

113  
2. Jan.



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS PARA  
MEDIR GOSIPOL E INVESTIGACION DEL CONTENIDO  
DE ESTE EN 10 MALVACEAS**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**Hortensia Villavicencio Alvarez**

México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- GENERALIDADES	4
II.1.- SEMILLA DE ALGODON	4
II.2.- PROPIEDADES QUIMICAS DEL GOSIPOL	6
II.3.- OTROS PIGMENTOS PRESENTES EN SEMILLA DE ALGODON	8
II.4.- ACCION FISIOLOGICA DEL GOSIPOL	11
II.5.- EFECTO ANTIFERTILIZANTE	14
II.6.- OTROS AGENTES ANTIFERTILIZANTES DEL REINO VEGETAL	18
II.7.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO	20
II.8.- METODO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION	25
III.- OBJETIVOS	30

	Página
IV.- HIPÓTESIS	31
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	32
V.1.- MATERIALES BIOLÓGICOS	32
V.1.1.- MÉTODOS DE SEPARACION DEL GOSIPOL	39
V.1.1.1.- Separación y De terminación de Gosipol por Cro matografía en - Capa Fina.	39
V.1.1.2.- Separación del Gosipol y las - Clorofilas por Cromatografía - en columna.	43
V.2.- MÉTODOS DE SEPARACION Y VALORACION DEL GOSIPOL POR CROMATOGRÁFIA DE - LIQUIDOS DE ALTA PRESION.	47
V.3.- DETERMINACION DE GOSIPOL LIBRE POR EL METODO DE CROMATOGRÁFIA DE LIQU DOS DE ALTA PRESION	51

	Página
V.4.- DETERMINACION DE GOSIPOL LIBRE POR EL METODO ESPECTROFOTOME-- TRICO	55
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
VII.- CONCLUSIONES	71
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	74

## I.- INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que se han presentado a través del tiempo y que a la fecha no ha sido resuelto por el hombre, es la nutrición, mismo que día con día va adquiriendo mayor importancia debido al incremento cada vez mayor del número de personas con problemas graves de alimentación.

Debido a la continua necesidad de abastecer de alimentos a la población mundial, es necesario buscar nuevas fuentes de alimentos que sean útiles para el consumo humano o animal, considerándose a los vegetales como un posible re-

curso de protefnas de bajo costo para satisfacer las necesidades de protefna en el futuro.

A pesar del gran número y variedad de especies que existen en el reino vegetal, no todas pueden ser aprovechadas para la alimentación humana o animal, esto se debe -- tanto a problemas de digestibilidad como la presencia de compuestos tóxicos, tanto para el hombre como para los animales,

La presencia de éstos tóxicos en muchas ocasio-- nes son característicos de determinadas familias como por -- ejemplo: En leguminosas existen inhibidores de proteasas y compuestos latirógenos o glucósidos que se han encontrado en algunas plantas de las crucíferas, tales como: col, rábanos, nabos, etc.

Basándose en estas observaciones se decidió estudiar algunas especies de las malváceas, ya que uno de sus géneros; gospium, contiene un compuesto polifenólico llamado gospol, el cual ha despertado un gran interés en los últi-- mos años, debido a los efectos que produce, tales efectos -- serán discutidos en los párrafos posteriores,

Investigaciones realizadas recientemente con este compuesto, han demostrado que tiene la propiedad de ac---tuar como antifertilizante en los seres humanos, motivo por

el cual se hace necesario determinar si es que lo contienen otras especies de la familia de las malváceas que producen los mismos efectos.

Las malváceas es una familia de plantas abundantes y variadas en las zonas tropicales de nuestro país, la cual abarca varios géneros: *Abelmoschus*, *Abutilon*, *Althaea*, *Anoda*, *Cienfuedosia*, *Gossipium*, *Hibisvus*, *Malva*, *Malvastrum*, *Malvaviscus*, *Pavonia*, *Sida*, *Sidalcea*, *Thespepsia*, *Urena* y *Wisadula*.

Es una familia que comprende hierbas, arbustos y árboles, frecuentemente vellosa y mucilaginoso, con hojas alternadas y simples, normalmente palmadas y lobuladas; sus flores son hermafroditas, encontrándose solas o en grupo. - El cáliz consta de cinco sépalos contorneados en el botón, estambres numerosos unidos en el tubo, su fruto es capsular o bien está dividido en forma parcial a los que se les denomina esquizocarpos. (14).

## II.- GENERALIDADES

### II.1.- SEMILLA DE ALGODON

Uno de los géneros de mayor importancia económica de la familia de las malváceas es el género *Gossypium*, al cual pertenece la planta de algodón, en la que su cultivo se destina principalmente a la obtención de fibra y como subproducto se obtiene la semilla de algodón.

La semilla de algodón es una oleaginosa de forma ovalada y punteaguda, midiendo aproximadamente de 8 a 12 mm de longitud y consta de dos partes principales: La cáscara que es relativamente delgada (0.28 a 0.35 mm) y dura pero --

flexible, y la almendra. Una de las características de la almendra de esta semilla, es la presencia de glándulas -- pigmentadas en forma de pequeños cuerpos que miden de 100 a 400 micrones de longitud, cuando estas glándulas son observadas al microscopio, los colores que presentan están entre el rango de amarillo a naranja para algunas y del rojo al púrpura para otras, predominando un pigmento de color amarillo conocido con el nombre de "gospol",

El nombre de gospol se derivó de "Gospiphenol", indicando así su origen y su naturaleza química (4) y constituye del 39 al 50% en peso de las glándulas pigmentadas y del 0.4 a 0.7% en peso respecto a la semilla (6).

La semilla de algodón es una materia prima importante para la industria alimenticia, ya que por medio de análisis de su composición química se ha encontrado un contenido de proteína cruda alrededor del 26%, además es una buena fuente para la obtención de aceite.

Mediante su industrialización se pueden obtener harinas o concentrados proteícos con un 45% de proteína para la elaboración y/o suplementación de alimentos de bajo costo y de alta calidad nutricional para el hombre y los animales. Sin embargo la principal deficiencia de

calidad de estos productos es su contenido de gosipol, ya que produce daños en los animales monogástricos incluyendo al hombre. Desde 1915, Winters y Carruth establecieron que el gosipol es el responsable de los daños producidos en animales alimentados con productos derivados de semilla de algodón. (4).

## II.2.- PROPIEDADES QUIMICAS DEL GOSIPOL

El gosipol es un pigmento polifenólico amarillo, cuya fórmula molecular es  $C_{30}H_{30}O_8$  y su nombre químico es -- 1,1',6,6',7,7'hexahidroxí-5,5' diisopropil-3,3'dimetil-(2,2' binaftaleno)-8,8'dicarboxialdehído, su peso molecular es -- 518,5 polimórfico ya que cuando se ha cristalizado en éter -- su punto de fusión es de 184°C, en ligroína es de 214°C, y -- apartir de cloroformo es de 199°C. Todas estas formas del -- gosipol dan las mismas reacciones (8).

Se ha postulado que el gosipol se encuentra en -- tres formas tautoméricas para poder explicar su comportamien -- to químico llamadas hidroxialdehído, hemiacetal y quinoide, -- siendo la forma aldehído la que se encuentra en mayor propor -- ción, ver figura 1, (6,14).

La molécula de gosipol contiene dos grupos alde -- hídos y seis grupos hidroxilo los que le confieren una aci--

dez fuerte y alta reactividad para formar ésteres y éteres. Debido a la presencia de los grupos fenólicos y carboxilos pueden reaccionar tanto con ácidos como con bases.

Los grupos aldehídos del gosipol reaccionan con aminas formando derivados estables, reacciona con aminas aromáticas primarias para formar bases de Schiff. El gosipol reacciona con dos moles de anilina en donde se eliminan dos moléculas de agua y se forma un producto de condensación llamado dianilínogosipol, ésta reacción ha sido extensivamente utilizada para la determinación cuantitativa del gosipol y se ha considerado como método oficial.

El gosipol también forma quelatos con cationes como fierro y arsénico. Es insoluble en agua pero forma sales en solución alcalinas, es soluble en la mayoría de solventes orgánicos e insoluble en agua. Es extremadamente susceptible a la oxidación por el aire en soluciones alcalinas o alcohólicas.

Los cristales de gosipol se deben guardar protegidos del oxígeno y la luz.



### II.3.- OTROS PIGMENTOS PRESENTES EN LA SEMILLA DE ALGODON

Además del gosipol existen otros pigmentos en la semilla de algodón en menor porción, algunos de ellos se mencionan a continuación:

- Diaminogosipol: Pigmento amarillo de fórmula molecular  $C_{30}H_{32}O_6N$ , se ha informado que este compuesto reacciona con la anilina y p-anisidina para formar dianilinosipol y p-anisidinosipol respectivamente. (6)

- Gosipurpurina: Se encuentra en porción de 0.612% a 1.73% en las glándulas y es de color púrpura, su fórmula molecular es  $C_{60}H_{64}N_2O_{14}$ , es soluble en cloroformo, acetona, piridina y benceno; ligeramente soluble en metanol, éter de petróleo y etanol, es insoluble en agua. Las soluciones de gosipurpurina son inestables a la luz y al calor, reacciona con la anilina y p-anisidina formando dianilinosipol y - - -

p-anisidinogosipol respectivamente. (6).

- Gosifulvina: Pigmento naranja cuya fórmula molecular es  $C_{35}H_{34}N_2O_8$ , funde con descomposición a  $238^{\circ}C-239^{\circ}C$ . La hidrólisis ácida de gosifulvina forma gosipol en cantidad de 82 a 86% en peso de gosifulvina tratada. No reacciona con la anilina. (6,18).

- Gosiverdurina: Pigmento verde, soluble en cloroformo, metanol, etanol, acetona y dietiléter. De su análisis se muestra la siguiente composición C 62.9%, H 6.19% - N 1.9%, O 21.0% y Cenizas 8.20%. Cuando se analiza por el procedimiento para medir gosipol, da valores de un 25% de gosipol libre aparentemente y un 32.5% de gosipol total. (6).

- Gosicaerulina: Pigmento azul, cuya fórmula molecular es  $C_{30}H_{30}O_8$ , actúa como indicador es azul en soluciones

ácidas y cambia a verde y amarillo en soluciones alcalinas. Es soluble en alcoholes, dietil éter, cloroformo, ácido acético; y anhídrido acético; es relativamente insoluble en éter de petróleo, benceno, tolueno y agua. Da reacciones las cuales indican que tiene un grupo aldehído adyacente a un grupo hidroxilo y se ha postulado que los grupos carboxilo son de naturaleza quinoide, pero su estructura no ha sido completada. (7',6).

- 6-Metoxigosipol y 6,6'Dimetoxigosipol:

Estos pigmentos se aislaron en forma de cristales amarillos. El 6 metoxigosipol es una molécula asimétrica al gosipol. Dechary (6) reportó que el aislamiento de estos pigmentos a partir de aceite de semilla de algodón representan un 4% de los pigmentos de gosipol y contienen un 0,43% de nitrógeno.

#### II,4.- ACCION FISIOLOGICA DEL GOSIPOL

La alta reactividad del gosipol lo hace participar en los procesos bioquímicos, alternándolos y ocasionando daños en los seres vivos, por lo que se le considera tóxico,

La toxicidad de los alimentos derivados de semilla de algodón es debida principalmente a su contenido de gosipol libre, que éste es fisiológicamente activo. Su toxicidad puede disminuir durante el procesamiento térmico, donde el grupo carboxilo del gosipol reacciona con el grupo amino libre de las proteínas formándose así el gosipol unido, cuyos efectos tóxicos son nulos. Sin embargo la presencia de gosipol en concentrados proteícos de harinas de esta semilla da lugar a dos problemas fundamentales: dentro del primero encontramos que niveles elevados de gosipol causan efectos fisiológicos desfavorables y dentro del segundo encontramos que la combinación química entre el gosipol y las proteínas ocasiona una reducción de la disponibilidad de los aminoácidos, lisina principalmente, disminuyendo su valor nutricional.

Los síntomas de toxicidad del gosipol son muy variados, dependiendo de la especie animal se ha reportado que la toxicidad del gosipol se manifiesta en orden decreciente en: cerdos, pollos, conejos, ratones y ratas. En rumiantes no se ha encontrado efecto tóxico, debido probablemente al metabolismo bacteriano en el rumen que vuelve inactivo al gosipol. (1,3).

En los animales monogástricos la toxicidad se ha clasificado de la siguiente manera:

- Aguda, en la que se presenta paro cardíaco.
- Subaguda, en la que hay edema pulmonar y
- Crónica, cuando el animal tiene síntomas de desnutrición, provocados por la administración prolongada de gosisol en dosis pequeñas, llegando a causarle la muerte.

Los síntomas del efecto tóxico en animales monogástricos son:

Pérdida de peso, pérdida de apetito, hipoproteínea, diarrea, baja de hemoglobina, disminución de eritrocitos, irregularidad cardíaca, edema pulmonar, cambios degenerativos en el hígado y bazo, así como hemorragias en el hígado, estómago e intestino delgado.(3). También ocasiona desacoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, inhibiendo así la producción de energía (2), observándose que -- el tratamiento con gosisol inhibe la actividad de la ATPasa -- del hígado y el testículo.

Los tejidos más afectados cuando el gosisol se administra en altas dosis son el hígado, pulmones, corazón, tejido adiposo, riñones y bazo.

Los niveles de tolerancia del gosipol están asociados con la especie animal de que se trata, la vfa de administración de este, el contenido de minerales y proteínas en la dieta, la dosis acumulativa de gosipol libre y la forma de suministrarlo. La toxicidad se incrementa en mayor medida cuando es administrado por vfa intravenosa o intraperitoneal.

Con base en una dosis oral se encontró que administrado en agua, la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) para ratas está de 2,400 a 3,340 mg/kg; para ratones es de 500 a 950 mg/kg, en conejos de 350 a 600 mg/kg y para cerdos de 250 a 600 mg/kg. Cuando el gosipol es administrado en aceite su toxicidad se incrementa en un 10%. (3).

Clawson y otros (1,11) demostraron que los iones ferroso pueden actuar como un antídoto en la toxicidad del gosipol, ya que estos iones pueden formar un complejo insoluble con el gosipol.

La principal vfa de eliminación del gosipol en los animales es la fecal, seguida después por la expiración de  $CO_2$ , y en muy pequeña porción por vfa urinaria, (1,3).

En los Estados Unidos la máxima concentración de gosipol en preparaciones de semilla de algodón para humanos ha sido de 0,45% de gosipol libre, con lo cual no se han observado efectos nocivos.

Menos del 0,06% de gósipol libre y 1,2% de gósipol total es el recomendado por grupos internacionales. (6).

## II.5.- EFECTO ANTIFERTILIZANTE

El efecto antifertilizante del gósipol se mencionó por primera vez, en la República Popular de China, cuando por medio de un estudio epidemiológico se observó que en ciertas zonas había mayor número de casos de infertilidad de los esperados; inicialmente se pensó que eran producidos por factores ambientales y sospechándose además de algún alimento tóxico. Al término de algunas investigaciones realizadas en las zonas donde se presentaron estos casos se demostró que el aceite de semilla de algodón era el causante de este efecto, debido principalmente a que en aquel entonces se había cambiado el proceso de obtención: Primero se hacía su extracción calentando previamente las semillas y cambiándose después a un proceso en el que se suprimía el calentamiento. Aquellos hombres que ingirieron el aceite crudo por períodos mayores de un año presentaron infertilidad, la cual resultó ser reversible al suspender la ingestión de aceite crudo. (18).

Al administrar gósipol altamente purificado en animales de experimentación y observar que causaba el mismo efecto antifertilizante, se confirmó que el componente encontrado en el aceite crudo de semilla de algodón era el gósipol, ya que --

éste no era destruido por suprimirse el calentamiento. Esto condujo a realizar nuevas investigaciones sobre este efecto del gósipol tanto en humanos como en animales.

En experimentos hechos con animales se encontró que el grado de sensibilidad al efecto antifertilizante depende de la especie animal. Mediante la administración por vía oral del ácido acético-gósipol a ratas, hamsters y conejos machos, se encontró que los hamster son más sensibles al efecto antifertilizante y menos sensibles al efecto tóxico, resultando estas características inversas para las ratas machos, y en los conejos, altas dosis de gósipol pueden alterar la producción de espermias pero no se afectó la fertilidad, en cambio, la administración oral de ácido acético-gósipol a ratas machos en dosis de 15 a 40 mg/kg/día durante 2 a 4 semanas les produjo infertilidad. (8).

La rapidez con la que se logra la infertilidad así como la amplitud de su periodo de duración están relacionados con la dosis aplicada y la cantidad de gósipol absorbido, y de los experimentos realizados bajo diferentes condiciones de trabajo se ha encontrado que el periodo de recuperación de fertilidad es alrededor de 3 a 6 semanas. Durante estos experimentos se observó que después de la administración de gósipol se presentaba una serie de cambios citológicos en el epitelio seminífero de los testículos de ratas, algunos de estos cam--

bios constituyeron principalmente en: La presencia de vacuolas en el núcleo e hinchamiento en las espermátidas, daño en los espermatoцитos, descamación de las células del epitelio y formación de células gigantes multinucleadas derivadas de las espermátidas y los espermatoцитos. El epitelio germinal sufrió una reducción de sus capas celulares y asincronía en la asociación celular en los túbulos, sólo una capa de las células de Sertoli y espermatogonias quedaron en los túbulos, pudiendo llegar en algunas ocasiones a causar atrofia de los túbulos seminíferos.

En el epidídimo se encontraron espermátidas, espermatozoides exfoliados y muertos, algunos de los cuales tenían cabezas y colas separadas; además de que la cuenta total de estos espermatozoides disminuyó hasta alcanzar la azoospermia.

El gosipol fue clínicamente utilizado por primera vez en 1972 como un agente antifertilizante masculino, administrándolo a cuatro mil chinos, en buen estado de salud, por períodos mayores a seis meses, llegando algunos a alcanzar hasta cuatro años de tratamiento. La dosis usada durante los dos primeros meses para producir infertilidad fue de 20 mg/dfa, -- cambiándose después a una dosis de 150 a 220 mg/mes. Mediante exámenes del semen se encontró una eficiencia del 99.98% de -- infertilidad. Los principales síntomas presentados en estos experimentos fueron: Disminución del porcentaje de espermatozoides móviles, así como el incremento de espermatozoides mal

formados, llegando a producir con esto la azoospermia. Además de estos efectos se encontró también espermátidas y espermatozoides multinucleados exfoliados, espermatozoides con alteraciones ultraestructurales como acrosomas dañados, nucleoplasma menos condensado, desarreglo e hinchamiento de la membrana interna de la mitocondria con disminución o ausencia de crestas. -- Aparte de todo lo anterior histofuncionalmente se reportó una -- disminución de la deshidrogenasa succínica, deshidrogenasa láctica y malato deshidrogenasa en la parte media del espermatozoides, así como inhibición de la adenosintrifosfatasa por el gossipol, lo que afecta directamente sobre la movilidad del espermatozoides. (18).

Se ha demostrado que el gossipol ejerce un efecto de inhibición en el espermatozoides sobre la degradación de los azúcares; la utilización de la glucosa y fructosa fué totalmente inhibida en presencia de gossipol en concentración 50  $\mu$ M, debido a la acción de éste sobre las enzimas mencionadas. (14).

Por otro lado y como resultado de estudios hechos con ratas, se ha observado que la ingestión de gossipol provoca una disminución de los niveles de las hormonas testosterona y luteinizante en el suero, las cuales están involucradas en la maduración final de los espermatozoides. (15).

## II.6.- OTROS AGENTES ANTIFERTILIZANTES DEL REINO VEGETAL

A pesar de que las plantas no han sido estudiadas a fondo como recurso de agentes inhibidores de la fertilidad en el sexo masculino, existen algunos reportes en los que se indica la afectividad de extractos obtenidos de éstas, que impiden la producción de espermias si son administrados por vía oral en el hombre.

En 1982 (9) apareció un estudio sobre plantas que tienen una acción antifertilizante; entre éstas se mencionan algunas de la familia de las malváceas como son las especies del género *Gossypium*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Malva zantti*.

La primera evidencia de que las flores de *H. rosa-sinensis* producía un efecto antiespermatogénico en animales de laboratorio fue publicada en 1972 por Kholkute, donde se administró un extracto etanólico de estas flores a ratas machos en dosis de 50 a 250 mg/animal durante 30 días; en un lapso de 14 días se observaron efectos sobre el sistema reproductivo. A las ratas que se les suministró una dosis de 250 mg de extracto durante 30 días mostraron contracción de los túbulos seminíferos y una completa desorganización del tejido testicular - así como destrucción de las espermatogonias.

En lo que respecta al extracto en etanol de las flores de *M. conzantii* se administró durante 20 días a ratas macho en dosis de 50 mg/Kg/día; observándose un efecto espermatogénico y antiandrogénico. (9).

Dado que *Malvaviscus conzantii* e *Hibiscus rosa-sinensis* están estrechamente relacionadas a las especies *gossypium*, ya que pertenecen a la familia de las malváceas, nos conduce a pensar en la posibilidad de que estas plantas puedan -- contener gossipol y ser éste el causante de los efectos mencionados.

Por otro lado, en la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos o en la elaboración de alimentos balanceados para animales, este efecto no es deseado en la producción animal, ya que siempre se espera mayor efectividad en la reproducción, y es importante averiguar entre las posibles fuentes de alimentos si éstas no tendrían un efecto adverso a la producción animal.

De las razones expuestas anteriormente, se desprende que las malváceas puedan contener gossipol y es éste el motivo que conduce a averiguar la presencia de gossipol en diversas plantas de la familia de las malváceas localizadas en el Estado de Veracruz.

## II.7.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO

El método de espectrofotometría se utiliza como método analítico para la identificación de sustancias, basándose en la absorción de energía radiante que presentan las moléculas a una determinada longitud de onda.

El origen de los espectros se comprende mejor empezando por espectro más sencillo, que es el de un átomo. A temperaturas normales los átomos de un gas monoatómico se encuentran en el estado de mínima energía, el estado fundamental. Si el gas se calienta fuertemente, o si se hace saltar una descarga eléctrica a través del gas, pueden excitarse algunos electrones y moverse a orbitas de mayor energía. Estos átomos excitados retornan a su estado fundamental emitiendo el exceso de energía en forma de radiación electromagnética.

El espectro de absorción se observa cuando se pasa a través de una sustancia una radiación de gama de frecuencias. Se absorben aquellas que son capaces de producir excitación electrónica.

En una molécula sus espectros son más complicados, ya que las moléculas pueden absorber energía en varias formas. La energía interna de una molécula corresponde a la suma de las contribuciones independientes electrónicas, vibratorias y rotatorias. (26).

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibratoria}} + E_{\text{rotatoria}}$$

Dado que la energía sólo puede tomar ciertos valores definidos, que son múltiplos enteros del paquete más pequeño de energía, el cuanto. Generalmente los cuantos de energía electrónica son mucho mayores que los cuantos de energía vibratoria que a su vez son mucho mayores que los cuantos de energía rotatoria, estos cuantos de energía están asociados a determinados niveles energéticos, y los espectros moleculares se observan cuando ocurren transiciones entre estos niveles energéticos.

El tipo de excitación que ocurre en la absorción, depende de la magnitud del cuanto asociado con la radiación absorbida. Esa es directamente proporcional a la frecuencia de la radiación, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$E = hv$$

Donde: E es la magnitud del cuanto y h la constante de Planck.

Para producir transición de rotación en una molécula se requiere poca energía, y es inducida por la radiación de baja frecuencia, por lo que para obtener espectros rotatorios puros se debe de trabajar en la región de microondas y en el infrarojo lejano. Dichos espectros son de gran importancia.

cia, particularmente para la identificación de compuestos orgánicos, ya que los distintos grupos funcionales ( $-OH$ ;  $-C-Cl$ ;  $+C=O$ , etc.) tienen frecuencias características, por las que pueden identificarse. (26)

En las zonas visibles y ultravioleta del espectro, los espectros observados corresponden a excitaciones electrónicas. La absorción es en forma de "bandas"; es decir no consiste en frecuencias particulares definidas con nitidez; ello se debe a que además de la excitación electrónica pueden superponerse al mismo tiempo las excitaciones vibratorias y rotatorias. (27).

Entre los electrones que pueden sufrir excitación con la luz ultravioleta se encuentran los electrones de los compuestos similares al benceno y, generalmente los electrones de sistemas conjugados.

Los métodos basados en la absorción de la radiación son muy útiles en la determinación cuantitativa y cualitativa de compuestos, la región del ultravioleta es particularmente importante para la determinación de compuestos orgánicos. En la región del visible los métodos espectrofotométricos son ampliamente usados en la determinación de sustancias traza, especialmente elementos inorgánicos.

La mayoría de los trabajos analíticos involucran soluciones y se ha desarrollado una descripción cuantitativa de la relación de la concentración de una solución y su habilidad para absorber radiación, y la absorción depende de la longitud de onda de la radiación y la naturaleza de la especie molecular en solución.

No solamente la longitud de onda a la que la absorción tiene lugar permite la identificación cualitativa de las especies, sino que la cantidad de luz absorbida permite el análisis cuantitativo. Las fórmulas que relacionan la cantidad de luz absorbida con la concentración de la especie absorbente y con otros parámetros, se sintetizan en la ley de Lambert-Beer,

Si un haz de luz de una sola longitud de onda (esto es, luz monocromática) pasa a través de una solución conteniendo a un soluto que absorba a dicha longitud de onda. Como resultado del proceso de absorción, el poder de radiación (es decir, la intensidad) del haz incidente,  $P_0$ , disminuye a un valor  $P$ , en el haz que emerge de la solución. La relación entre estos dos poderes de radiación,  $P/P_0$ , se conoce con el nombre de transmitancia. De acuerdo con la ley de Lambert/Beer, la transmitancia está relacionada con la longitud del paso óptico ( $b$ , en centímetros), a través de la solución y la concentración,  $C$ , (en moles por litro), del soluto absorbente en la solución, en la siguiente forma:

$$- \log P/p_0 = - \log T = \epsilon bC$$

La constante de proporcionalidad  $\epsilon$ , llamada absorptividad molar, es característica de la especie absorbente y depende de la longitud de onda de la luz,

Al término  $-\log P/P_0$ , se le denomina: absorbancia  $A$ , por lo tanto:

$$A = \epsilon bC$$

La absorción no es el único proceso por el cual se reduce el poder de radiación de la luz que pasa a través de una solución contenida en una celda. Las reflexiones de la superficie de la celda, así como la dispersión causada por partículas suspendidas, contribuyen también a dicha disminución. Para compensar las pérdidas por reflexión, el poder de radiación  $P_0$ , no se relaciona al haz luminoso original, sino al poder de radiación por la misma celda conteniendo el disolvente puro denominándose "blanco". (28).

Para poder hacer la determinación espectrofotométrica, es necesario hacer un estudio de la curva de absorbancia de una solución de la especie en cuestión obtenida a varias longitudes de onda, para obtener alta sensibilidad, es necesario seleccionar la longitud de onda para la cual el valor de absor-

bancia sea máximo. Cuando hay otras sustancias presentes se tiene que tomar en cuenta que a dicha longitud de onda éstas no absorben.

La obtención de la cantidad de sustancia presente en una muestra problema, se obtiene por medio de una curva de calibración. Dicha curva se obtiene midiendo la absorbancia de la solución que contenga la especie por determinar a diferentes concentraciones, y graficando las absorbancias en función de dichas concentraciones. Después se mide la absorbancia de la solución problema, y la concentración de la especie absorbente se lee en la curva de calibración. Es necesario que todas las soluciones se preparen en la misma forma y que el ajuste del instrumento permanezca constante.

## II.8.- METODO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION

La cromatografía es un método analítico (físico) de separación, en el cual los componentes a ser separados de una mezcla son distribuidos entre dos fases, una fase estacionaria, normalmente con una gran área de contacto, y una fase móvil.

La cromatografía se basa en las diferencias de los coeficientes de partición de los componentes de la mezcla - - -

que se van a separar.

De acuerdo a las propiedades, el estado físico de las fases y el proceso de separación, se han desarrollado, hasta la fecha diversas técnicas cromatográficas, las cuales se indican a continuación: (29).

CROMATOGRAFIA DE GASES

GAS - SOLIDO

GAS - LIQUIDO

LIQUIDO-LIQUIDO (CLL)-en  
PAPEL

LIQUIDO-SOLIDO (CLS) en  
CAPA DELGADA

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

POR INTERCAMBIO IONICO

POR PERMEABILIDAD EN GEL

EXCLUSION

POR FILTRACION EN GEL

LIQUIDO-LIQUIDO DE ALTA  
PRESION (CLAP)

Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil y deben interactuar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose en ella, adsorbiéndose o reaccionando en forma química. (30),

Existen dos técnicas de cromatografía líquida en columna: La técnica clásica y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC),

La cromatografía líquida en columna clásica utiliza columnas de tamaño de 15 - 20 cm X 1 - 4 cm, de diámetro interno, la columna se empaca en el momento que se va a utilizar y la fase móvil (líquido) fluye a gravedad. Conforme fluye la fase móvil a través de la columna se van removiendo los compuestos por separar a diferentes velocidades, y en la salida de la columna se van colectando las diferentes fracciones, para que posteriormente sean analizadas en forma individual. Este método de separación es muy lento.

En la cromatografía de líquidos de alta presión -- los componentes que se van a separar son llevados a través de una columna por medio de un líquido. En este tipo de cromatografía se utilizan columnas de diámetro muy reducido (2-5mm.) rellenas de partículas de tamaño muy pequeño (de 3-50um). Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión, por esta razón es necesario emplear un sistema de bom

beo de alta presión (hasta 400 atm), que haga fluir la fase móvil a una velocidad constante y razonable a través de la columna.

Los componentes de la muestra se reparten entre el líquido portador (fase móvil) y al relleno de la columna (fase fija), los cuales son retenidos selectivamente por la fase estacionaria de acuerdo a sus coeficientes de partición hasta que corran cierta distancia, formándose bandas separadas por cada uno de los componentes.

Las bandas de los componentes salen de la columna en el líquido portador y llegan a un detector, el cual capta la presencia de cada componente y emite una señal eléctrica, esta es llevada a un amplificador antes de ser transformada en una señal gráfica en un registrador. Así cada componente de la mezcla origina un pico, al cual se le conoce como pico cromatográfico, cuyo conjunto obtenido desde el momento en que se introdujo la muestra en el sistema hasta que salen de él todos los componentes, se la llama "cromatograma". (32).

En el cromatograma se indica el tiempo de retención, de cada componente de la muestra por analizar, y es la medida del punto de inyección a la punta del pico cromatográfico, dada en centímetros, pulgadas o minutos. Con el tiempo de retención se pueden identificar los componentes de una muestra, al compararlos con el tiempo de retención del compuesto puro -

obtenido bajo las mismas condiciones de trabajo. (30).

En cromatografía la mayor parte de los análisis se realizan con el fin de determinar la concentración o el peso absoluto del o los componentes presentes en la muestra. El análisis cuantitativo por este método se basa en la comparación de la altura o área de los picos producidos por los componentes de la muestra problema con uno o más patrones. La concentración de un compuesto es proporcional al área del pico correspondiente.

La concentración del compuesto presente se puede obtener por medio de una curva de calibración. Dicha curva se obtiene midiendo el área de los picos obtenidos de los cromatogramas de soluciones patrón a diferentes concentraciones y graficando el área en función de la concentración. Después se obtiene un cromatograma de la muestra problema y se determina el área del compuesto por analizar y la concentración del mismo se obtiene por extrapolación de dicha área en la curva de calibración.

### III.- OBJETIVOS

Investigar la presencia de gossypol en 10 plantas de la misma familia del algodón (Malváceas).

Desarrollar un método analítico para medir gossypol por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC).

Comparar el nuevo método (HPLC) con el método oficial para medir gossypol (Espectrofotométrico).

#### IV.- HIPÓTESIS

Todas las malváceas contienen gósipol en mayor o menor concentración que la semilla de algodón,

En el Método de Cromatografía de Líquido de Alta Presión, es más selectivo y exacto que el método colorimétrico,

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1.- MATERIALES BIOLÓGICOS

El presente estudio se realizó con hojas y semillas de las siguientes malváceas:

Anoda cristata

Hampea integerrima

Hibiscus clypeatus

Hibiscus rosa-sinensis

Hibiscus sabdariffa

Malvaviscus arboreus

Malvaviscus arboreus, variedad mexicana (I)

Malvaviscus arboreus, variedad mexicana (II)

Pavonia schideana

Estas plantas fueron colectadas en el estado de Veracruz en los alrededores de la ciudad de Jalapa, y clasificadas en el herbario XAL del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bioticos (INIREB).

Las muestras fueron limpiadas y secadas, efectuándose una separación de cada parte de la planta y se molieron en un molino Wielely, con una malla de 1mm.

Las características principales de cada una de las plantas colectadas se mencionan a continuación:

Anoda cristata

Familia: malváceas

Género: Anoda

Especie: cristata

Autor: L. Schesh Tendal

Nombres comunes: Amapolita dorada, violeta de campo, alachi y halache.

Características: Se trata de una planta herbácea, vellosa - de hojas triangulares flechadas, flores moradas de cinco pétalos

y estambres numerosos con fruto redondo comprimido, los lugares donde se desarrolla son Jalisco, Valle de México, Michoacán y Veracruz. La muestra se colectó en la carretera antigua a Jalapa-Coatepec.

Hampea integerrima

Familia: Malváceas

Género: Hampea

Especie: Integerrima

Autor: L. Schesh Tenda

Nombres comunes: Jonote blanco, jonote colorado, majagua, de playa,

Características: Árbol que alcanza 12 m de alto, hojas ovadas a redondas de 10 a 22 cm., agudas y de base cordada y borde entero, flores blanquesinas de 2 cm., largamente penduculadas, el cáliz y la corola finamente tomentoso y fruto capsular de 1.5 cm de tamaño. -- Existen 13 variedades de esta especie muy similares, es un árbol típico de bosque lluvio

so. Este género tiene especies muy similares lo que hace difícil su distinción y descripción encontrándose principalmente en Veracruz y Tabasco, (11). - La muestra se colectó en la cañada del Huerfano Mizantla Veracruz,

Hibiscus clypeatus

Familia: Malváceas

Género: Hibiscus

Especie: Clypeatus

Autor: L. Schesh Tenda

Nombres comunes: Hol, cleri--  
gua maya, angú.

Características: Es un arbus-  
to o arbolillo de 3 a 6 m de  
alto, de ramas estrellado tomen-  
tosas, hojas cordado redondea-  
das, de 8 a 24 cm. Las flores  
son de color guinda y fruto de  
cápsula hispida. Las muestras  
recolectadas se encontraron en  
las orillas de la carretera que  
va de Jilotepec a Veracruz pe-  
ro es frecuentemente encontra-  
da a todo lo largo de los esta

dos de Veracruz, Campeche y -  
Yucatán, (18).

Hibiscus rosa-si-  
nensis

Familia: Malváceas

Género: Hibiscus

Especie: Rosa sinensis

Autor: L, Schesh Tendal

Nombre comunes: Gallarde, ga  
llardete, lamparilla, obelisco,  
rosa china y tulipan.

Características: Se trata de  
un arbustillo del tipo asiáti-  
co de 3 m de altura en prome--  
dio, con flores grandes comun-  
mente rojas y la columna de es-  
tambres saliente, se cultiva -  
en climas cálidos como planta  
de ornato. Los estados de la  
República donde se puede encon-  
trar son Veracruz, Morelos, --  
Oaxaca, Chiapas y en el Valle  
de México. La muestra se re--  
colectó en los alrededores del  
pueblito de Santa Rita, cerca  
de la carretera Mizantla-Ver-  
acruz.

Hibiscus sabdariffa

Familia: Malváceas

Género: Hibiscus

Especie: Sabdariffa

Autor: L. Schesh Tendal

Nombres comunes: Flor de jamaica, jamaica, rosa de jamaica.

Características: Es una planta de tallo rojizo con una altura que va de 1,5 a 2 m, presenta hojas digitado-partidas en tres lobulos crenado-dentados; brácteas gruesas y de sabor ácido, corola amarillenta, fruto capsular, es una planta asiática cultivada en climas cálidos.

Malvaviscus arboreus

Familia: Malváceas

Género: Malvaviscus

Especie: Arboreus

Autor: L. Schesh Tendal

Nombres comunes: Bizil, civil, chanita, mazapan, monacillo.

Características: Se trata de una variedad muy compleja, donde no existen características

de valor taxonómico constante, ya que a menudo se presentan grandes variaciones en áreas muy pequeñas de recolección. - Por ejemplo se han encontrado plantas con 2, 3, 4 ó 5 lóbulos del cáliz en un área de 10 Km. La mayoría de todas las especies difieren una a otras en mayor o menor grado. (21) - Generalmente se presentan en forma de arbustos con hojas ovado, dentadas, y con flores rojas. De esta especie se colectaron 3 variedades, en la carretera de Santa Rita Mizantla, Parque ecológico Francisco Javier Clavijero Veracruz. - En la República Mexicana se encuentra en los estados de Sinaloa a Chiapas, Campeche y Veracruz.

Variedades colectadas:

Malvaviscus arboreus Autor: CAY

Malvaviscus arboreus variedad mexicana -

(I)

Malvaviscus arboreus variedad  
mexicana  
(II)

Pavonia schideana Familia: Malváceas  
Género: Pavonia  
Especie: Schideana  
Autor: Estevel

Uno de los objetivos del presente es la determinación del gosipol en las malváceas, y debido a que las plantas poseen una gran cantidad de pigmentos, como son las clorofilas, existía una gran interferencia de dichos pigmentos al realizar la determinación por el método colorimétrico. Por esta razón fue necesario buscar un método de separación del gosipol y de los pigmentos, para estos se probaron diferentes procedimientos.

#### V.I.1.- METODOS DE SEPARACION -- DEL GOSIPOL

##### V.I.1.1.- Separación y - determinación de gosipol por cromatografía en capa fina.

Se probó el método propuesto por Scharmm y Benedic (22), para determinar gosipol por cromatografía en capa fina

con la modificación de la fase estacionaria para desarrollar el cromatograma, se utilizaron folios de sílica gel (MERCK) en lugar de papel, a continuación se indica la metodología:

#### MATERIAL

2 Matraces volumétricos de 250 ml y uno de 10 ml.

2 Embudos de separación de 250 ml.

Probeta de 50 ml

Camara cromatográfica (25.0 cm. de alto por 45 cm de largo).

Capilares de vidrio (calibrados a 1 uml.)

#### REACTIVOS

Acetona para análisis (MERCK)

Heptano para análisis (MERCK)

NN-dimetilformamida para análisis (MERCK)

Cloroformo para análisis (MERCK)

Sulfato de sodio anhidro

n-pentano para análisis (MERCK)

Acido acético glacial para análisis (MERCK)

Solución acuosa de NN-dimetilformamida

Solución de cloroformo heptano

Solución estandar de gosipol

## PREPARACION DE LAS MEZCLAS DE ELUYENTES Y EL ESTANDAR DE GOSIPOL

Solución acuosa de NN-dimetilformamida,- Se mezclan 600 ml de NN-dimetilformamida con 300 ml de agua destilada.

Solución de cloroformo-heptano,- Mezclar 270 ml de heptano y 30 ml de cloroformo.

Mezcla del disolvente para la elución,- Mezclar 160 ml de n-pentano, 40 ml de cloroformo y 10 ml de ácido acético glacial.

Solución estandar de gosipol,- Pesar exactamente 25 mg de gosipol y transferirlos a un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar pequeñas cantidades de acetona para disolver el gosipol y aforar con acetona. Esta solución contiene 0,1 mg de gosipol/ml.

### PROCEDIMIENTO

Pesar 10 gr de muestra en un vaso de 50 ml y adicionar 25 ml de heptano, transferir cuantitativamente esta solución a un embudo de separación de 250 ml usando heptano adicional para lavar el vaso y el embudo hasta llegar a un volumen aproximado de 100 ml. Extraer de la solución de heptano dos veces usando 25 ml de solución acuosa de NN-dimetilformami

da, después, de cada extracción quitar la capa inferior dentro del embudo de 250 ml, juntar cada extracto y transferirlo a -- otro embudo de separación, se adicionan 150 ml de agua y 50 ml de mezcla de cloroformo heptano, agitar fuertemente y separar la capa superior usando vacío. Repetir la extracción dos veces más usando 50 ml de disolución de cloroformo-heptano cada vez, coleccionar y combinar los tres extractos y secar con pequeñas porciones de sulfato de sodio anhidro.

Filtrar la solución en un vaso de precipitado de 250 ml y lavar el sulfato de sodio anhidro con pequeños volúmenes de la mezcla de cloroformo-heptano. Evaporar la solución en baño maría hasta un volumen menor de 10 ml. Si hay más de 1% de gósipol, transferir esta porción inmediatamente a un matraz aforado de 10 ml y aforar con acetona, almacenar este residuo a 0-5°C hasta la realización del cromatograma.

Preparar la cámara para desarrollar el cromatograma en donde tenga la mezcla del eluyente y debe estar bien sellada. Por otro lado en un folio de sílica gel (MERCK) aplicar porciones de la solución estandar de gósipol y de la muestra dejando un espacio entre éstas de 5 cm. Introducir el folio en la cámara para el desarrollo del cromatograma, después de que ha corrido completamente el eluyente, sacar el folio de la cámara y dejar secar a temperatura ambiente. Posteriormente observar con luz ultravioleta para detectar el gósipol.

Sin embargo no fue posible determinar la presencia de gosipol en las plantas por medio de éste método, ya que aun que se observó una buena separación de varios compuestos en el cromatograma, el estandar de gosipol no corrió.

V.1.1.2.- Separación del Gosipol y las Clorofilas por Cromatografía en columna.

Se probó este método para hacer una purificación - del gosipol eliminando la mayor parte de los pigmentos, y después cuantificarlo por el método colorimétrico.

Para poder seleccionar la mejor separación del gosipol y las clorofilas se probaron los siguientes adsorbentes:

Silica gel 60: Tamaño de partícula 0.63-0.20 mm -- para cromatografía en columna (MERCK)

Oxido de aluminio 90: Activo ácido para cromatografía en columna (MERCK).

Oxido de aluminio: Activo neutro para cromatografía en columna (MERCK).

Oxido de aluminio: Activo básico para cromatografía en columna (MERCK)

Celulosa

Además de probar diferentes adsorbentes se hicieron también variaciones en la fase móvil probándose los siguientes disolventes:

Hexano

Cloroformo

Acetona

Acetato de etilo

Acetona en medio ácido (ácido acético al 0.5% y -  
al 1%).

Acetona en medio ácido (ácido clorhídrico al 1%).

Acetona acuosa al 80%

Acetona acuosa al 70% en medio ácido (HCl al 1%).

Metanol

Metanol en medio ácido (ácido acético al 1%).

Acetonitrilo

Las pruebas que se realizaron fueron combinando -  
cada uno de los adsorbentes con los diferentes disolventes, -  
éstos se emplearon en orden creciente de acuerdo a su polari-  
dad, hasta obtener una mejor separación del gosipol y las clo-  
rofilas, y las mejores condiciones de trabajo a las que se lle-  
garon se indican en la siguiente metodología.

#### MATERIAL

Columna de vidrio de 20 cm de alto por 1 cm de diá-  
metro.

Matraz erlenmeyer de 250 ml

Probeta de 50 ml

Papel filtro Watman Núm. 40 de 11 cm de diámetro.

Perlas de vidrio

Agitador mecánico

Pipetas volumétricas de 20 y 5 ml.

#### DISOLVENTES

Solución acuosa de acetona

Solución de acetona en medio ácido (HCl 1%)

#### PREPARACION DE LAS MEZCLAS ELUYENTES

Solución acuosa de acetona.- Mezclar 700 ml de acetona para análisis y 300 ml de agua destilada.

Solución acuosa de acetona al 80%.- Mezclar 800 ml de acetona para análisis acuosa y 200 ml de agua destilada.

Solución acuosa de acetona en medio ácido: Mezclar 99 ml de disolución de acetona acuosa al 70% y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Solución estándar de gopipol.- Pesar exactamente 10 mg de gopipol en acetona y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 30 ml de agua destilada, mezclar y diluir a volumen con acetona y mezclar nuevamente. Pipetear 20 ml de ésta disolución y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 20 ml de agua destilada, mezclar y aforar con acetona.

Preparación de la muestra.- La muestra exactamente pesada (no más de 1 g), se transfiere a un matraz erlenmeyer -

de 250 ml, que contiene unas perlas de vidrio, Se adicionan -  
50 ml de solución acuosa de acetona al 70%, se tapa el matraz  
y se agita mecánicamente durante una hora, después de este - -  
tiempo la solución se filtra a través de un papel filtro seco,  
y el filtrado se recoge en un matraz con tapón de vidrio. Los  
primeros 10 ml del filtrado se desechan.

Tomar una alícuota de 20 ml de filtrado, transfi--  
riéndola en la columna previamente empacada para que eluya a -  
gravedad.

La mejor separación del gosipol de la mayor parte  
de los pigmentos fue al utilizar una columna empacada con alu-  
mina ácida (3 cm de altura por 1 cm de diámetro) y suspendida  
en acetona, eluyendo primero los pigmentos con acetona y con -  
acetona acuosa al 80%, posteriormente eluyendo al gosipol con  
una mezcla de acetona acuosa al 70% en medio ácido (HCL 1%). -  
Se utilizó un volumen de elución para el gosipol de 50 ml. To  
mar una alícuota de 10 ml de esta solución para cuantificar al  
gosipol colorimétricamente por medio del método oficial, el --  
cual utiliza anilina como reactivo para formar un complejo co-  
lorido con el gosipol llamado dianilinosipol.

Sin embargo al tomar una alícuota y cuantificar al  
gosipol por medio del método colorimétrico, se observó que no  
se tenía una separación total del gosipol y los otros componentes  
de las plantas, ya que al obtener un espectro de absorción

de esta solución (problema) y otro del estándar y compararlos, se observó que estos eran diferentes. (ver figura 2).

En esta figura se muestra los espectros de absorción del dianilinosipol obtenidos por la reacción entre el gosipol y la anilina.

Dado que los espectros obtenidos son diferentes y que además en el caso del espectro obtenido del extracto de las hojas de la malvácea no se observa ningún máximo de absorción y la forma del espectro nos indica que existen otros compuestos en las plantas que aún siguen interfiriendo en la cuantificación del gosipol;

## V.2.- METODOS DE SEPARACION Y VALORACION DEL GOSIPOL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION;

Debido a los resultados anteriores fué necesario utilizar otro método de análisis más específico, y se empleo el método de cromatografía de líquidos de alta presión en donde no interfieren las clorofilas.

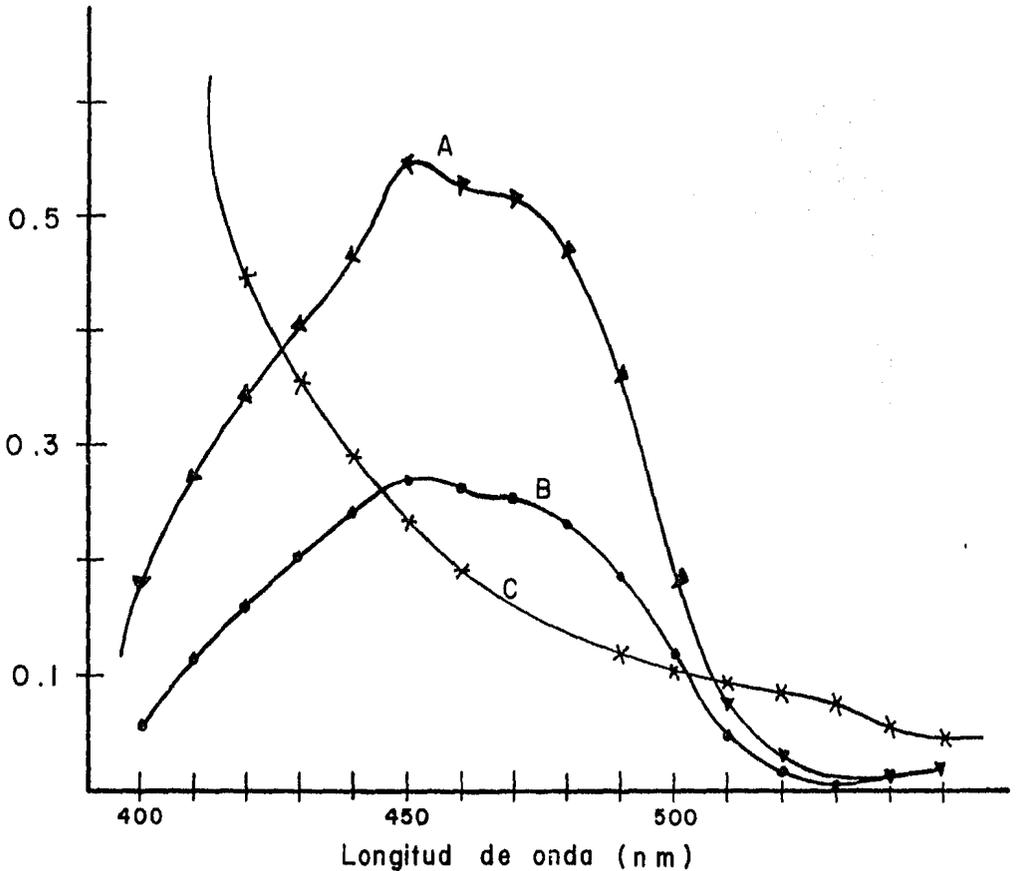
Se plantearon como objetivos:

- a) Establecer la metodología para la determinación de gosipol por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

## Figura 2

Absorbancia

ESPECTRO DEL DIANILINOGOSIPOL



Espectro del dianilinosipol que se forma por la reacción entre el gosipol y la anilina.

- A Dianilinosipol en solución de acetona al 70% en medio -- ácido (HCl 1%)
- B Dianilinosipol formado después de pasar el gosipol a través de la columna de alúmina ácida, en solución de acetona al 70% en medio ácido (HCl 1%)
- C Espectro de la reacción entre anilina con un extracto de - hojas de una malvácea (una vez eliminada la mayor parte de las clorofilas) en solución de acetona al 70% en medio - - ácido (HCl 1%).

- b) Efectuar un estudio comparativo de -- los métodos de cromatografía de líquidos de alta presión con el método colorimétrico para la determinación de gósipol libre en muestras en las que se conoce la existencia de gósipol y analizar sus diferencias.
- c) Una vez establecido el método por -- HPLC determinar el contenido de gósipol en las malváceas.

Para realizar el estudio comparativo de los métodos de HPLC y colorimétrico se utilizaron las siguientes muestras:

Semilla de algodón

Semilla de algodón desengrasada

Aceite de semilla de algodón (extraído con Soxhlet)

Aceite de semilla de algodón (extraído con disolvente en frío).

Las siguientes harinolas (harinas de semilla de algodón desengrasadas) existentes en el mercado:

ALBAMEX: Gerencia Regional de Occidente.- Guadalara  
jara, Jalisco, antigua carretera a Chapala  
la no. 3651, apartado postal 39203.

ALBAMEX: Gerencia Regional del Centro Sur Km 16,3  
carretera Los Reyes Texcoco, México, - -  
Apartado Postal no. 8.

LA HACIENDA, S.A. de C.V., Poniente 134 no. 680,  
Col. Industrial Vallejo.

FLAGASA: Poniente 146 No. 900, Colonia Vallejo

Para poder establecer las condiciones adecuadas pa  
ra la determinación de gosipol por HPLC se tomó como base el -  
método de cromatografía de líquidos de alta presión propuesto  
por Abou-Donia y Sherif (23), en donde se reporta la cuantifi-  
cación de gosipol bajo las siguientes condiciones de trabajo:

Columna: u Bondapak C<sub>18</sub>

Eluyente: Metanol-agua (80:20) en ácido fosfórico  
al 1%.

Detección a una longitud de onda de 254 nm.

Utilizando estas condiciones se reporta un tiempo  
de retención de 5.68 min y 5.72 min para el estándar de gosi-  
pol y el gosipol obtenido de semilla de algodón respectivamen-  
te.

Sin embargo, bajo estas condiciones al inyectar la  
muestra en un cromatografo Varian, modelo 5 000 con vista, y -  
eluirlo en una columna de fase inversa tipo MCH 10 no fué posi

ble detectar el gosipol.

Para establecer las condiciones adecuadas en la de-  
terminación del gosipol tanto en semilla de algodón como en --  
sus derivados, se corrió un espectro de absorción en la región  
de luz ultravioleta del gosipol disuelto en acetona, el cual -  
se muestra en la figura núm. 3. En la que se observa al gosi-  
pol que tiene 2 máximos de absorción, uno a 254 nm y otro a --  
290 nm. Seleccionándose la longitud de onda de 254 nm para las  
posteriores determinaciones.

Además se efectuaron variaciones en cuanto al flu-  
jo y mezcla de disolvente para eluir extractos de las muestras  
hasta obtener una mejor resolución.

Los eluyentes que se probaron son:

Metanol 100%

Metanol-agua (80:20)

Metanol-agua (70:20)

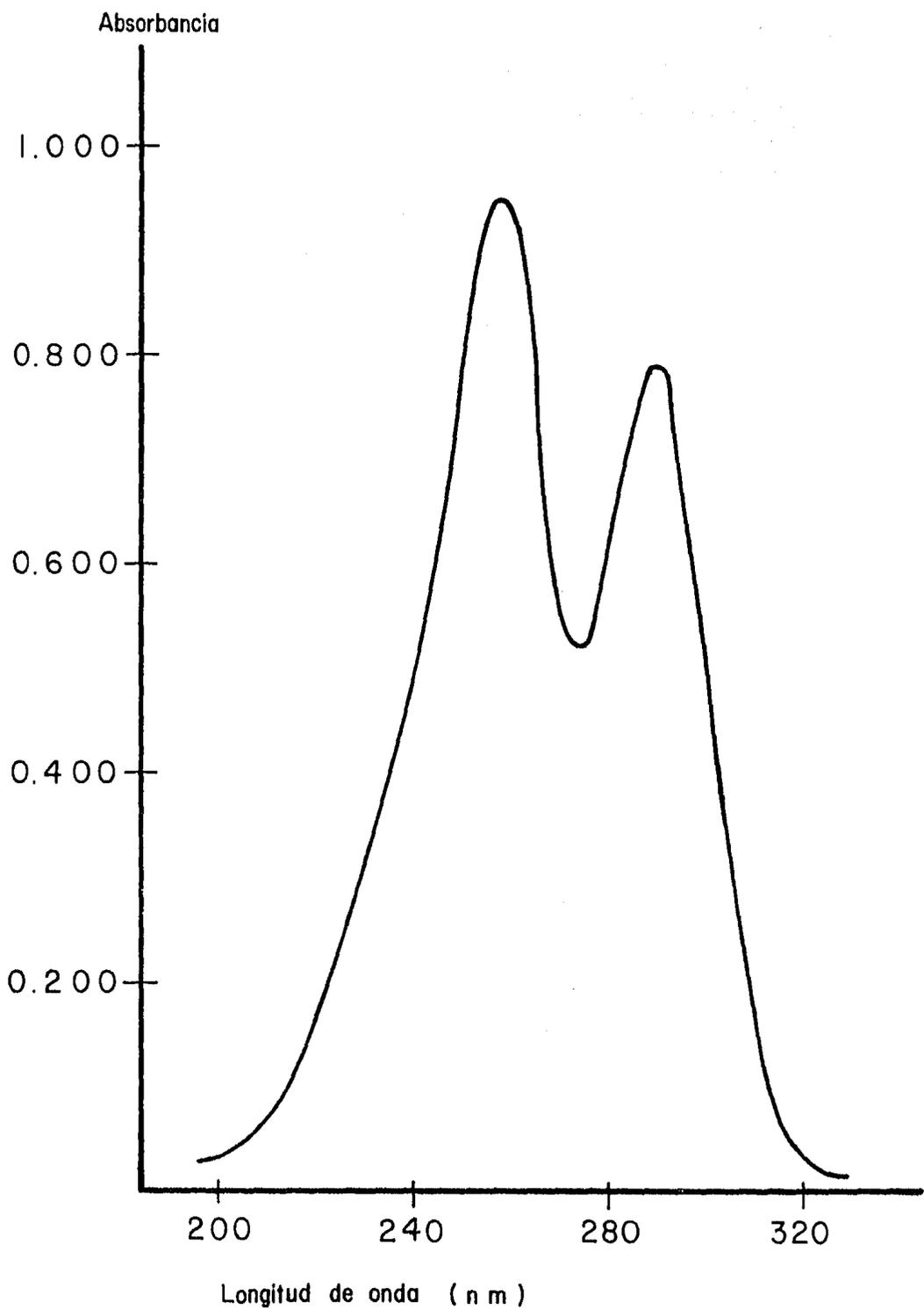
Acetonitrilo 100%, 98%, 97%, 96%, 95% y 92%.

La variación del flujo fue de:

0.5 ml/min, 0.8 ml/min, 1.0 ml/min, 1.5 ml/min y -  
2.0 ml/min.

En la sección de resultados se muestran los obteni

Figura 3



dos, y las condiciones de trabajo a las que se llegaron con - las que se obtenía una mejor resolución (analizando las muestras de harinolinas, que eran las que presentaban mayor problema), que a continuación se indican:

### V.3.- DETERMINACION DE GOSIPOL LIBRE -- POR EL METODO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION

#### MATERIAL

Agitador mecánico

Matraz erlenmeyer de 250 ml con tapón de vidrio

Perlas de vidrio

Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5,6,7,8 y 10 ml

Papel filtro Watman no. 40 de 11 cm de diámetro

Probeta de 50 ml

Equipo de filtración Millipore con desionizador para agua.

Matraces volumétricos de 10 ml y dos de 100 ml.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión, modelo Varian 5 000 con vista, detector de longitud de onda variable UV 50 y un integrador por computadora vista modelo CDS 401.

#### DISOLVENTES

Solución acuosa de acetona

Solución estándar de gosipol

Acetonitrilo para cromatografía (MERCK)

#### PREPARACION DE LAS MEZCLAS DE ELUYENTES

El acetonitrilo y el agua desionizada se filtraron a través de un filtro Millipore utilizando una membrana tipo HA de tamaño de poro 0.45  $\mu$ m, tres veces y una vez respectivamente.

Solución acuosa de acetona.- Mezclar 700 ml de acetona para análisis y 300 ml de agua destilada.

Solución estándar de gosisol.- Pesar exactamente 10 mg de gosisol puro, disolver en acetona y transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 30 ml de agua destilada, mezclar y diluir a volumen con acetona. Pipetear 20 ml de esta solución y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 20 ml de agua destilada, mezclar y aforar con acetona. Esta solución es estable durante 24 hrs. cuando se protege de la luz.

Preparación de la muestra.- La muestra exactamente pesada, (no más de un gramo) se transfiere a un matraz erlenmeyer de 250 ml que contiene perlas de ebullición. Con una pipeta volumétrica se adicionan 50 ml de solución acuosa de acetona, se tapa el matraz y se agita durante una hora, empleando para éste fin un agitador magnético. Después de este tiempo la solución se filtra a través de un papel filtro seco

y el filtrado se recoge en un matraz con tapón de vidrio, los primeros 10 ml del filtrado se desechan. Con el fin de reducir la evaporación, durante la filtración se coloca un vidrio de reloj sobre un embudo.

Una alícuota de este extracto se filtra a través de un filtro de membrana Millipore de tipo HA con tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ . Se inyecta en el cromatógrafo una vez teniendo las condiciones adecuadas de trabajo.

#### CONDICIONES DE TRABAJO EN EL CROMATOGRAFO

Eluyente: Acetonitrilo-agua (92:8)

Columna: MCH 20

Flujo: 1 ml/min

Presión: 110 atm.

Atenuación: 64

Temperatura: Ambiente

Longitud de onda: 254 nm

Velocidad del papel: 0.4 cm/min.

Tiempo de retención del gósipol: 5.8 min.

El gósipol fue captado con un detector de absorbancia U.V. del eluato de la columna y cuantificado por medio de un integrador por computación, el cual midió el área de los picos.

## PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR

Se pipetea alcuotas de 1,2,3,4,5,6,7,8 y 10 ml de la solución estándar de gosipol (20 ug/ml), se transfieren a matraces volumétricos de 10 ml y se diluyen al volumen con solución acuosa de acetona, se mezclan bien y se filtran a través de un filtro de membrana Millipore de tipo HA de tamaño de poro 0.45 um. Dadas las condiciones adecuadas de trabajo se inyecta respectivamente cada concentración de las soluciones patrón, para obtener sus cromatogramas correspondientes, de los cuales se lee el área registrada del pico de gosipol que tiene un tiempo de retención de 5.8 min.

## CALCULOS

En un papel milimétrico se grafica el área del pico del gosipol contra la concentración de gosipol (ug/ml). Esta curva sirve como patrón de referencia para conocer la concentración de gosipol libre en las muestras por simple extrapolación de sus áreas.

$$\% \text{ GOSIPOL LIBRE} = \frac{5G}{1000 (W)}$$

Donde: G = ug de gosipol libre en la muestra

W = peso de la muestra en gramos

NOTA: Este método fue el que se utilizó para la -  
determinación de gosipol libre en la malva-  
cea.

#### V.4.- DETERMINACION DE GOSIPOL LIBRE POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO (5)

##### MATERIAL

Agitador mecánico

Baño maría regulado a 100°C

Perlas de vidrio

Matraz erlenmeyer de 250 ml con tapón de vidrio

Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5,10 y 50 ml.

Papel filtro Whatman No. 40 de 11 cm de diámetro

Matraces volumétricos de 25, 100 y 250 ml

Espectrofotómetro CARL ZEISS modelo PQM 2

##### REACTIVOS

Acetona para análisis (MERCK)

Anilina, reactivo analítico (Monterrey)

Isopropanol, reactivo analítico (Monterrey)

##### DISOLVENTES

Solución acuosa de acetona

Solución estandar de gosipol (gosipol-ácido acético; Sigma Company)

#### PREPARACION DE LAS MEZCLAS DE DISOLVENTES

Solución acuosa de acetona.- Mezclar 700 ml de acetona para análisis y 300 ml de agua destilada.

Solución Acuosa de alcohol isopropílico.- Mezclar 800 ml de alcohol isopropílico, reactivo analítico, con 200 ml de agua destilada.

Anilina.- Destilar anilina, reactivo analítico, con una pequeña cantidad de granalla de zinc, usando un refrigerante, desechar los 10 primeros ml de la destilación y guardar el destilado en un frasco ambar de cierre hermético y en el refrigerador. Este reactivo es estable durante meses cuando se almacena en condiciones adecuadas. Debe redestilarse cuando el blanco "2" dé una lectura menor de 95% de transmitancia o exceda el 0.022 de absorbancia.

Solución estándar de gosipol mg/ml.- Pesar exactamente 10 mg de gosipol, disolver en acetona pura y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 30 ml de agua destilada, mezclar, diluir a volumen con acetona y mezclar nuevamente. Pipetear 20 ml de esta solución en un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 20 ml de agua destilada.

da, mezclar y diluir a volumen con acetona. Esta solución estándar es estable durante 24 horas cuando se protege de la luz.

Preparación de la muestra.- La muestra exactamente pesada (no más de 1 g) se transfiere a un matraz erlenmeyer de 250 ml que contiene unas perlas de ebullición. Con pipeta volumétrica, se adicionan 50 ml de solución acuosa de acetona, se tapa el matraz y se agita durante una hora, empleando para este fin, un agitador magnético. Después de este tiempo la solución se filtra a través de un papel filtro seco y el filtrado se recoge en un matraz con tapón de vidrio, los primeros -- 10 ml del filtrado se desechan. Con el fin de reducir la evaporación durante la filtración se coloca un vidrio de reloj sobre el embudo.

Por duplicado se pipetea alcuotas del filtrado de 10 ml/g de muestra (Nota 1) y se transfiere a matraces volumétricos de 25 ml, una de las alcuotas se diluye a volumen -- con solución acuosa de alcohol isopropílico (solución A) y a la otra alcuota (solución B) se le agregan 2 ml de anilina redestilada (usar una pipeta que descargue rápidamente) y se calienta en un baño maría a temperatura de ebullición durante -- treinta minutos, junto con un blanco de reactivos que contiene 2 ml de anilina y un volumen de solución acuosa de acetona -- igual al volumen de la alcuota de la muestra.

Se retira la solución B y el blanco del baño agregándoseles suficiente solución acuosa de alcohol isopropílico para homogenizar la solución, se enfria a temperatura ambiente en un baño de agua y se diluye al aforo con solución acuosa de alcohol isopropílico.

Se determina la absorbancia o el % de transmitancia a 450 nm; para la solución A se ajusta el instrumento a 100% de transmitancia con solución acuosa de alcohol isopropílico, una vez ajustado, se lee el porcentaje de transmitancia del blanco de reactivos que debe ser de 95%. En caso contrario se repite el análisis empleando anilina recién destilada.

Nuevamente el instrumento se ajusta a 100% de transmitancia empleando en este caso el blanco de reactivos, enseguida se lee el % de transmitancia de la solución B.

Preparación de la curva estándar.- Se pipetea por duplicado alícuotas de 1,2,3,4,5,7,8 y 10 ml. de la solución estándar de gósipol, (0.02 mg de gósipol/ml) y se transfiere a matraces volumétricos de 25 ml (a un grupo de alícuotas se les denomina A y al otro B).

Las alícuotas designadas como A se diluyen a volumen con solución acuosa de alcohol isopropílico y se determina la absorbancia o transmitancia de cada alícuota exactamente como en los problemas, o sea, ajustando el instrumento a 100% de

transmitancia con solución acuosa de alcohol isopropílico.

Al grupo B de las alícuotas se les adicionan 2 ml de anilina recién destilada y se lee el % de transmitancia como se leyó la solución B de los problemas, en este caso no es necesario preparar blanco de reactivos para cada alícuota de gosipol, para este fin se usa una muestra de 2 ml de anilina y 10 ml de solución acuosa de acetona, la cual se calienta y se trata en la misma forma que las alícuotas del gosipol estándar (esta solución se utiliza como blanco).

#### CALCULOS

Si las lecturas se toman en % de transmitancia, se convierten en absorbancia, mediante las siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = - \log. \text{Transmitancia}$$

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{absorbancia B} - \text{Absorbancia A}$$

En un papel milimétrico se grafica la absorbancia corregida de cada alícuota de gosipol contra la concentración de gosipol en el volumen de 25 ml. Con los valores de absorbancia corregida de cada alícuota de la muestra problema, se determinan los mg. de gosipol libre presentes en dicha alícuota por referencia de la curva estándar.

$$\% \text{ GOSIPOL LIBRE} = \frac{5G}{W \cdot V}$$

Donde: G = mg de gosipol libre en la alcuota de la muestra

W = Peso de la muestra en gramos

V = Volumen de la alcuota tomada

NOTA 1: La selección de la alcuota tomada de la muestra, depende del contenido de gosipol libre en la harina. Para harinolas con un contenido de gosipol libre de 0.01 a 0.05%, el volumen de la alcuota será de 5 ml y para harinolas con un alto contenido de gosipol se pueden emplear 2 ml.

## VI.- RESULTADO Y DISCUSIÓN

Para establecer la metodología para determinar gopipol por el método de cromatografía de líquidos de alta presión, se hicieron variaciones del flujo y tipo de eluyente y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1, en la que se puede observar que el tiempo de retención del gopipol varía dependiendo del tipo de eluyente, la velocidad de flujo y la presión.

El tiempo de retención se ve afectado por el tipo de eluyente, ya que la interacción de éste con la fase fija varía dependiendo de su polaridad. Se obtuvo un mayor tiempo de retención cuando se trabajó con las mezclas de metanol-agua, -

que con las mezclas de acetonitrilo-agua. Se observa un menor tiempo de retención a mayor polaridad del eluyente.

También se puede observar que al variar el flujo cambia el tiempo de retención, éste es menor cuando el flujo es mayor. Se debe tener cuidado en la selección de la velocidad de flujo, ya que cuando éste aumenta en algunas ocasiones se juntan dos picos en el cromatograma, impidiendo su identificación adecuada.

Por otro lado cuando empieza a haber una sobrecarga de partículas en la columna, hay un aumento en la presión, afectando el tiempo de retención de los componentes. Se observó que el tiempo de retención es mayor cuando hay un aumento en la presión si se mantiene la velocidad del flujo constante.

Las condiciones óptimas a las que se llegaron para llevar a cabo la determinación de gósipol libre, se mencionaron en el método de cromatografía de líquidos de alta presión.

En marzo de 1984, apareció un artículo (12) sobre la determinación de gósipol libre y gósipol-ácido acético por cromatografía de líquidos de alta presión, usando:

TABLA No. 1

MEZCLAS DE ELUYENTES Y TIEMPOS DE FLUJO PRBADOS PARA ESTABLE-  
CER LAS CONDICIONES OPTIMAS DE SEPARACION.

Composición del eluyente	Flujo ml/min	Tiempo de retención min	Presión atm
Metanol-agua			
100:0	1.0	7.62	76
80:20	1.0	6.77	74
70:30	1.0	6.78	76
Acetonitrilo-agua			
100:0	0.5	--	38
98:2	1.0	4.51	48
97:3	1.0	4.54	40
96:4	0.8	5.57	36
96:4	1.0	4.52	40
95:5	1.5	2.99	36
95:5	2.0	2.2	78
92:8	1.0	4.8	80
92:8	1.0	5.8	110
92:8	2.0	2.4	122

Eluyente: acetonitrilo-agua-ácido acético (7:2:1)

Columna: u Bondapak C<sub>18</sub>

Tiempo de retención: 9.18 min.

Flujo: 1 ml/min.

En este artículo se indica que bajo estas condiciones se obtiene una mejor separación para la detección de g<sub>o</sub>sipol-ácido acético detectándolos a una longitud de onda de 254 nm. Sin embargo las condiciones obtenidas en nuestro trabajo, difieren de los datos reportados del trabajo mencionado. En nuestro estudio se trabajó con una columna de fase inversa, MCH 10, pero diferente eluyente (Acetonitrilo-agua; 92,8) con el cual se obtuvo una buena resolución al hacer la determinación en semilla de algodón y derivados. También hubo diferencia en el tiempo de retención (5.8 min).

Además de establecer la metodología para la determinación de g<sub>o</sub>sipol por HPLC se hizo un estudio comparativo de este método con el método colorimétrico, analizando sus diferencias para poderlo utilizar posteriormente en el análisis de las malváceas.

En la tabla No. 2 se muestran los resultados del contenido de g<sub>o</sub>sipol libre obtenidos por el método de cromatografía de líquidos de alta presión y el método colorimétrico en semilla de algodón y derivados.

CONTENIDO DE GOSIPOL LIBRE EN SEMILLA DE ALGODON Y DERIVADOS

M U E S T R A	Método colorimétrico mg/100 g de muestra $\pm$ DS*	Método H P L C mg/100 g de muestra $\pm$ DS*
Semilla de algodón	510.35 $\pm$ 12.07	455.36 $\pm$ 28.67
Semilla de algodón desengrasada	61.83 $\pm$ 4.78	39.09 $\pm$ 1.91
Harinolinas:		
ALBAMEX Gerencia Regional de Occidente	31.12 $\pm$ 1.06	16.38 $\pm$ 0.85
ALBAMEX Gerencia Regional del Sur	40.26 $\pm$ 4.74	18.73 $\pm$ 0.49
La Hacienda	30.40 $\pm$ 2.12	5.38 $\pm$ 0.65
FLAGASA	36.69 $\pm$ 4.70	8.60 $\pm$ 1.40
Aceite		
(Extracción por método Soxhlet)	1 361.20 $\pm$ 0.22	1 095.30 $\pm$ 0.13
Aceite		
(Extracción con disolvente en frfo)	2 072.00 $\pm$ 0.68	10 691.10 $\pm$ 0.25

\*Se hicieron 10 determinaciones en cada muestra

En los aceites el contenido de gosipol es diferente dependiendo del método por el cual fue extraído: como se puede observar en la tabla 2 el contenido de gosipol libre es menor cuando es extraído por el método Soxhlet, en el cual se aplica calentamiento ocasionando una combinación del gosipol con otros compuestos.

También se observa la gran solubilidad del gosipol en el aceite, siendo mayor su contenido en éste que en la porción desengrasada. En las harinolinas, la proporcionada por Albamex Gerencia Regional del Centro Sur es la que presenta mayor contenido de gosipol libre y la de menor es la de la Hacienda. Esto puede deberse a que existan pequeñas diferencias en los procesos de obtención entre uno y otro proveedor, o bien, a que el contenido de grasa en las harinolinas sea diferente, variando la cantidad de gosipol.

Como se puede observar en todas las muestras analizadas siempre se registró un mayor contenido de gosipol libre por el método colorimétrico. Esto es debido a que existen otros compuestos que dan la reacción en el método colorimétrico, lo cual ya ha sido comprobado por otros autores tales como: Berardi y Golblatt (6) quienes reportan la presencia de otros pigmentos relacionados con el gosipol que dan la reacción con la anilina, dentro de los cuales están el diamino gosipol, gosifulvina y gosipurpurina.

En julio de 1984 Stipanovic y colaboradores (23) demuestran la interferencia en la determinación de gósipol por medio de anilina, debida a la presencia de productos de oxidación de hidrolizados de ácidos grasos y triglicéridos insaturados.

En la comparación de los métodos aplicando la prueba de "t" de Student apareada, se encontró que hay diferencia significativa con un nivel de significancia de 0.05 entre los métodos, aún en aquellos casos en donde la cantidad de gósipol obtenida en ambos métodos es muy cercana, como es el caso de la semilla de algodón.

#### CONTENIDO DE GOSIPOL EN MALVACEAS

Por ser más específico el método de HPLC en la determinación de gósipol libre y para evitar la interferencia de pigmentos de clorofila, se empleo este método en el análisis de las malváceas, que es la segunda parte de este trabajo.

En la tabla 3 se muestra el contenido de gósipol libre de la parte de la semilla y hoja de las malváceas analizadas, se observa que su contenido es diferente en todas y también difiere en las partes de gósipol libre que en la hoja, - siendo este similar en la planta de algodón.

El gósipol puede estar presente en la semilla sin contenerlo la hoja, como se puede apreciar en las especies - - *Hampea integerrima*, *Hibiscus clypeatus*, *Malvaviscus arboreus* - (I) variedad mexicana y *Pavonia schideana*.

Además se observó que dentro una misma especie -- existen variaciones en cuanto a sus características físicas y a su contenido de gósipol, tal es el caso de *Malvaviscus arboreus* en donde tres variedades se clasificaron botánicamente -- igual, pero químicamente su contenido de gósipol fué diferente una no tuvo gósipol, en otra sólo se encontró en la semilla -- y en una tercera se encontró en la semilla y en la hoja.

El contenido de gósipol en orden decreciente que presentan las malváceas estudiadas se da a continuación:

*Hampea integerrima*

*Malvaviscus arboreus* variedad mexicana (1)

*Anoda cristata*

*Hibiscus clypeatus*

*Pavonia schideana*

*Hibiscus rosa-sinensis*

En la planta *Hibiscus sabdariffa*, mejor conocida como flor de jamaica que se utiliza en la elaboración de agua fresca, no contuvo gósipol.

En la semilla *Hampea integerrima* el contenido de gossipol libre encontrado fué mayor que en la semilla de algodón, por lo que resulta interesante en investigaciones de biología de la reproducción o por la posibilidad de ser usadas -- estas plantas para la alimentación animal.

TABLA Núm. 3

CONTENIDO DE GOSIPOL LIBRE EN LAS MALVACEAS ESTUDIADAS DETERMINADO POR EL METODO HPLC.

Nombre de la planta	Semilla mg/100 g de muestra	Hoja mg/100 g de muestra
<i>Anoda cristata</i>	27.24	3.52
<i>Hampea integerrima</i>	1 180.00	0.0
<i>Hibiscus clypeatus</i>	4.37	0.0
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	2.05	1.87
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	0.0	0.0
<i>Malvaviscus arboreus</i> variedad mexicana (I)	42.69	0.0
<i>Malvaviscus arboreus</i> variedad mexicana (II)	0.0	0.0
<i>Malvaviscus arboreus</i>	4.47	0.75
<i>Pavonia schideana</i>	3.33	0.0

## VII.- CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

En cuanto a la comparación de los dos métodos empleados, el método de cromatografía de líquidos de alta presión es más específico que el método colorimétrico, el cual no distingue entre el gossipol y otros metabolitos o pigmentos de la semilla de algodón o de las plantas.

Por ser más específicos se puede emplear en el análisis de gossipol no sólo en semilla de algodón, sino también en otras partes de la planta como las hojas, que contienen --

una gran cantidad de pigmentos y bajo contenido de gossipol, -  
obteniéndose resultados más confiables.

Además, es recomendable el uso del método de cromatografía de líquidos de alta presión, porque tiene la ventaja de que se puede emplear una cantidad de muestra pequeña y es más rápida su determinación.

En cuanto a la búsqueda de gossipol en otras malváceas se encontró que en la mayoría de las malváceas estudiadas se encuentra en mayor o menor concentración que la semilla de algodón, excepto en las especies *Hibiscus sabdariffa* y *Malvaviscus arboreus* variedad mexicana (II), por lo que se puede decir que el gossipol, compuesto tóxico, es característico de la familia de las malváceas.

Se encontró una especie de malváceas con un alto contenido de gossipol, *Hampea integerrima*, con un contenido de gossipol superior a la semilla de algodón.

Es importante continuar el estudio en otras malváceas, especialmente por el gran interés que existe en la actualidad para buscar anticonceptivos o antifertilizantes. Puesto que el gossipol presenta como característica atractiva, que produce efecto antifertilizante en animales incluyendo al hombre y que este efecto es reversible, recuperándose la fertilidad al dejar de recibir el tratamiento.

Desde el punto de vista nutrición animal es también de gran importancia el estudio de estas plantas (malváceas), pues cada día se aumenta la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos para animales, y la presencia de gósipol en una nueva dieta elaborada con plantas silvestres podría ser la responsable de baja productividad, especialmente en animales monogástricos.

## VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abou-Donia M.B.  
C.M. Dieckert                      Metabolic-Fate of Gossipol:  
The metabolims of  $^{14}\text{C}$ -gossipol  
in Rats. (1970) Lipids 5(1);  
938-946.
- 2.- Abou-Donia M.B.  
Dieckert                              Gossipol: Uncoupling of Respi-  
ratory Chain and Oxidative --  
Phosforilation. (1974) Life -  
Sci. 14: 1955-1963.
- 3.- Abou-Donia M.B.                      Physiological Effects and Me-  
tabolism of Gossipol. Resi--  
due Rev. 61: 126-160; New York  
(1976).

- 4.- Adams, R.T.  
A. Geissman  
Gossypol a Pigment of Cottonseed. (1976) Chem. Rev. 61: - 555-574
- 5.- Association of Official Agricultural Chemists  
Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 11 th. ed. AOAC. Washington D.C. (1970).
- 6.- Berardi, L.C.  
Goldblatt, L.A., "Toxic constituents of Plants Foodstuff", - Liener, I.E., Academic Press: New York, chapter 7, Pag. 183 (1980).
- 7.- Boatner, Charlotte H.  
Carolyn, S. Samuels  
Maizie C. Curet  
The pigments of Cottonseed., J. American Chemical Society 69: 668-672, (1948).
- 8.- Edwards, J. Dr.  
Synthesis of Gossypol Derivates., J. American Oil Chemical Society 47 (11): 421-442, (1970).
- 9.- Chang, M.C. P.G.  
Shi S.K. Saksena  
Effects of Gossypol on the Fertility of Male Rats, Hamster - and Rabbits.; Contraception -- 21(5) 461-469 (1980).
- 10.- Farnsworth N.R.  
Waller Ph.D.  
Current Status of Plants Products Reported to Inhibit Sperm; Research Fronteries in Fertility Regulation 2: 1-16 (1982).
- 11.- Fryxell, P.A.  
The Genus Hampea (Malvacea); - Britonia 21:359-396 (1969).

- 12.- Gerald I. Zatuchini  
Carolyn K. Osborn  
Gossypol a Possible Male Anti-  
fertility Agent report of a -  
Workshop, Research Frontiers  
in Fertility Regulation 4,4 -  
(1981).
- 13.- Guide B. Marcelle  
Mohameds, Ahmed  
John M. Prezzuto  
Geoffrey A. Cordell  
Donald P. Waller  
D.D. Seejarto  
H.H. S. Fong.  
Analysis of Gossypol and Gossy-  
pol-Acetic Acid by High-Perfor-  
mance Liquid Chromatography;  
J. Pharmaceutical Sciences --  
73(4) (1984).
- 14.- Hutchinson John  
The genera of Flowering Plants  
and Giospermal based General  
Plantarum. Vol. 1,255-260 - -  
(1959).
- 15.- Kalla, N.R.  
M.Vasedev  
G. Arora  
Studies on the Male Antiferti-  
lity Agent Gossypol Acetic Acid  
III. Effect of Gossypol Ace-  
tic Acid on Rat Testicle; An-  
drologia 13:242 (1978).
- 16.- Kwichman, K. Kapyaho  
R. Sinervirta  
J. Jane  
Effect of the Gossypol on the -  
Motile and Metabolism of the -  
Human Spermatozoo. J. Reprod  
Fertility; Ltr 69;259-264, --  
(1983).
- 17.- Marck A. Hadley  
Young C. Lin  
Martin Dyn  
Effects of Gossypol on the Re-  
productive System of Male Rats.  
Journal of Andrology 2, 190-199  
(1981).

- 18.- Maximino Martfnez                      Catalogo de Nombres Cientfficos y Vulgares de la Flora Mexicana, (1979).
- 19.- M.R.N. Prasad                              Gossypol, Second International Congress of Andrology Supplementum 5, 1982.  
E. Diczfalucy
- 20.- National Coordinating                      Gossypol a New Antifertility Agent for Males; Ch. Med. J. 4 (6): 417-428 (1978).  
Group of male Antifertility Agents.
- 21.- Schery, R.W.                                Monograph of Malvaviscus; Ann Missouri Bot. Gard. 29: 183-245 (1942).
- 22.- Scharmm G.                                 Determinacion of Free gossypol Paper Chomatography; J. Am. Oil Chem. Sec. 35: 371-373 (1958).  
Benedict J.H.
- 23.- Sherif A. Abou-Donia                      High-Performance Liquid Chromatography analysis of Gossipol - Jerome M. Lasker                              Journal of Chromatography 206: 660-610 (1981).
- 24.- Sotelo A. I. Montalvo                      Infertility in Male Rats Induced by Diets Containing Whole Cottonseed Flour; J. Nutr. - - M.L. Crail                                      112(11); 2052-2057 (1982).  
M.T. González
- 25.- Stipanovic R.D.                              Factors Interfering in Gossy-- C. Donovan, Alois                              pol Analysis of Okra and Clandless Cottonseeds, Journal - - Agric. Food. Chem. : 32: 809 - 810 (1984).
- 26.- Bauber H. Henry                              Instrumental Analysis.; ed - - Gary D. Christian                              Allyn and Bacon Inc. Boston -- James E.O. Reilly                              155-176 (1978).

- 27.- Day R.A.  
Underwood A.L. Quantitative Analysis 3er ed.  
Prentice, Hall, Inc. New Jersey  
296-328 (1974)
- 28.- Flasehka H.A.  
Barnard J.R. Química Analítica cuantitativa,  
Sturrock P.E. ; Cd. Continental México -  
457-457 (1982)
- 29.- Telléz García José  
Pérez Alonso Arturo Uso y Aplicación de la Cromatografía en fase vapor. Unidad I, II, Instituto Mexicano del Petróleo. (1984).
- 30.- Yost R.W.  
Perkin Elmer Practical Liquid chromatography  
an introduction; (1980).
- 31.- McNair  
Benjamín Esquivel H. Cromatografía Líquida de Alta Presión, Secretaría General -  
de la Organización de Estados Americanos, Programa regional de desarrollo Científico y --  
Tecnológico, Washinton, D.C.  
1981.