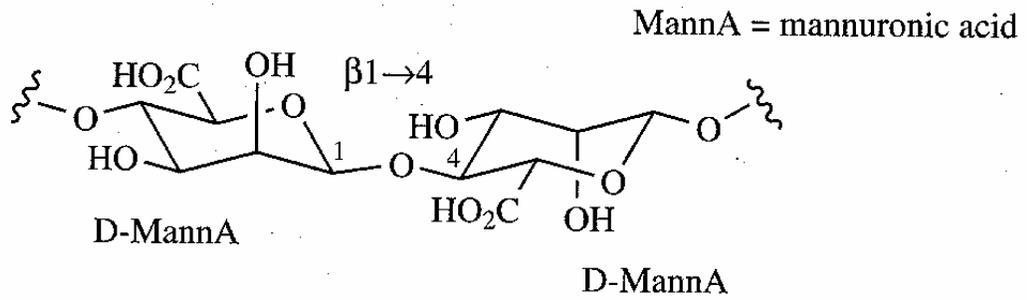
Figura 9 Esteroides



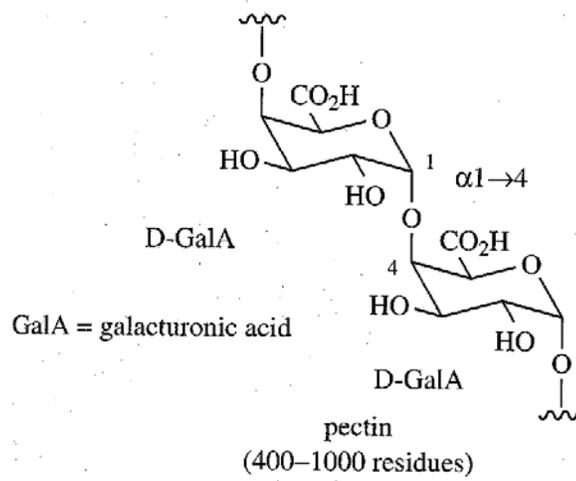
Estructura general de los esteroides

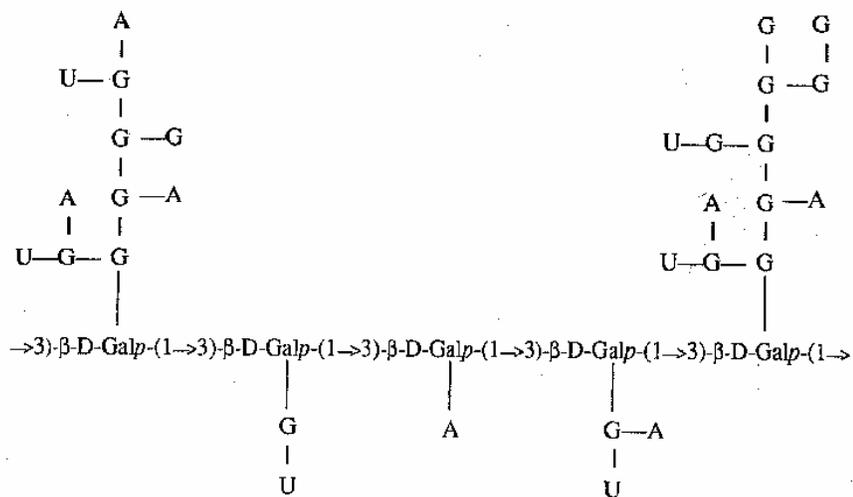
Figura 10 Flavonoides





alginate acid
(200–900 residues)





Gum arabic : structural hypothesis

G = β -D-Galp
 A = short chains of L-Araf linked (1 \rightarrow 3)
 or α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Araf
 U = α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA or β -D-GlcA (4-OMe)

Goma arabica

Figura 12 Quinonas

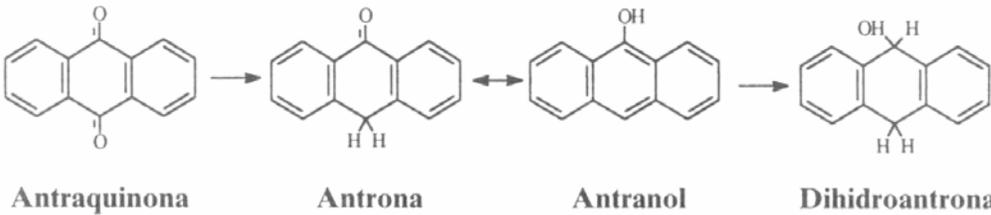
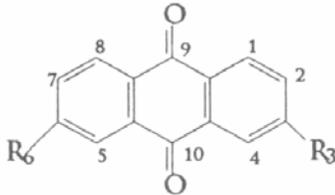


Figura 13 Saponinas

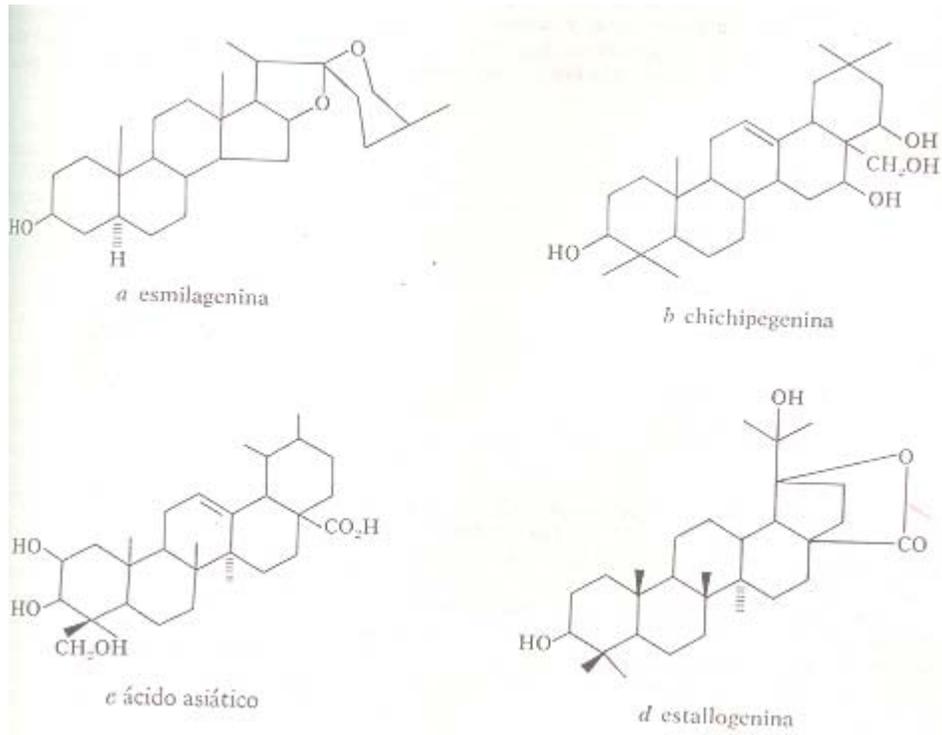
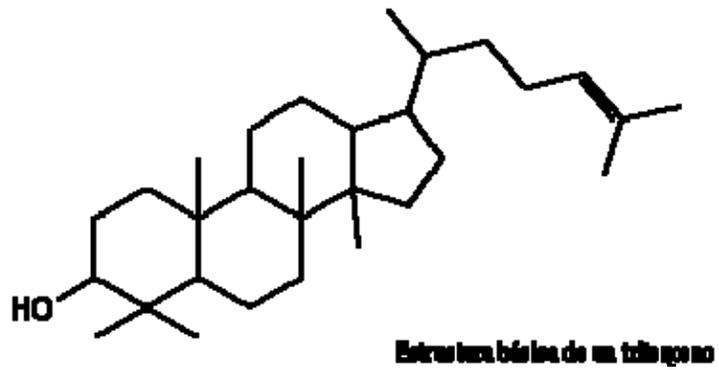


Figura 14 Triterpeno



ANEXO II

REACTIVOS

Lieberman-Bochard

1. Se mezclan 5 ml de anhídrido acético.
2. 5 ml de cloroformo.
3. Enfriar a 0°C.
4. Agregar 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico.
5. El reactivo es estable durante 1 día.

Reactivo de Mayer

1. Disolver 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua.
2. Disolver 5 g de KI en 20 ml de agua.
3. Mezclar las dos soluciones.
4. Aforar a 100 ml
5. El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluídos.
6. La solución no debe de contener ácido acético o etanol porque disuelven el precipitado.
7. Solo debe de agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

Reactivo de Carr-Price

1. Solución saturada de tricloruro de antimonio (SbCl_3) en cloroformo.

Reactivo de Fehling.

Solución A

1. Disolver 6.93 g de sulfato cúprico en agua y completar a volumen con 250 ml de agua.

Solución B

1. Disolver 34.6g de bitartrato de sodio y potasio y 62.5 g de KOH en agua y completar el volumen a 250 ml con agua.

Mezclar volúmenes iguales al momento de utilizar.

Reactivo de Bouchar

1. 2 g de yodo.
2. 4 g de yoduro de potasio.
3. Aforar a 100 ml

Reactivo de Dradendoff

Solución A

1. 0.85 g de nitrato básico de bismuto, diluido en 10 ml de ácido acético glacial.

Solución B

1. 8 g de KI en agua.

Mezclar 25 ml de solución A y 25 ml de solución B en 100 ml de ácido acético glacial, aforar a 500 ml con agua, es estable en un recipiente oscuro y refrigerado durante 6 meses.

Reactivo de Kedde

1. 5 ml de solución etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3% preparado recientemente.
2. 5 ml de NaOH 2M.
3. Mezclar al momento de utilizar.

Reactivo de Komarowsky

1. 1ml de ácido sulfúrico etanólico al 50%.
2. 10 ml de 4-hidroxibenzaldehido en metanol al 2%

3. Mezclar antes de usar.

Reactivo Séller-Killiani

1. 0.3 ml de FeCl₃ al 10%
2. 50 ml de ácido acético glacial.
3. Mezclar antes de usar.

Reactivo de KOH

1. Solución etanólica de KOH del 5-10%.

Reactivo sangre/Agar sangre

1. 10 ml de agar/agar disuelto según especificaciones de fabricante.
2. 1 ml de sangre de carnero/ o Hb comercial en relación especificada por el fabricante.
3. Mezclar cuando el agar se encuentre a 37°C.
4. Se puede usar agar sangre comercia.

Reactivo de Productos naturales

1. Asperjar la cromatoplaça primero con difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol y luego con polietilenglicol-4000 al 5% en etanol.
2. El polietilenglicol incrementa la sensibilidad desde 10 hasta 2.5 microgramos.

ANEXO III

Figura 15 Cuadro de material y equipo para elaboración de extracto de hexano.

Cuadro 1 MATERIAL Y EQUIPO PARA ELABORACIÓN DE EXTRACTO DE HEXANO

CRISTALERIA		SOLVENTES		OTROS	
No	Material	Vol	Solvente	Cant.	Material
2	Beacker de 250 ml	50 ml	Etanol	1	Gradilla
3	Beacker de 100 ml	60 ml	Eter	1	Equipo de arrastre de vapor
3	Beacker de 50 ml	35 ml	Hexano	1	Plancha de calentamiento
1	Beacker de 10 ml	7 ml	Cloroformo	1	Vortex
2	Beacker de 5 ml	5 ml	Metanol	1	Baño de Maria
2	Tubos de ensayo de 20 ml	70 ml	Tolueno		
12	Tubos de ensayo de 10 ml	10 ml	n-butanol		
5	Pipetas de 1 ml		REACTIVOS	1	Par de pinzas para tubos de ensayo
5	Pipetas de 2 ml	Cant.	Reactivo	1	Par de pinzas para crisol
5	Pipetas de 3 ml	10 ml	HCl 2%	1	Macropipeteador
5	Pipetas de 5 ml	5 ml	HCl concentrado	1	Cronómetro
5	Pipetas de 10 ml	12 ml	KOH 0.5 M	1	Pizeta con agua destilada 300 ml
1	Contenedor de cromatoplaques	1 ml	NH ₄ OH 25%	1	Bote de capilares
3	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Reactivo de Carr-Price	1	Mechero
		1 gotero	Reactivo Liebermann-Bouchard		Papel filtro, papel pH
	Estándares	1 gotero	Reactivo de Wagner	1	Cromatoplaque para CCF Silicagel 60 F ₂₅₄
	Atropina	Raspas	Magnesio metálico	1	Lámpara UV 366 nm
	Papaverina	1 gotero	Reactivo de Mayer		Papel parafilm
		25 ml	Acido acetico		Masking Tape o crayon graso
		10 ml	Dietilamina		
		1 gotero	Reactivo dragendorff		

Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.

Figura 16 Material y equipo para elaboración de extracto alcohólico

Cuadro 2 MATERIAL Y EQUIPO PARA ELABORACIÓN DE EXTRACTO ALCOHÓLICO

No	Material	Vol	SOLVENTES		Cant.	OTROS Material
			Solvente	Reactivos		
1	Beacker de 250 ml	50 ml	Eter		1	Gradilla
2	Beacker de 100 ml	5 ml	Metanol 50 %		1	NaSO ₄ , desecador
1	Beacker de 150 ml	94 ml	Tolueno		1	Plancha de calentamiento
5	Beacker de 20 ml	100 ml	Eter		1	Vortex
2	Beacker de 5 ml	10 ml	Cloroformo		1	Baño de María
		25 ml	Eter de petróleo			
		10 ml	Benceno			
2	Tubos de ensayo de 20 ml					
12	Tubos de ensayo de 10 ml					
5	Pipetas de 1 ml	3ml	HCl 2%	Reactivo	1	Par de pinzas para tubos de ensayo
5	Pipetas de 2 ml	20 ml	HCl 20%		1	Par de pinzas para crisol
5	Pipetas de 3 ml	30 ml	HCl 10 %		1	Macropipeteador
5	Pipetas de 5 ml	30 ml	NH ₄ OH 25%		1	Cronometro
5	Pipetas de 10 ml	2 ml	KOH 0.5 M		1	Pizeta con agua destilada 300 ml
2	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Reactivo Mayer		1	Bote de capilares
		1 gotero	Reactivo de Wagner			Mécher
		1 gotero	Reactivo de Dragendorff		1	Papel filtro, papel pH
		Raspas	Magnesio metálico		1	Papel parafilm
		1 gotero	Reactivo de Fehling			Cromatoplaaca Silicagel 60F 25
		1 gotero	FeCl ₃ 1%			Lámpara UV 366 nm
		1 gotero	Solución gelatina a 1% (p/V)			Masking Tape o crayon graso
		1 gotero	Solución gelatina-sal			
		207 ml	Acetato de etilo			
		11 ml	Acido fórmico			
		11 ml	Acido Acético			
		1 gotero	Reactivo de productos naturales (NP/PEG)			
		1 gotero	Solución KOH etanolica al 3%			
		1 gotero	Reactivo de Liebermann-Bouchard			
		25 ml	Acido sulfúrico concentrado			
		1 gotero	Reactivo de Kedde			
		1 gotero	Reactivo de Sælier-Kilianí			
		1 gotero	Test de amonio			

Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.

Figura 17 Material y equipo para la elaboración de extracto acuoso.

Cuadro 3 MATERIAL Y EQUIPO PARA ELABORACIÓN DE EXTRACTO ACUOSO

CRISTALERIA		SOLVENTES		OTROS	
No	Material	Vol	Solvente	Cant.	Material
1	Beacker de 250 ml	20 ml	Acetona	1	Gradilla
1	Beacker de 100 ml	150ml	Eter	1	
2	Beacker d'e 50 ml	10 ml	Metanol 50 %	1	Plancha de calentamiento
1	Beacker de 10 ml	64 ml	Cloroformo	1	Vortex
1	Beacker de 5 ml	50 ml	Metanol	1	Baño de Maria
		50 ml	n-butanol		
		10 ml	Acido acético		
2	Tubos de ensayo de 20 ml		REACTIVOS	1	Par de pinzas para tubos de ensayo
7	Tubos de ensayo de 10 ml	Cant.	Reactivo	1	Par de pinzas para crisol
5	Pipetas de 1 ml	12 ml	HCl 10%	1	Macropipeteador
5	Pipetas de 2 ml	10 ml	H2SO4 concentrado	1	Cronometro
5	Pipetas de 3 ml	5 ml	KOH 0.5 M	1	Pizeta con agua destilada 300 ml
5	Pipetas de 5 ml	10 ml	NH4OH 25%	1	Bote de capilares
5	Pipetas de 10 ml	1 gotero	Lugól	1	Mechero
1	Quitazato	1 gotero	Reactivo Liebermann-Bouchard		Papel filtro, papel pH
1	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Reactivo de Wagner		Papel parafilm
1	Embudo	1 gotero	Reactivo de Dragendorff		Lámpara UV 366 nm
		Raspas	Magnesio metálico	1	Manguera para vacío
		1 gotero	Reactivo de Meyer	1	Bomba de vacío
		1 gotero	Hematxilina		Masking Tape o crayo graso
	Solución saponinas 0.1 % en metanol	1 gotero	Timo		
		1 gotero	Reactivo de sangre		
		1 gotero	Reactivo de Komarowsky		
			Vainilina		
			ansaldehido		

Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.