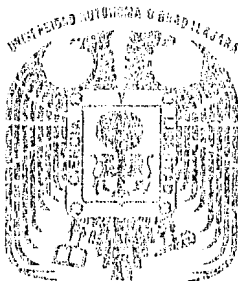


870127
1
1g'

Universidad Autónoma de Guadalajara

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS CON
FALLA DE CEX.CEN

Efecto Congulante de las Cortezas del Fruto del Limón.
(Citrus Limonum)

TESIS PRESENTADA AL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
PAULINA HERNÁNDEZ GARDENAS

GUADALAJARA, JAL.

1981



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

PAG

CAPITULO I

INTRODUCCION.

1

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS.

11

CAPITULO III

RESULTADOS

30

CAPITULO IV

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

40

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

43

**EFFECTO COAGULANTE DE LAS CORTEZAS DEL FRUTO
DEL LIMÓN (CITRUS LIMONUM)**

PAULINA HERNANDEZ CARDENAS

DEDICATORIAS

*Dedico esta tesis a Cristo
Nuestro Señor, por haberme
permitido realizar mis es-
tudios profesionales.*

A MIS PADRES.

*Con infinito cariño y respeto
por sus sacrificios y esfuer-
zos que pasaron para la reali-
zación de mi carrera.*

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS.

Con gratitud y afecto.

A MIS HERMANOS.

*Francisco, Priscila, Gerardo
José Luis, Roberto y María -
Teresa con todo cariño.*

C A P I T U L O I
I N T R O D U C C I O N

Los productos naturales tienen una importancia primordial en la vida del hombre. Desde los frutos, flores y plantas en general más comunes, que frecuentamos a diario, - hasta las más raras especies, pueden ser de cierta utilidad para el hombre.

Existen plantas muy difíciles de recolectar debido a que se reproducen solo en ciertos lugares, bajo ciertas -- condiciones ambientales, de reproducción muy lenta pero que -- sin embargo son muy útiles al hombre por la gran cantidad de sustancias medicinales que contienen; existen plantas que se tienen en grandes cantidades, que se observan en cualquier -- lugar pero sin embargo no han sido estudiadas a fondo; podría ser que muchas de estas plantas tuvieran ciertas sustancias -- medicinales, aunque en poca cantidad, estas plantas podrían -- ser utilizadas en un futuro en que se agotaran las fuentes -- actuales de abastecimiento.

Existen una gran cantidad de plantas que se utilizan aún en la actualidad como remedios, ya sea inhalado, ingerido, sobre la piel, etc. y a pesar de estas referencias -- que se tienen, y de la efectividad que se ha demostrado en -- muchas ocasiones, no se han elevado estudios más a fondo de -- estas plantas. La investigación de dichos principios activos es muy importante, porque se podría llegar a saber cuáles -- la sustancia encargada de cierto efecto; posteriormente -- conociendo ya la estructura de esa sustancias, se podría ha-

cer una síntesis de la misma a nivel industrial, en caso de que no fuera costeable la obtención de esos principios activos a partir de la planta que se investigó.

Mediante las observaciones expuestas anteriormente se trata de dar a conocer no solo la importancia que tienen los productos naturales en medicina, sino que también pueden ser útiles para otras necesidades del hombre; como podrían servir para la obtención de nuevas fibras, que después se utilizarían para la producción de papel o telas; otro ejemplo sería la producción de colorantes a partir de las plantas, de uso decorativo; otras plantas pueden tener un alto contenido de sustancias nutritivas, que podrían servir para la alimentación de ciertos animales, y así se podrían enumerar una gran cantidad de utilidades de las plantas.

El limón (*Citrus limonum*) es un cítrico bien conocido en nuestro país, y se sabe de sus múltiples usos que se le dan a este fruto. El limón se ha explotado bastante por su gran contenido en ácido ascórbico (Vitamina C) y ácido cítrico en el jugo. Pero en cuanto a su corteza no se ha explotado bastante. Por ciertas referencias se ha sabido que ésta tiene cierto efecto coagulante, por lo cual este estudio está enfocado en tratar de conocer las sustancias causantes de dicha acción, o por lo menos tratar de saber a que grupo de sustancias pertenece en general.

El limón (*Citrus limonum*) pertenece a la familia de las Rutáceas. A continuación se dará un esquema taxonómico, mostrando las principales especies de los Citricos. - (Tabla I).

Descripción del limón:

Hesperidio ovoideo u oblongo terminado en un mamelón; de piel más o menos gruesa, lisa o verrugosa, de color amarillo flavedo, con pequeñas vesículas conteniendo aceites esenciales. Está constituido por 8-15 segmentos de gajos rodeados de una materia blanca, relativamente dura: el albedo; las semillas, lisas y puntiagudas, en número variable, están fijas en el borde interno de cada segmento los cuales encierran el jugo o zumo contenido en sacos formados por células de pared delgada.

El zumo del limón natural o conservado se destina a la preparación de bebidas refrescantes, y los limones se utilizan en culinaria, confitería, perfumería y como dietoalimento por su riqueza en ácido ascórbico (Vitamina C) y Vitamina P. El zumo es un desinfectante que se utiliza en las afecciones faríngeas.

Los limones se encuentran en gran cantidad en diversos lugares del país, en casi toda la costa del Pacífico en los Estados de Colima, Guerrero, Michoacán, Jalisco y -- por el Golfo de México en Veracruz, Tabasco, Campeche y o--

TABLA 1
TAXONOMIA.

Geraniales
(el orden natural
comprende 21 familias)

Geraniineae
(suborden comprendiendo 12 familias)

Rutaceae
(familia con 7 subfamilias)

Aurantioideae
(subfamilia con 2 tribus)

Clauseneae
(consiste en 3 subtribus
5 generos, 79 especies y
20 variedades)

Citrae
(con 3 subtribus)

Triphasiinae
(8 generos, 46 especies
y 3 variedades)

Citrinae
(con 13 generos, 65 espe-
cies y 15 variedades)

Balsamocitrinae
(con 7 generos
y 13 especies)

Subtribus

A
(5 generos y 14
especies)

B
(2 generos, 22 espe-
cies y 4 variedades)

C
(6 generos, 29 es-
pecies y 11 va-
riedades.

Genera:

Fortunela
(4 especies
y una varie-
dad)

Eremocitrus

Ponicitrus
(1 variedad)

Clymenia

Microcitrus

Citrus
(6 espe-
cies y
una va-
riedad.

- C. limonum* {limón}
- C. aurantifolia* {lima}
- C. aurantium* Linn.
- C. sinensis* Osbeck.
- C. medica* Linn.
- C. nobilis* Andrews
- C. maxima* Merr.
- C. bergamia* Risso.
- C. grandis* {Linn.} Osbeck.

tres lugares.

En los estados mencionados anteriormente, este -- fruto crece sin ningún cultivo en especial, debiendo hacer especial mención que en el Estado de Colima se encuentra una plantación con una alta producción de este fruto.

Los principales componentes del limón son el ácido ascórbico y el ácido cítrico.

El ácido ascórbico conocido también como vitamina C, es la vitamina cuya ausencia da origen al escorbuto. Esta enfermedad, antes tan común entre los marineros, se caracteriza por la tendencia a sangrar y la aparición de cambios patológicos en dientes y encías. En el cobayo, en el que puede inducirse escorbuto experimentalmente por una dieta carente de "verdes", las articulaciones se agrandan y se vuelven dolorosas.

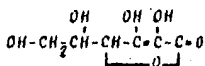
Durante mucho tiempo se sabía que los frutos frescos y las verduras son excelentes fuentes antiescorbúticas. Los cereales y las legumbres secos prácticamente no contienen vitamina C. Las semillas secas están desprovistas en general de vitamina C pero como resultado de la germinación -- (al humedecerlas y calentarlas ligeramente) aparece la vitamina C.

Son muy buenas fuentes de vitamina C los frutos cítricos (naranja, limones), bayas, melones, tomates, pimientos verdes, col cruda y las plantas verdes de ensalada. -- Los vegetales foliares verdes contienen cantidades apreciables, aunque al guisarlos se producen pérdidas. La cereza-cubana es la fuente más rica de ácido ascórbico, entre los frutos.

La sustancia pura es ópticamente activa, es soluble en agua y es un reductor muy fuerte. Se oxida fácilmente al aire en especial en presencia de indicios de iones metálicos, como Cu^{+2} o Fe^{+3} .

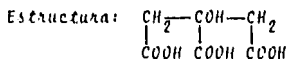
Las plantas y todos los animales, salvo el cerdo, el hombre y los primates, puede sintetizar ácido ascórbico; el hígado y las adrenales son probablemente los principales lugares de síntesis. En las plantas todos los tejidos contienen vitamina C, salvo los leñosos o las semillas, aunque se encuentra en los primeros estados de germinación.

Estructura:



El ácido cítrico se le encuentra muy repartido en la naturaleza, principalmente en los zumos de un gran número de frutos de las diferentes especies del género Citrus, en ciertos tubérculos y raíces como la remolacha, la granza,

también en pequeñas cantidades en casi todos los jugos de las plantas en presencia del ácido málico; siendo la fuente principal para obtenerlo, el zumo del limón que es el que mayor cantidad contiene.



El porcentaje de pectina varía según el tipo de limón, pero en general se encuentra alrededor de un 40%. Todas las cortezas de los agrios contienen cantidades relativamente grandes de pectina; los frutos no del todo maduros son los que tienen mayor cantidad de esta sustancia, -- y a medida que su maduración avanza, disminuye la cantidad de pectina en la corteza.

Los componentes de *Citrus limonum* estudiados fueron a nivel del pericarpio (cáscara), encontrándose una --- gran variedad de sustancias, nuestro estudio fue enfocado -- en su mayor parte, a los extractos que contienen los principios activos, responsables de la acción coagulante.

Aunque la coagulación de la sangre se caracteriza por la conversión de fibrinógeno soluble en su derivado insoluble, fibrina, el proceso total, *in vitro* o *in vivo*, que -- conduce a este paso crucial es bastante complicado e implica una serie de compuestos, los factores de coagulación, --

que entran en interacción de una manera sucesiva que comprende muchas reacciones consecutivas.

C A P I T U L O II
MATERIAL Y METODOS

Como paso inicial de la investigación, se procedió a la recolección de la corteza del limón, se recolectó la cáscara de 2,000 limones aproximadamente, y se decidió hacerlo cuando el limón estaba todavía verde, antes de llegar a su completa maduración. La razón de haberlo recolectada en esta etapa, fue porque en este estado de desarrollo la cáscara o corteza del limón es más gruesa.

Una vez recolectado se procedió a desprender las cáscaras del fruto, para poder secarlas libremente; el procedimiento del secado se llevo a cabo al aire libre, esto fue con el motivo de evitar degradación de algunos compuestos si se hiciese por métodos en que se aplica calor. Las cáscaras se pusieron a secar al sol pero no directamente, porque esto produce cambios en el color de estas, que puede ser debido por oxidación o reducción de ciertos compuestos. El secado debía ser lo más rápido posible evitando ponerlos en lugares húmedos, para impedir el crecimiento de microorganismos.

Una vez seco el material se siguió con la molienda, esto se hizo con un molino de cuchillas. Ya molido el material se obtuvo un peso total de 1,963 gr.

En seguida se procedió a la extracción con diferentes solventes utilizando un aparato extractor (sistema Soxhlet), con este sistema se pueden trabajar muestras has-

ta de 200 gr, dependiendo del tamaño de Soxhlet utilizado, y utilizan bajas cantidades de solvente, ya que esta basado en un proceso de recirculación, la temperatura puede ser -- controlada con este método, evitando así la descomposición de sustancias sensibles al calor.

La extracción se hacía hasta la obtención de un filtrado claro. El primer solvente utilizado fue el éter -- de petróleo; el cual tiene una temperatura de ebullición entre 30° y 60°C, es un buen disolvente grasa y ceras. Para -- la extracción con este solvente, no se llevó a cabo por el método de Soxhlet, sino que solo se hizo un lavado preliminar para desengrasar antes de usar el siguiente solvente.

El segundo solvente utilizado fue el éter etílico; este tiene una temperatura de ebullición de 34°C; es un --- buen disolvente para la mayoría de los compuestos orgánicos de polaridad intermedia. Este solvente nos sirvió para aumentar la eliminación de grasas. Se usó el método Soxhlet.

El tercer solvente utilizado fue el tetrahidrofurano, con una temperatura de ebullición de 64°C; el cual -- tiene características también como el éter, por lo cual sirve también para disolver grasas y otros compuestos por las propiedades que le confiere su estructura cíclica. Con este solvente, la extracción se llevó a cabo también por el -- método de Soxhlet.

El siguiente solvente utilizado, fue el metanol, - con una temperatura de ebullición de 65°C. Es un buen solvente para componentes de origen vegetal; esta extracción - se realizó también por el método de Soxhlet.

Por último se utilizó el agua. Para esta extracción, no se pudo utilizar el método de Soxhlet, por lo que se hizo una separación manual, calentando el material contenido en el agua a baño maría, para no elevar demasiado la temperatura; luego se filtró para obtener solo las sustancias solubles en agua.

El motivo de haber utilizado el agua al último, - fue porque, como es el mejor solvente, pudo extraer las sustancias que no habían sido separadas anteriormente. Otro motivo fue, por tener la temperatura de evaporación más alta, y porque para secar la planta completamente y seguir extrayendo, hubiera sido muy tardado, lo que hubiera sido tiempo suficiente para la proliferación de microorganismos.

Terminada la labor de extracción, se fue evaporando poco a poco el solvente de cada extracto, unos se hicieron en la campana, otros en un concentrador de muestras, y otros fueron evaporados a baño maría, debido a su poca volatilidad, esto se hizo con el fin de prevenir contaminaciones, sobre todo en el extracto con agua. En unos casos las cantidades de solvente utilizado fue alta, por lo que hubie

se sido mejor liofilizar la muestra, pero no se contaba con el equipo adecuado.

A continuación se enunciarán todas las pruebas llevadas a cabo:

1.- Prueba para alcaloides:

A) PRUEBA DE WEBB. Aplicable para muestras de -- 0.1 a 5.0 gr. Se mezcla con suficiente HCl al 1% para formar una suspensión y obtener 2 ml de filtrado. La suspensión se vierte a un matraz Erlenmeyer y se coloca a baño -- maría. La mezcla se calienta y se sacude periódicamente; -- después se retira la suspensión, se deja enfriar y se filtra. Si el filtrado es menor de 2 ml, se añade al residuo -- suficiente HCl al 1% para ajustar el filtrado a 2 ml. Por -- separado se ensayan alcuoras de 0.2 ml del filtrado con -- volúmenes de 0.1 ml de reactivos para alcaloides (Mayer, -- Marquis, Erdman).

B) Método de Cain: Una cantidad de muestra se -- disuelve en un tubo de ensayo (75x12mm) con HCl 2N saturado con NaCl, durante 15 a 30 min.; la mezcla se filtra. El -- filtrado se ensaya con los reactivos de alcaloides.

Reactivos para alcaloides:

a) Reactivo de Mayer. La solución no debe conte-- ner ácido acético o etanol, porque disuelven los precipita-- dos. Solo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo --

porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

b) Reactivo de Wagner. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides, forman precipitados floculentos color marrón.

c) Reactivo de Marquis.

d) Reactivo de Erdmann.

C) Cromatografía en papel. El papel utilizado -- fue Whatman No 1 impregnando con formamida y el solvente utilizado fue: butanol-ácido acético-agua (10:2:1).

11.- Prueba de Keller:

Coloca 1 gr de muestra en 10 ml de alcohol al 80% en una cápsula de porcelana y ponerla a baño de vapor hasta sequedad. A gregue 3 ml de FeCl_3 estandar, agite para mezclar bien y pasarlo a un tubo de ensayo pequeño. Con el tubo de ensayo coloquelo en un ángulo de 45° , resbale un ml. de H_2SO_4 conc. para permitir que corra hacia abajo por la pared interna del tubo de ensayo. No agite de nuevo el tubo de ensayo a este punto. Observe si se forma un anillo en la interfase e indicarla la presencia de 2 desoxioazúcares.

III.- Prueba de azúcares:

A) Se coloca una pequeña cantidad de muestra en un tubo de ensayo y se agregan 10 gotas de agua destilada, 2 - gotas de una solución fresca de alfa naftol, agregada directamente a la solución y no sobre los lados. Mezclar y agregar 5 ml de H_2SO_4 resbalando por la pared del tubo, para que se forme una capa en el fondo del tubo. La formación - de un anillo rosa a violeta indica la presencia de carbohi- dratos.

B) A una pequeña cantidad de muestra, se agregan- 5 ml de una solución 1% del reactivo de Bials. Calentar la mezcla hasta ebullición y luego dejar enfriar. Un color -- verde o precipitado verde floculento, indica la presencia - de una pentosa.

C) A una pequeña cantidad de muestra, disuelta en- 2ml de agua destilada, se agregan 5 ml de solución de Bene- dict y hervir por 2 minutos. Un precipitado verde amarillen- to, luego a rojo ladrillo, indica la presencia de hexosas.

IV.- Cromatografía para carbohidratos:

Se usó un procedimiento unidimensional descendente. El papel filtro usado es el Whatman No 1. Para obte- - ner resultados convenientes se usan hojas grandes (25 x 50). Para que el frente corra 20 a 40 cm. En una mancha se -- puede colocar de 10 a 50 mg. Se debe procurar que el diáme

tro de la mancha no pase de 2 a 3 mm. Una alta concentración de sales desplaza irregularmente las manchas, favoreciendo a la aparición de colas y puede impedir la formación de color. La fase móvil utilizada fue n-butanol-piridina-agua (9:5:4); el agente cromogénico usado, nitrato de plata 0.1 N en NH_4OH 5.0 N. El papel se rocía con esta solución después de haberla secado dando manchas a temperatura ambiente.

V.- Prueba para aceites volátiles:

Se calienta a ebullición una pequeña cantidad de muestra y se huele el vapor. Un olor aromático indica la presencia de aceites volátiles.

VI.- Prueba de glicósido:

A) Glicósidos cianogénicos:

Se coloca 2 a 3 gr de muestra en un tubo de ensayo. Se añade 4 gotas de cloroformo y en la parte superior se coloca un papel filtro (previamente empapado en una solución de picrato de sodio y después secado), sosteniéndolo con un tapón hay que evitar que el papel toque el tubo. Este se deja a 30-35°C unas 3 horas. Si el papel no cambia a rojo, la prueba es negativa.

B) Glicósidos cardíacos:

a) Reacción de Kedde:

Se observa el desarrollo del color, un color púr-

pura es indicador positivo de la presencia de un anillo lactona insaturado.

b) Prueba de Bush y Taylor, Kedde modificado.

Una coloración púrpura es indicativa de una respuesta positiva, de lactonas.

VII.- Cromatografía de glicósido:

Se puede emplear la cromatografía en papel Whatman No 1 o por cromatografía en capa delgada es sílica Gel-HF. El solvente utilizado fue: benceno-piridina-ácido fórmico 5:3:1.

VIII.- Prueba para taninos y compuestos fenólicos.

Se coloca una pequeña cantidad de muestra, en un tubo de ensayo, se agrega agua para disolver, luego algunas gotas de solución de FeCl_3 estandar.

No reacción con FeCl_3 estandar, es indicativa de no taninos y no compuestos fenólicos. Un color azul verdoso o negroverdoso, después de la adición de FeCl_3 estandar y correlacionada con precipitación de sal-gelatina, es indicativo de la presencia de taninos del tipo catecol.

Un color negro azulado después de la adición de FeCl_3 estandar y correlacionados con la precipitación de la sal gelatina, es indicativa de la presencia de taninos del tipo pirogalol.

IX.- Prueba para flavonas:

Se coloca una pequeña cantidad de muestra en un vaso de 50 ml y agregar 15 ml. de éter de petróleo. Triturar y filtrar. Repita la trituración del residuo, con volúmenes adicionales de éter de petróleo, lo necesario hasta que el último volumen del extracto de éter de petróleo sea incoloro. Combine los extractos étercos, y evapore a sequedad. Disuelva el residuo desengrasado en 30 ml. de etanol al 50% filtre y coloque 1 a 2 ml. del filtrado en cada uno de los tubos de ensayo.

a) Al tubo de ensayo No 1 agregar 0.5 ml. de HCl concentrado y calentar en baño de vapor por cerca de 5 minutos y observar los cambios de color. Desarrollo de color rojo-violeta es indicativo de la presencia de leucoantocianinas. La formación de color puede ser lenta, si el color no aparece de inmediato, deje permanecer la solución a temperatura ambiente por una hora antes de anotar el resultado como negativo.

b) Al tubo de ensayo No 2 se le agrega 0.5 ml de HCl concentrado y 3 a 4 granallas de Mg. Se observa cuidadosamente el cambio de color (a verde, rojo, etc.) dentro de 10 minutos y es indicativo de la presencia de flavanoles. Si definitivamente ocurre un color, enfríe y diluya con un volumen igual de agua y agregue un ml, de octil-alcohol. - Se agita se deja separar. El color en la capa de octil al-

cohol es debido a las agliconas, mientras que el color en la capa acuosa es debido a los glicósidos.

X.- Prueba para flavonoides:

a) La muestra se trata con un trocito de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, observándose de inmediato una coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles o xantonas. Ocasionalmente los flavonoles (incluyendo sus tres éteres y glucósidos), las flavanonas, y flavonoles - dan color verdes o azules.

b) Cuando se usa Zinc y HCl solo los flavonoles dan colores intensos.

c) Las flavonas y flavonoles se disuelven en ácido sulfúrico concentrado y originan soluciones fuertemente amarillas. Las flavanonas dan colores anaranjados o guindados. Las chalconas y auronas forman coloraciones roja guinda o rojo azuloso.

d) El cloruro férrico acuoso o etanólico forma colores con los compuestos fenólicos en general, por lo que tiene poco valor para diferenciar flavonoides. Sin embargo una coloración verde sugiere derivado del catecol; un color azul, derivado del pirogalol.

XI.- Cromatografía de flavonoides:

Se hizo cromatografía en papel bidimensional, utilizando papel Whatman No 1. Utilizando como fase móvil el alcohol terbutílico al 80% y ácido acético al 15%.

En la cromatografía de capa delgada se utiliza -- gel de sílice como absorbente y como fase móvil n-butanol-- ácido acético-agua (63:10:27). Con esta cromatografía se -- pueden obtener los siguientes resultados:

a) Observandose las manchas visibles (auronas, -- chalconas y antocianinas).

b) Examinando el papel con luz ultravioleta larga (300 nm) observandose las manchas fluorescentes (flavonoles y chalconas) o manchas oscuras.

c) Exponiendo el papel a vapores de amoníaco en -- tanto que se les examina con la luz ultravioleta (flavonas-- y glicósidos exhiben fluorescencia amarilla) las flavononas se ven amarillas y las catequinas azul claro.

d) Observando de nuevo el papel a la luz ordinaria, las antocianinas se ven azul grisáceo las flavonas amarillas, las chalconas y auronas naranja rojo.

XII.- Prueba para antraquinonas:

Se coloca una pequeña cantidad de muestra en un --

tubo de ensayo y se añaden unas gotas de agua para disolver. Ahora se agregan 10 ml de benceno, se agita para mezclar -- bien y permitir que se separen las dos fases. Se pasa la -- capa bencénica a otro tubo de ensayo, se agregan 5.0 ml de amoníaco estandar, un color rojo indica antraquinonas. Se agregan unas gotas de KOH 0.5 N a una pequeña cantidad de -- muestra sobre una placa de porcelana con cavidades, un cambio de color a rojo o púrpura indica antraquinonas.

Las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas.

Muchas p-benzoquinonas y algunas naftaquinonas -- dan coloraciones azules o violetas con amoníaco.

Las soluciones bencénicas de las 1,2-naftaquinonas son rojas y pasan a las soluciones alcalinas con un color azul violáceo.

XIII.- Prueba para limonoides:

El anillo de furano de los limonoides toma coloración naranja marrón cuando se trata la muestra con una solución al 1% de p-dimetilaminobenzaldehído y se deja en contacto varias horas con cloruro de hidrógeno o en condiciones especiales con ácido sulfúrico; da directamente colores rojos grisáceos. La multiplicidad de grupos funcionales exhibidos por limonoides, permite usar algunas reacciones ge-

nerales para cetonas y compuestos insaturados.

XIV.- Cromatografía para limonoides:

Para la cromatografía en capa delgada de limonoides y meliacinas se ha usado la gel de sílice G, y como disolvente; cloroformo-acetato de etilo (1:1). Para darle color se ha rociado las placas con p-dimetiaminobenzaldehído del 0,5% al 5% en etanol y después se han colocado varios minutos en un desecador saturado, con cloruro de hidrógeno, apareciendo manchas naranjas o marrón.

XV.- Reacción para coumarinas:

La mayoría de las coumarinas tiene fluorescencia azul cuando se les expone a la luz ultravioleta, las que -- tienen oxígeno en la posición 7 pueden exhibir fluorescencia hasta con luz visible, particularmente cuando se trata con ácido sulfúrico. Las furocoumarinas pueden tener fluorescencia verde.

Como las coumarinas son lactonas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcoholicas con aparición de una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular.

XVI.- Cromatografía de coumarinas:

Se utiliza cromatografía en papel Whatman No 1, - corriendo con ácido acético-agua (98:2). Una vez seco el-

papel se observa con luz ultravioleta.

La cromatografía en capa delgada es muy útil para determinar coumarinas y aún para aislarlas. El absorbente más usado ha sido el gel de sílice G, y los sistemas de disolventes pueden ser: Éter de petróleo-acetato de etilo --- (100:3); cloroformo-metanol (9:1); cloroformo acetato de etilo (1:1). Las manchas se localizan con luz ultravioleta. El reactivo de Ehrlich, se puede utilizar para localizar furcoumarinas, cubriendo la placa con una niebla de la solución del reactivo y después dejándola una 10 horas en una atmósfera saturada con HCl.

XVII.- Determinación de ácido cítrico:

Se toma 5.0 ml. de muestra, se coloca en un vaso de precipitado de 250 ml. se agrega con cuidado una solución al 10% de NaOH con agitación, hasta que la mezcla sea ligeramente alcalina. En este punto se produce un ligero cambio de color, la solución cambia de amarillo a cafésoso. Se cuele la solución por muselina fina para quitar trozos de pulpa, y luego se filtra en embudo buchner usando papel. Se mide el filtrado, y se coloca en un vaso, agregando 5.0 ml. y agitándolo constantemente, solución al 10% de Cl_2 -Ca por cada 10 ml. de filtrado. Calentamos a ebullición y filtramos el precipitado de citrato de Ca usando buchner. Lavamos el precipitado colectado dos veces con pequeñas can-

tidades de agua hirviendo. Resuspendemos en una mínima cantidad de agua fría, se calienta a ebullición una vez más, - colectamos el citrato de Ca insoluble por filtración. Dejamos secar y pesamos.

El ácido cítrico puede ser preparado de la sal de citrato como sigue: pesamos la sal secada al aire, colocamos en un vaso y agregamos una cantidad calculada de H_2SO_4 1.0N requerida para convertir la sal a ácido. Dejamos reposar - la mezcla por unos minutos, filtramos el SO_4Ca insoluble y - concentramos el filtrado a pequeño volumen en baño maría. - El ácido cítrico cristaliza.

Por su solubilidad en agua relativamente grande, - el ácido cítrico es difícil de recrystalizar en cantidades - pequeñas.

XVIII.- Cromatografía para ácido cítrico.

Se hizo cromatografía en papel Whatman No. 1. Se utilizaron como fase móvil las siguientes: 1-pentanol, ácido fórmico 5. 0M y n-butanol-ácido acético-agua, y utilizando como revelador nitrato de plata amoniacal. Este se prepara con volúmenes iguales de nitrato de plata 0.1 M e hidróxido de amonio 0.1 N mezclándose inmediatamente antes de usar. Estos dos sistemas son útiles para la separación en general de ácidos di y tricarboxílicos.

XIX.- Separación cromatográfica de ácido ascórbico y cuantificación.

Se tomaron 5 ml de muestra y se disolvieron en 20 ml de ácido oxálico al 0.5% hirviendo. Luego se hizo la -- precipitación de proteínas, agregando ácido tricloroacético al 10%, se filtra y luego se centrifuga. Luego se hace una oxidación con el líquido filtrado, agregando un exceso de - 2,6- diclorofenol-indofenol al 0.5%, una vez oxidado se aña de a la muestra 0.5 ml de tiourea al 10% en una mezcla alcohol-agua, y 2 ml de nitrofenilhidracina, si no se hace este paso, se rocía después con este reactivo. Calentar a baño-maría a 45°C durante dos horas. Enfriar en hielo, filtrar-lavar con agua hasta filtrado claro. El filtrado se disuelve en 10 ml de acetato de etilo hirviendo, se evapora a se-
quedad a baño maría. Recuperar el residuo con un ml. de -- acetona y aplicar en la placa 100 microlitros, aparecen manchas café rojizas.

XX.- Cromatografía en columna:

Se utilizó una columna de cromatografía para la - separación de flavonoides, la cual se montó con celite-po--
liamida con un diámetro de 1.5 cm. y con una altura de 35 -
cm.

Otros sistemas de análisis utilizados fueron el - espectrofotómetro (U.V. y I.R.) y el aparato de absorción -
atómica.

REACTIVOS:

Reactivo de Benedict.- Solución de 17.3 gr de citrato de so dio, y 10 gr de Na_2CO_3 anhidro en 60 ml de agua destilada. A la que se le añadió lentamente y agitando, 1.73 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 15 ml de agua. La mezcla se afora a 100 ml.

Reactivo de Bush y Taylor.- 1% de ácido 3,5-dinitrobenzoico en 0.5N de KOH en metanol al 50%

Reactivo de Erdman.- Se agregan 10 gotas de una mezcla de 10 gotas de HNO_3 y 100 ml de agua a 20 ml de H_2SO_4 conc.

Reactivo de FeCl_3 estándar.- Mezclar 0.3 ml. de solución - al 10% de FeCl_3 con 50 ml de ácido - acético glacial.

Reactivo de Kedde.- 2 gr. de 3,5-ácido dinitrobenzónico - en 100 ml de etanol.

Reactivo de Marquis.- Se agregan 2-3 gotas de formaldehído al 40% a 3 ml de H_2SO_4 concentrado.

Reactivo de Mayer.- Se disuelven 1.36 gr. de HgCl_2 en -- 60 ml de agua y 5 gr de KI en 10 ml-

de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 10 ml. El reactivo sólo debe añadirse a soluciones - previamente aciduladas con HCl o --- H_2SO_4 diluidos.

Reactivo de Wagner.- Se disuelven 1.27 gr de yodo (resublimado) y 2 gr de ioduro de potasio en 20 ml de agua; la solución se afora con 100 ml con agua destilada.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Antes de empezar a trabajar con los extractos, se hicieron estudios en la planta total (molida), y muchas de estas pruebas dieron negativas, pero sin embargo en los extractos se observaron resultados diferentes.

Las cromatografías fueron aplicadas solo a los extractos, lo cual fue muy útil para la identificación de sustancias y para la separación de las mismas.

Los resultados de las pruebas efectuadas en la -- planta total, antes de obtener los extractos, se muestran en la tabla No. 2

Tabla No. 2

- Prueba de alcaloides:

Reactivo Mayer	{-}
Reactivo de Marquis	{-}

- Prueba de azúcares:

de Keller {2-desoxiazúcares}	{-}
Bials {pentosas}	{+}
Benedict {hexosas}	{+}

- Aceites volátiles

{+}

- Prueba de glicósidos

cianogénéticos	{-}
----------------	-----

Cardiacos:

Reacción de Kedde	{-}
Reacción de Bush y Taylor	{-}

- Prueba de tanininos	(-)
- Prueba de flavonas	(-)
- Prueba de flavonoides	(+)
- Prueba de quinonas y antraquinonas	(-)
- Prueba de limonoides	(-)
- Prueba de coumarinas	(-)

Una vez hechas las pruebas en planta total, se --
procedió a realizar las pruebas en los diferentes extractos

Los primeros extractos con que se trabajo, fueron
los de éter de petróleo y etílico. Por su consistencia se-
observó que su composición era en un alto porcentaje, de --
grasas. Pero sin embargo se hicieron pruebas para otras --
sustancias, y dieron positivas, como fue en el caso de fla-
vonoides.

Se hizo una cromatografía bidimensional para fla-
vonoides, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Extracto	Rf en TBA	Rf en ácido acético
éter de petróleo	0.90	0.60
éter etílico	0.86	0.63

Solo se obtuvo una sola mancha, la cual presentó-
fluorescencia azul con la lámpara de luz U.V.

Se recortaron las manchas y disolvieron en agua, para probar posteriormente su acción como coagulante, tanto en sangre como en leche, pero no tuvo acción.

Se montó entonces una columna cromatográfica, para la extracción de los flavonoides, en esta extracción el solvente que se utilizó fue el metanol, debido a la alta solubilidad de los flavonoides en él, el solvente fue utilizado poniendo primero en porcentajes bajos hasta terminar en un 100 % de metanol.

Las porciones que se fueron recogiendo fueron analizadas, tomando los espectros correspondientes en el espectrofotómetro de luz U.V. esto se hizo con el fin de ver cuáles porciones eran iguales y así poderlas juntar, una vez hecho esto se concentraron las muestras recolectadas y se probaron en sangre y leche., los resultados obtenidos fueron negativos.

De estos extractos se hicieron pruebas colorimétricas para glicósidos las cuales dieron positivas, entonces se corrió una cromatografía de capa fina en sílica gel con fluorescencia, la muestra se corrió junto con estándares de las cuales se sospechaba que estaban presentes. Los compuestos encontrados fueron:

Hesperidina con Rf de 0.09 presentando fluorescencia amarillo pálido.

Flavona con un Rf de 0.94 y una fluorescencia - azul transparente.

Se rasparon las manchas, se disolvieron en agua - se centrifugo la silica gel y se probó el sobrenadante en sangre y leche, pero no dió resultado positivo.

Para probar en sangre y leche cada uno de los extractos, se tomo una porción de cada uno de ellos ya secos - y se disolvieron en agua, con el fin de evitar la actividad que pudiera presentar el solvente.

De los cinco extractos el único que presentó actividad coagulante fue el tetrahidrofurano, por lo cual nuestro estudio fué enfocado desde este momento especialmente a dicho extracto.

Este extracto se probó nuevamente en sangre, tomando sangre de una persona normal, e inmediatamente se puso en contacto con el extracto, y se observó la formación del coágulo, poco antes de que se formara en el patrón que se tenía (el cual era sangre del mismo paciente).

Como no es muy palpable la iniciación de la formación del coágulo, se probó entonces en plasma, y a ésta -

se le agregó una gota de una solución diluida de cloruro de Ca, una parte se probó con el extracto de tetrahidrofurano, y otra se dejó como patrón, la que tenía el extracto si presentó coagulación, y sin embargo en el patrón no hubo coagulación.

Se hizo la prueba también igual, pero sin agregar el cloruro de calcio y también se vio la formación del coágulo.

Y por último se hizo pruebas con leche, las cuales presentaban coagulación inmediata.

Se inició el estudio de este extracto con una cromatografía bidimensional para flavonoides (se hizo por triplicado). Se obtuvieron tres manchas con fluorescencia - azul. Se recortaron las manchas de la tres cartulinas para tener una mayor concentración y se disolvieron en agua juntando las que eran iguales, ya disueltas se concentraron hasta volúmenes de aproximadamente de 1 ml., y se hicieron las pruebas de coagulación, pero no dieron positivas.

Se hizo cromatografía de capa fina para los glicósidos, junto con los estándares probados anteriormente en los extractos de éter. El extracto no presentó ninguno de los estándares probados, pero sin embargo presentó otras -- manchas, las cuales se recogieron y se probaron con sangre-

y leche, pero no se observó el efecto deseado.

Es probable que las cantidades obtenidas en esta prueba sean muy pequeñas como para presentar efecto coagulante, por esta razón se procedió a hacer una precipitación de flavonoides, con una porción un poco más grande del extracto, con el fin de obtener una cantidad apreciable. Estos se precipitaron con una solución de acetato de plomo al 5%, se lavó el precipitado varias veces y se probó nuevamente, pero no hubo efecto.

Se hizo determinación de Ca en el aparato de absorción atómica, ya que el Ca interviene en procesos de coagulación, se quiso saber si la cantidad en el extracto era significativo, como para que se tomase en cuenta.

La cantidad obtenida fue de 0.000928 mg/ml, lo cual es demasiado poco, tomando en cuenta que se esta relacionando con un ml. de un extracto bastante concentrado.

Se hicieron pruebas sobre la citrina denominada vitamina P, la cual está constituida por falvononas, hesperidina y eriodictina. Se hicieron primero pruebas colorimétricas, pero ninguna dió positiva para flavanonas, se hicieron en seguida cromatografía de capa fina, corriendo junto con los estándares adecuados pero tampoco se obtuvieron resultados positivos.

Se prosiguió con la prueba para alcaloides, se hicieron primero las colorimétricas, las cuales dieron positivas, en seguida se hizo una precipitación de los mismos, se lavaron los cristales y se hicieron las pruebas de coagulación, sin ningún resultado positivo.

Se hizo pruebas para coumarinas, acompañada de -- una cromatografía en papel, pero en ninguna de las dos hubo señal de la existencia de estos compuestos. Lo mismo -- ocurrió al hacer pruebas para quinonas.

Las lactonas fueron investigadas junto con los limonoides (los cuales son lactonas), estas dieron negativas -- las pruebas de identificación. Como está comprobado que el limón contiene limonoides en la corteza, se hizo la prueba -- en los demás extractos para la confirmación de que no hubiese -- se algún error de la técnica, y efectivamente se confirmó -- la presencia de los limonoides en el extracto de metanol.

Se midió el PH del extracto de tetrahidrofurano -- ya disuelto en agua y esta fue aproximadamente de 4. Entonces se hizo una neutralización con agua y NaOH, y se probó -- el extracto ya neutralizado y se vio que así ya no tenía -- efecto en la sangre; por lo que se procedió a la investigación del contenido de ácidos.

Se hizo un análisis cuantitativo para ácido ascórbico y ácido cítrico, siguiendo las técnicas ya mencionadas

anteriormente.

Para el ácido ascórbico se hizo una lectura a 525 mm para luz U.V. usando un estándar. La cantidad encontrada de este ácido fue de 1.76% y de ácido cítrico se obtuvo un porcentaje de 1%. Estos resultados son relativos, ya -- que se debe de considerar que están en relación a un extracto y no a toda la planta.

Se hicieron pruebas de coagulación con ácido cítrico y ácido ascórbico por separado y se vio que sí tenían efecto coagulante sobre la sangre y leche.

Se hicieron pruebas con diferentes concentraciones, hasta obtener un PH de 7, y se vio que conforme se hacían pruebas con las diluciones más cercanas a un PH de 7-- este efecto de coagulación iba disminuyendo.

En la tabla No. 3 se muestra un resumen de las -- sustancias más importantes, encontradas en el extracto de tetrahydrofurano y en los demás extractos. Un signo (+) indica la presencia de la sustancia a que se está refiriendo y un signo (-) indica que no se encuentra presente. En caso de que no se presente ninguno de los dos signos, significa que no se realizó la prueba en ese extracto.

sustancia	extracto	extracto	extracto	extracto	extracto
investigada	eter petr.	éter etil.	THF	metanol	agua
alcaloides	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
flavonoides	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
azúcares	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
limonoides			(-)	(+)	
coumarinas			(-)	(-)	
quinonas			(-)	(-)	
Ca			(+)		
ac. cítrico			(+)		
ac. ascórbico			(+)		

Tabla No. 3.

Resumen de las pruebas realizadas
en los extractos

ESTA
TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

C A P Í T U L O I V

CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

DISCUSIONES.

En el extracto de éter de petróleo y etílico, se encontraron señales de citrina (vitamina P), la cual es -- una mezcla de flavanonas; hesperidina y eriodictina, esta sustancia posee un efecto benéfico en el mantenimiento de -- las condiciones normales en los capilares sanguíneos, regulan do la permeabilidad, sin embargo existen grandes dudas sobre la potencia de la citrina sola.

Sin embargo en el extracto de tetrahidrofurano, -- que es el que dió resultados positivos de coagulación, no se encontró esta sustancia.

Se analizó la cantidad de calcio contenida en el extracto de tetrahidrofurano, pero esta fue demasiado baja, -- como para poder ser tomada en cuenta. Esta sustancia se ana lizó ya que sabemos que es uno de los factores que intervie nen en el proceso de coagulación.

Todas las demás sustancias analizadas, son las que se encuentran con mayor frecuencia en las plantas. Pero sin embargo ninguna de estas presentó acción como coagulante.

En el extracto de agua se encontró una gran canti dad de pectina lo cual es lógico debido a que el fruto reco lectado estaba en la etapa en que esta sustancia es más abun dante.

CONCLUSIONES

Con este trabajo nos damos cuenta que la sustancia responsable de la acción coagulante, es el ácido ascórbico - y esta acción se sinergiza debido a la presencia del ácido cítrico.

Antes de llegar a esta conclusión de que dicha acción fuera debida a la acidez proporcionada por dichos ácidos, se estuvo buscando alguna otra sustancia que pudiera tener esta acción; se tomó muy en cuenta la citrina (vitamina-P) la cual se sabe, que se encuentra en el jugo de limón y se sabe de sus acciones en el mantenimiento de las condiciones normales de los capilares sanguíneos. Pero como ya se dijo anteriormente esta no se encontró en nuestro extracto de tetrahidrofurano.

En resumen, podemos decir que la acidez, trae consigo la desnaturalización de las proteínas, lo cual produce la coagulación de cualquier líquido que las contenga.

BIBLIOGRAFIA

Sánchez Leonardo E.

Aprovechamiento de las corte
zas del limón para la extrac
ción de aceites.

Tesis 1930

Shirasago Roberto Alonso.
Estudio del limón mexicano.

Tesis 1947

Braverman J. B. S.

Los agríos y sus derivados

Ed. Paz Montalvo 1949

Braverman J. B. S.

Citrus Products.

1949

Martínez Máximo

Plantas útiles de Mex 1959

Ed. Botas Mex 1959

Rodal E. H.

Chem of carbon compounds

Publicación El Ever 1959

Domínguez Xorge A.

Métodos de Investigación
fitoquímica.

Limusa 1979

Enciclopedia de la tecn
ología química.

Tomo 4

UTEHA

KIRK-OTHEMER

Primera edición en espa-
ñol.

Martínez Máximo.

Las plantas medicinales
de Mex.

Ed. Botas Mex 1959

Venkataraman K progress

en Chem orga. Natural.

Products vol 17 (1959)

Rolf Stroecker

Heinz M. Henning

Análisis de vitaminas

Ed. Paz Montalvo 1967