



79  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"CONTRIBUCION AL ANALISIS DE EXTRACTOS  
DE UNA MADERA TROPICAL TOXICA"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**GUSTAVO LOPEZ PREZA**

**TELIS CON  
FALLA LE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1991**



## **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. INTRODUCCION .....	1
II. PARTE TEORICA .....	4
III. PARTE EXPERIMENTAL .....	32
IV. DISCUSION Y RESULTADOS .....	53
V. CONCLUSIONES .....	59
VI. BIBLIOGRAFIA .....	62

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

---

El Enterolobium cyclocarpum (Jacq) griseb es un árbol de la familia de las leguminosas, conocido con los nombres vulgares de Huanacastle, Cuanacastle, Pich (en Yucatán), Pichi o Guapote (en Tabasco), Parota, Juanacosta (nombre comercial).

Es un árbol de 15 a 30 metros de altura, de corteza áspera, con amplio follaje. Crece en las regiones calientes y se desarrolla con mucho vigor dando excelente sombra.

Se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo<sup>(1)</sup>.

Haciendo un corte transversal del tronco de este árbol, podemos observar que la parte externa de la madera es de color blanco o amarillento, mientras que el centro del tronco es de color marrón, algunas veces con tinte rojizo, siendo muy apreciado por los fabricantes de muebles finos; también se usa para hacer canoas por ser resistentes al agua. Se dice que no la ataca el comejen, arde con dificultad y despidе un olor irritante al aserrarla; cuando el aserrín y los restos de madera son arrojados al agua matan a los peces.

El tronco exuda una goma que se usa en algunas otras regiones contra la bonquitis y en algunos otros lugares se prepara un jarabe con la corteza, para el tratamiento de resfriados<sup>(2)</sup>.

Los operarios que trabajan en carpinterías en la fabricación de muebles con la madera de Parota, presentan una serie de disturbios fisiológicos tales como hemorragias nasales e inflamación del sistema respiratorio al ponerse en contacto con el aserrín de esta madera e incluso se han reportado muertes por tales intoxicaciones.

El objeto del presente trabajo es el de corroborar y continuar la investigación, que previamente se realizó en varias tesis de licenciatura y maestría, sobre la actividad tanto tóxica como anticoagulante de los extractos de la madera de Parota, obtenidos con diferentes solventes orgánicos. Además de la implementación de una técnica para evaluar la actividad anticoagulante, de dichos extractos; técnica que debe ser más accesible al laboratorio químico dedicado a los métodos analíticos de extracción, separación y purificación de principios activos de productos naturales.

## CAPITULO I I

### PARTE TEORICA

Hasta hoy el estudio de la madera de Parota (Enterolobium cyclocarpum) ha sido objeto de numerosos estudios, tanto químicos como farmacológicos, todos encaminados a la obtención de productos naturales puros con actividad anticoagulante. Los diversos trabajos (tesis de licenciatura y maestría) se han ayudado y complementado para llegar a la obtención de compuestos puros y probar su actividad anticoagulante.

A continuación se esbozan y resumen dichos trabajos tratando de evidenciar la forma sistemática del estudio de la madera tanto en su parte blanca como en la oscura.

#### A ESTUDIO QUIMICO

El estudio químico de la madera del Enterolobium cyclocarpum en sus dos partes (blanca y oscura), se llevó a cabo mediante la obtención de extractos con diferentes solventes, aprovechando la diversa polaridad de la gran variedad de compuestos encontrados en la madera.

Los diversos trabajos realizados se basaron en un diagrama básico de extracción (ver diagrama 1). A partir de los diversos extractos obtenidos se derivaron otros diagramas de extracción y purificación para la obtención de compuestos puros y fracciones semipurificadas.

Los compuestos puros fueron objeto de un estudio más



detallado determinando su punto de fusión y elucidación de su estructura; esto último mediante la obtención de sus espectros de infrarojo, resonancia magnética nuclear y de masas.

Es importante señalar que en todos los estudios químicos de los diversos extractos obtenidos, se utilizaron los métodos de cromatografía tanto en placa fina, placa fina preparativa, en columna y/o de gases; tanto para control de extracción, como método de separación y purificación siendo utilizado en cada caso:

- Cromatografía en capa fina: placas de vidrio recubiertas de Gel de Silice 60-F-254 Merck.
- Cromatografía en capa fina preparativa: placas de vidrio recubiertas de Gel de Silice 60-F-254 Merck y Kieselgur Merck.
- Cromatografía en columna: columnas de vidrio con Gel de Silice 60 Merck (0.063-0.2 mm) y proporción de muestra con respecto al Gel de 1:100.

La separación de la madera blanca de la oscura se realizó manualmente.

#### A.1) ESTUDIO DE LOS EXTRACTOS HEXANICOS.

##### A.1.1) Extracto hexánico de la madera oscura.

La madera en forma de aserrín se calentó a reflujo con hexano, se filtró en caliente enfriándose posteriormente en

hielo con el fin de ayudar a precipitar el material ceroso. El precipitado obtenido era un sólido ligero de color blanquizco. El extracto hexánico se concentró en rotavapor obteniéndose un sólido de color amarillo<sup>(3)</sup>.

a) El extracto hexánico sin ceras se sometió a una cromatografía en columna utilizando benceno como eluyente, posteriormente se empleó cloroformo y por último acetato de etilo.

De las fracciones de cloroformo y de las de acetato de etilo se obtuvo un compuesto "H" que se cristalizó de hexano-acetona (3:1). Se determinó punto de fusión (164-166°C), su espectro de IR y RMN. Su espectro de masas se corrió en combinación con cromatografía de gases, determinando su estructura (ver figura 1)<sup>(3)</sup>.

De las fracciones de benceno se obtuvo un compuesto "27" que se purificó por cristalización en acetona P.f. +73-74°C. Se corrió su espectro de IR y RMN. Se le hizo una cromatografía de gas-líquido dando como resultado 3 componentes principales. En vista de este resultado se introdujo este compuesto 27 a la combinación de cromatografía de gases-espectrometría de masas, detectándose 4 compuestos, de los cuales se determinaron sus estructuras a 2 de ellos, (ver figuras 2 y 3)<sup>(3)</sup>.

Este mismo extracto se sometió a una saponificación

con potasa alcohólica con la obtención de ácidos grasos libres los cuales se esterificaron con metanol y ácido sulfúrico y se purificaron en cromatografía en columna. Su identificación se realizó por cromatografía gas-líquido, comparando sus tiempos de retención con los obtenidos con estándares conocidos. Así se identificaron los ácidos grasos que se muestran en la tabla # 1<sup>(4)</sup>.

b) Las ceras obtenidas por enfriamiento y filtración del extracto hexánico se sometieron a una precipitación fraccionada con acetona caliente, seguida de una cromatografía en capa fina preparativa con benceno-cloroformo (7:3) como eluyente. La estructura de estas ceras se determinó mediante la obtención de sus espectros de infrarojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Así se identificaron tres ceras (ver figuras 4, 5 y 6)<sup>(3)</sup>.

#### A.1.2) Extracto hexánico de madera blanca.

Similarmente a la madera oscura se utilizó un lote de aserrín de madera blanca y se extrajo exhaustivamente con hexano. La solución se filtró en caliente, posteriormente se enfrió en baño de hielo obteniéndose un precipitado correspondiente a las ceras. La solución hexánica filtrada se concentró en rotavapor obteniéndose las gra-

sas, (ver diagrama 2).

a) La parte cerosa se sometió a cromatografía en columna con hexano-cloroformo (3:7) como eluyente (6).

De esta columna se realizó, a la fracción IV, cromatografía en capa fina preparativa con acetato de etilo-cloroformo (1:9) como eluyente, obteniéndose dos compuestos,  $C_1b_2$  de punto de fusión 71-72°C y el compuesto  $C_1b_4$ .

La fracción XI se sometió a una cromatografía en columna con hexano-acetato de etilo (7:3) como eluyente, obteniéndose el compuesto  $C_2$ , que se purificó por cromatografía en capa fina preparativa y se cristalizó de acetato de etilo. Se determinó su punto de fusión de 157-158°C.

El compuesto  $C_1b_2$  se estudió espectroscópicamente (espectros de infrarojo, resonancia magnética nuclear y masas) y se propuso la siguiente estructura (ver figura 7).

El compuesto  $C_1b_4$  no cristalizó y sólo se corrió el espectro de infrarojo.

Del compuesto  $C_2$  se obtuvo su espectro de infrarojo y se corrió cromatografía de gases-espectrometría de masas, no pudiéndose determinar su peso molecular exacto debido a las impurezas. Se propuso la siguiente estructura (ver figura 8) (6).

En otro trabajo al material ceroso se le realizaron precipitaciones seriadas en acetona caliente, obteniéndose

5 fracciones. De la fracción número 1 se le realizó una cromatografía en columna y utilizando como eluyentes benceno-hexano (80:20) primeramente, luego benceno y por último cloroformo.

Obteniéndose de las fracciones en benceno una sola mancha, la cual se cristalizó y se realizaron espectros de infrarojo, resonancia magnética nuclear y masas, elucidándose la siguiente estructura (ver figura 9)<sup>(7)</sup>.

b) Al extracto hexánico sin ceras se le sometió a una saponificación con potasa alcohólica. La fracción básica se neutralizó hasta pH ácido para la obtención de los ácidos grasos libres.

Subsecuentemente se metilaron estos ácidos grasos con metanol y ácido sulfúrico. Estos ésteres metílicos se purificaron en cromatografía en columna con cloroformo-acetato de etilo (50:50).

Los ésteres metílicos puros obtenidos se purificaron por cromatografía gas-líquido comparando sus tiempos de retención con estándares. Así se identificaron los ácidos grasos de la tabla 2<sup>(7)</sup>.

## A.2) ESTUDIO DE LOS EXTRACTOS METANOLICOS.

### A.2.1 Extracto metanólico de la madera oscura.

La madera una vez desprovista de las grasas y ceras se extrajo con metanol exhaustivamente calentándose a reflujo, se concentraron los extractos en rotavapor (ver diagrama 3).

El extracto metanólico seco se disolvió en metanol y se le adicionó acetato de etilo en exceso con lo que se precipitaron las saponinas crudas. Estas se purificaron y se hidrolizaron con ácido clorhídrico al 15% en etanol al 95%. Las sapogeninas así obtenidas se precipitaron con agua destilada y se filtraron; el residuo se lavó con agua destilada hasta pH neutro.

El filtrado de color amarillo, donde se encuentran los azúcares provenientes de la hidrólisis, junto con otro tipo de sustancias se extrajeron con cloroformo, se secó y se concentró, obteniéndose un producto oleoso amarillo y olor agradable. La parte acuosa ácida se neutralizó a pH 7, se purificó y se concentró a baño maría obteniéndose una sustancia amarillo claro y olor agradable donde se encuentran los azúcares (3).

A estos azúcares se les realizó cromatografía en capa fina con los siguientes eluyentes:

acetato de etilo-isopropanol-agua (26+14+7)

butanol-ácido acético-agua (4+1+1)

utilizando patrones conocidos y como reveladores, Beta-naftoresorcinol y anisaldehído-ácido sulfúrico, así como también reactivo de Lemievx, con los que se desarrollan colores característicos para cada uno de los azúcares. De esta manera se identificaron:

Glucosa, ramnosa, fructosa, xilosa y arabinosa.

Otra parte de los azúcares provenientes de la hidrólisis se identificaron por cromatografía de gases mediante la formación de derivados sililados. De esta forma se logró identificar además de los azúcares ya mencionados: (3)

Sorbosa.

Del filtrado proveniente de la precipitación de las saponinas (ver diagrama 3), se concentró a sequedad, resultando un sólido blanco y de sabor dulce denominado compues to "R" el cual se purificó y se cristalizó de acetona, obteniéndose su punto de fusión de 185°C. Se le realizaron espectros de infrarojo, resonancia magnética nuclear y masas, elucidándose la estructura de la figura 10 (3).

#### A.2.2) Extracto metanólico de madera blanca.

La madera desprovista de grasas y ceras se extrajo exhaustivamente con metanol calentándose a reflujo (ver dia-

grama 2) y se concentró el filtrado en rotavapor<sup>(6)</sup>.

Se le realizó una cromatografía en columna usando como eluyente benceno-acetato de etilo (8:2), luego se cambió a cloroformo-metanol (1:1) y posteriormente metanol (ver diagrama 4) de la cual se estudiaron varias fracciones:

De la fracción III se montó una pequeña columna cromatográfica con acetato de etilo-benceno (2:8) como eluyentes, de la cual se obtuvieron 3 fracciones. De la fracción III<sub>1</sub>, se obtuvieron los compuestos III<sub>1A</sub> y III<sub>1C</sub>.

Del compuesto III<sub>1C</sub> se obtuvieron espectros de infrarrojo, y cromatografía de gases-espectrometría de masas, encontrándose un punto de fusión de 117-118°C. Este compuesto resultó ser un isómero del compuesto C<sub>2</sub> aislado del extracto hexánico y cuya estructura ya se ha elucidado.

Del compuesto III<sub>1A</sub> se obtuvo su espectro de infrarrojo concluyéndose que debe ser un éster alifático.

De la fracción XIX, soluble en metanol, en base a estudios de precipitación con diferentes disolventes, se aislaron cristales blancos de un compuesto F<sub>1</sub> cuyo punto de fusión osciló entre 165-166°C. Los espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y masas mostraron impurezas por lo que no se elucidó su estructura.

La fracción XX, soluble en agua, se sometió a pruebas de solubilidad en diferentes disolventes, tanto en frío como en caliente, de esta manera se obtuvieron: un com-



puesto ER<sub>1</sub> al cual se obtuvo su espectro de infrarojo, y un compuesto puro al cual ya no se realizó estudio espectroscópico<sup>(6)</sup>.

### A.3) ESTUDIO DEL EXTRACTO ETÉREO DE LA MADERA OSCURA.

El extracto metanólico sin saponinas se disolvió en metanol y se le adicionó agua destilada en exceso, precipitando las sustancias insolubles en ella, ayudando a purificar. Se filtró y el filtrado acuoso color vino tinto, donde se encuentran la mayor parte de los principios polares, se extrajo primeramente con cloroformo; estos extractos se concentraron y se secaron, obteniéndose el extracto clorofórmico (ver diagrama 1).

Posteriormente la parte acuosa se extrajo con éter etílico, los extractos se reunieron, se concentraron y se secaron obteniéndose el extracto etéreo de color marrón intenso.

El extracto etéreo se sometió a una cromatografía en columna con cloroformo-benceno-acetona (3:1:3) como eluyente.

Del estudio de las fracciones se pudo obtener un compuesto amarillo cristalino al que se hizo su espectro de resonancia magnética nuclear y se le sometió a la combinación de cromatografía de gas-espectrometría de masas, proponiéndose la estructura de peso molecular de 306 de la

figura 11.

De este extracto se han aislado también 2 ácidos, pero sólo se tiene su espectro de infrarojo <sup>(3)</sup>.

#### A.4) ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE MADERA OBSCURA.

El extracto de acetato de etilo obtenido de acuerdo al diagrama de extracción base (ver diagrama 1), se sometió a una cromatografía en columna con cloroformo-acetona-metanol (65:15:20) como eluyente, cambiando luego a acetato de etilo y finalmente a metanol (ver diagrama 5). Las fracciones se agruparon según el resultado de la cromatografía en capa fina que se les realizó como control de la recolección <sup>(5)</sup>.

A la fracción IV se le realizó cromatografía de gases, mostrando una mezcla compleja de compuestos. Además se le realizó cromatografía en capa fina preparativa con cloroformo-metanol (70:30) eluyente, obteniéndose 6 fracciones. Las cuales se extrajeron con metanol en frío y en caliente.

En la fracción "fpp-1cal" se obtuvo una sólo mancha, sugiriendo un compuesto puro, el cual, por la pequeña cantidad de muestra, sólo se le realizaron pruebas farmacológicas de anticoagulante <sup>(5)</sup>.

## B ESTUDIO FARMACOLOGICO

El estudio farmacológico de la madera de Enterolobium cyclocarpum se llevó a cabo fundamentalmente probando su actividad anticoagulante, tanto de la madera oscura como de la blanca, tanto en extractos crudos, fracciones semipurificadas como en compuesto puro.

Al extracto metanólico total de la madera oscura se le realizó un estudio de toxicidad así como la determinación de a DL<sub>50</sub> <sup>(3)</sup>.

A las saponinas de esta misma madera se les realizaron prueba de actividad antimicrobiana <sup>(3)</sup>.

### B.1) PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE.

Los diferentes extractos crudos y fracciones semipurificadas de la madera oscura y de la blanca, así como el compuesto puro de la primera, fueron probados determinando el tiempo de coagulación en muestras de sangre de donadores sanos <sup>(3,5)</sup>.

Así se determinaron la actividad anticoagulante de los siguientes extractos de madera blanca y oscura y de fracciones semipurificadas y el compuesto puro de la madera oscura: ver tabla 3.

B.2) ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL EXTRACTO METANOLICO TOTAL  
DE LA MADERA OSCURA.

Dió los siguientes resultados<sup>(3)</sup>:

No se encuentran hemorragias internas.

Intestino, bazo, riñón y coagulación normal.

Pulmón algo neumónico a nivel de lóbulo apical (grande),  
se observa una hematopoyesis extramedular, principalmente  
a nivel del brazo, también en hígado y riñón.

B.3) DETERMINACION DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO TOTAL DE  
LA MADERA OSCURA.

La  $DL_{50}$  del extracto se determinó de acuerdo a la ta-  
bla 4<sup>(1)</sup>.

Se tomaron 9 ratones por grupo y se les administró el  
extracto por vía intraperitoneal, luego se sometieron a  
observación durante 24 horas. El resultado fue de:  
55.5 mg/Kg (ver diagrama 6).

B.4) DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La muestra de saponinas de madera oscura se disolvió  
en agua estéril a una concentración de 15 mg/ml. La efec-  
tividad antimicrobiana fue probada contra las siguientes  
cepas de microorganismos:

- Klebsiella pneumoniae
- Pseudomona sp
- Salmonella enteritidis
- Bacillos anthracis
- Proteus sp
- Shigella equi
- Staphylococcus aureus
- Staphylococcus albus
- Escherichia coli
- Salmonella typhi

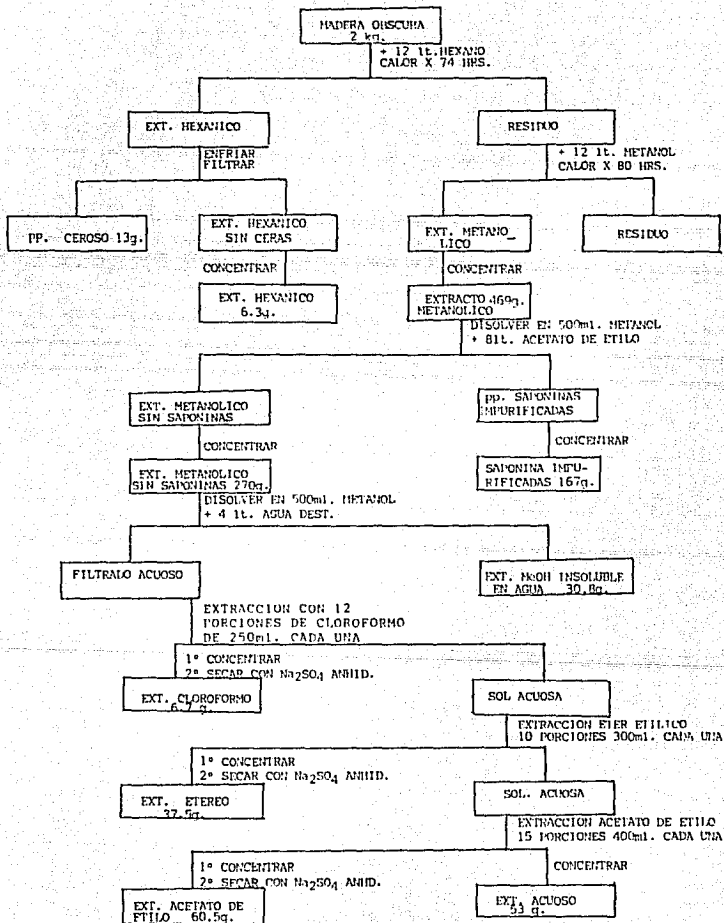
Las pruebas de efectividad se hicieron por tres métodos diferentes:

- Método cilindro-placa.
- Método turbidimétrico.
- Método de efectividad, utilizado y estandarizado por la Organización Mundial de la Salud - OMS/OPS, para Brucellas.

El resultado fue negativo para todas las cepas empleadas y en los tres métodos<sup>(3)</sup>.

Todos los estudios anteriores se realizaron en Colombia en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Bogotá, por el Dr.

Jorge Olarte.



"DIAGRAMA 1"

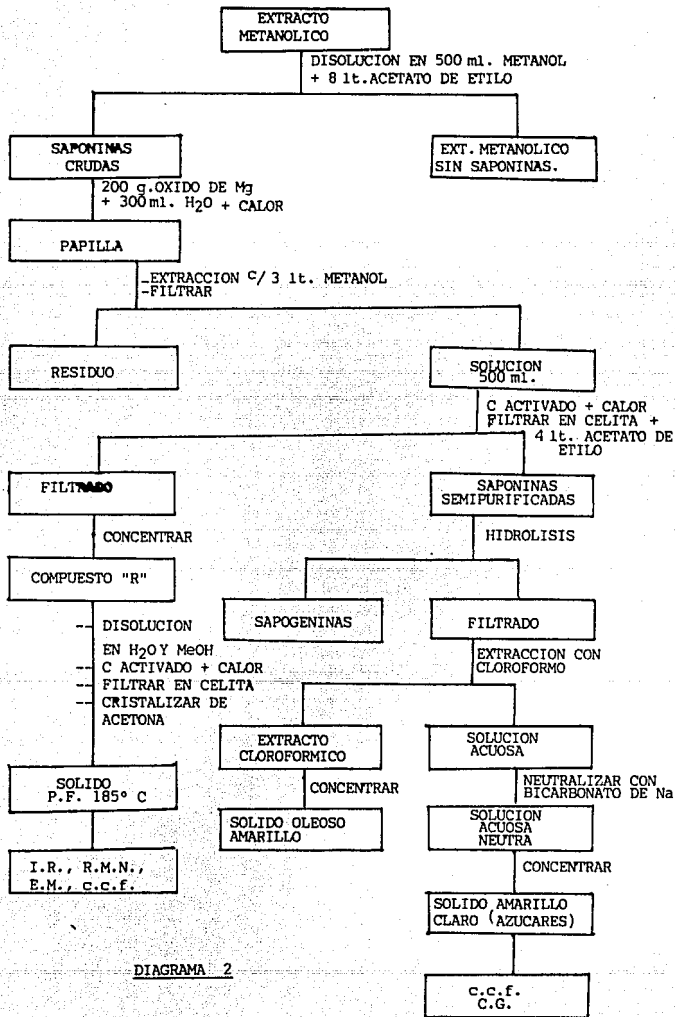


DIAGRAMA 2

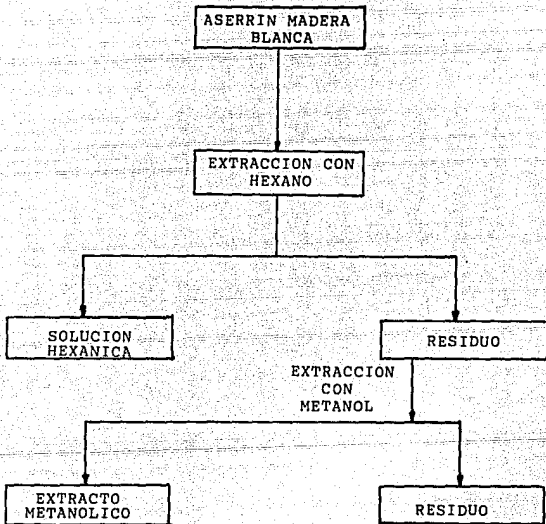


DIAGRAMA 3



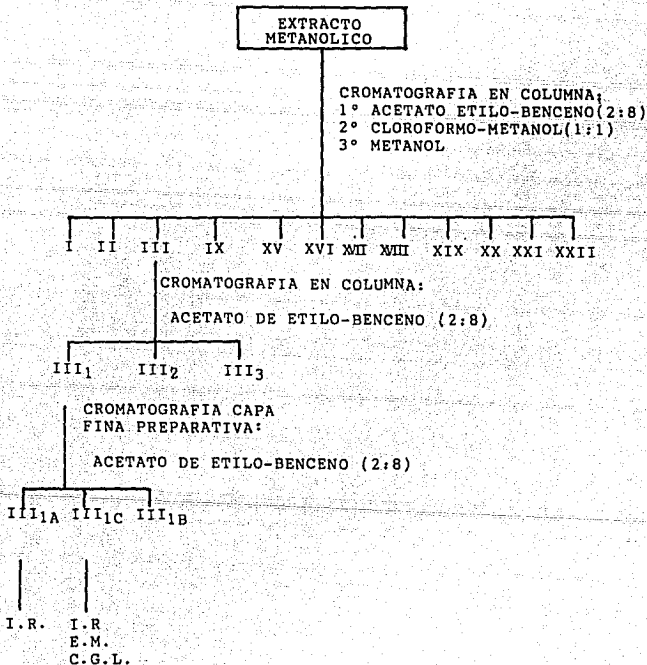
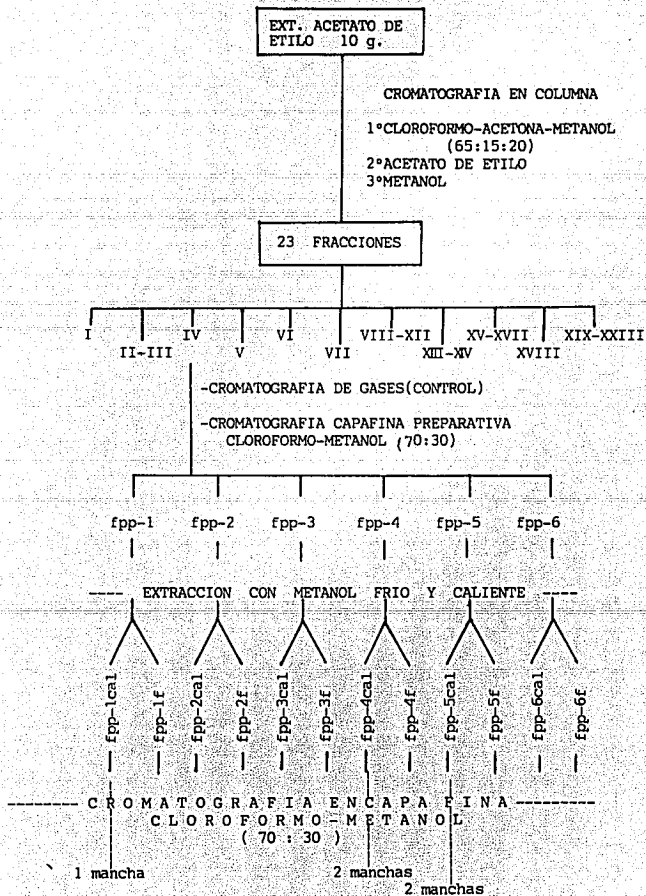


DIAGRAMA 4



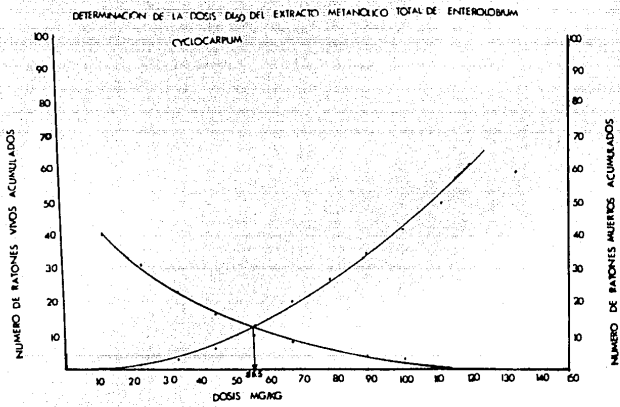


DIAGRAMA 6

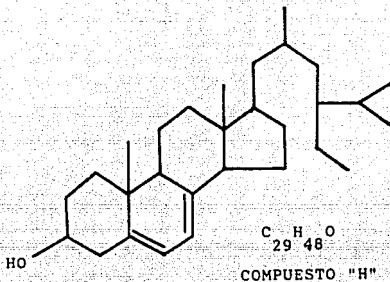


FIGURA 1

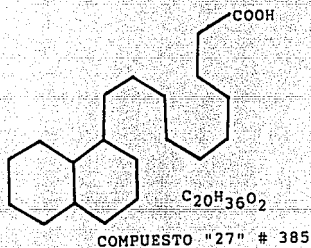


FIGURA 2

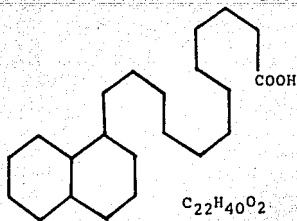
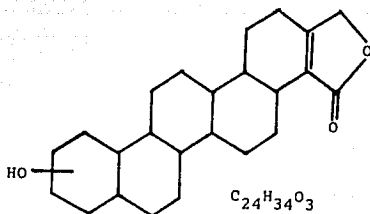
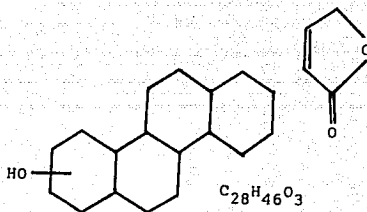


FIGURA 3



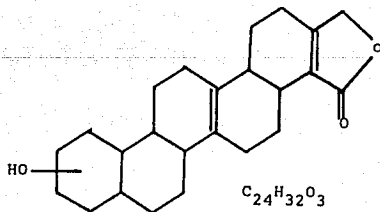
COMPUESTO C<sub>1</sub>

FIGURA 4



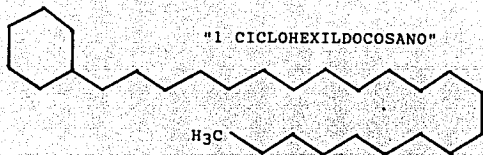
COMPUESTO C<sub>3</sub>

FIGURA 5



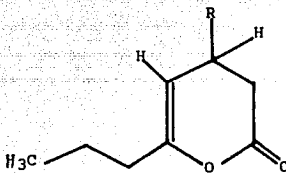
COMPUESTO C<sub>4</sub>

FIGURA 6



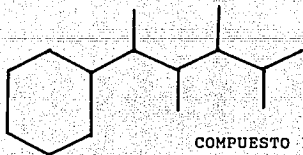
COMPUESTO C<sub>1</sub>b<sub>2</sub>

FIGURA 7



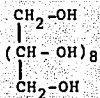
COMPUESTO C<sub>2</sub>

FIGURA 8



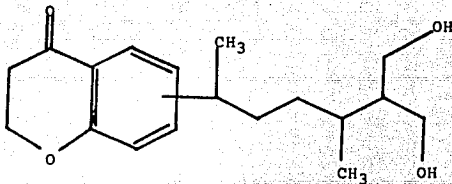
COMPUESTO PM 210

FIGURA 9



COMPUESTO "R"

FIGURA 10



COMPUESTO "F"

FIGURA 11

"COMPOSICION GRASA MADERA OSCURA"

PICO	ACIDO IDENTIFICADO	ATOMOS DE C	%
8	ACIDO CAPRICO	C <sub>10</sub>	11.853
9	ACIDO LAURICO	C <sub>12</sub>	3.767
11	ACIDO MIRISTICO	C <sub>14</sub>	1.125
14	ACIDO PALMITICO	C <sub>16</sub>	7.166
18	ACIDO ESTEARICO	C <sub>18</sub>	19.586
19	ACIDO OLEICO	C <sub>18:1</sub>	1.882
20	ACIDO LINOLEICO	C <sub>18:2</sub>	2.895

TABLA 1

"COMPOSICION GRASA MADERA BLANCA"

PICO	ACIDO IDENTIFICADO	ATOMOS DE C	%
7	ACIDO CAPRICO	C <sub>10</sub>	0.272
10	ACIDO MIRISTICO	C <sub>14</sub>	0.248
13	ACIDO PALMITICO	C <sub>16</sub>	8.888
15	ACIDO ESTEARICO	C <sub>18</sub>	7.065
16	ACIDO OLEICO	C <sub>18:1</sub>	2.058
17	ACIDO ARAQUIRICO	C <sub>20</sub>	5.995

TABLA 2



"ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE EXTRACTOS DE LA MADERA DE PAROTA"

	M U E S T R A	ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE
M A D E R A O B S C U R A	EXTRACTO METANOLICO TOTAL	POSITIVA
	EXTRACTO METANOLICO SIN SAPONINAS.	POSITIVA
	EXTRACTO CLOROFORMICO	NEGATIVA
	EXTRACTO ETereo	POSITIVA
	EXTRACTO ACETATO DE ETILO	POSITIVA
	EXTRACTO ACUOSO	POSITIVA
	FRACCION "fpp-1ca1" (EXTRACTO ACETATO DE ETILO) COMPUESTO PURO.	POSITIVA
	FRACCION "fpp-4ca1" Y "fpp-5ca1"(EXT. ACETATO DE ETILO)	POSITIVA
MADERA BLANCA	EXTRACTO HEXANICO	NEGATIVA
	EXTRACTO ACETATO DE ETILO	NEGATIVA
	EXTRACTO METANOLICO	NEGATIVA

TABLA 3

"DETERMINACION DE LA TOXICIDAD DEL  
EXTRACTO METANOLICO TOTAL"

GRUPO No. (9 RATONES X GRUPO)	DOSIS mg/kg	No. MUERTOS	No. VIVOS	VIVOS ACUMULADOS	MUERTOS ACUMULADOS
1	134.4	9	0	0	59
2	112.0	8	1	1	50
3	100.8	7	2	3	42
4	89.6	8	1	4	35
5	78.4	7	2	6	27
6	67.2	7	2	8	20
7	56.0	7	2	10	13
8	44.8	3	6	16	6
9	33.6	2	7	23	3
10	22.4	1	8	31	1
11	11.2	0	9	40	0

TABLA - 4

## CAPITULO I I I

### PARTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se implementaron varios métodos de evaluación de actividad anticoagulante<sup>(8,9)</sup> para seleccionar el más adecuado al laboratorio químico dedicado a los métodos analíticos de extracción, separación y purificación de principios activos de productos naturales, además de continuar el estudio tóxico de la madera oscura.

#### A. DETERMINACION DE TIEMPO DE COAGULACION.

En primer lugar se probaron varios extractos de madera oscura, fracciones semipurificadas de madera oscura (trabajo de tesis de maestría<sup>(5)</sup>), ceras de madera blanca (trabajo de tesis de licenciatura en elaboración<sup>(7)</sup>), así como extractos de trampas de los aparatos de extracción y disolventes puros, mediante el método de determinación del tiempo de coagulación<sup>(10)</sup>. Estos extractos y fracciones semipurificadas fueron obtenidos siguiendo los procedimientos y técnicas de extracción y purificación que se describieron en la parte teórica.

##### A.1) TECNICA EMPLEADA PARA LA DETERMINACION DE TIEMPO DE COAGULACION.

La técnica empleada para la determinación de tiempo de coagulación se realizó colocando en tubos de ensayo (13 x 100 mm), 1 ml de sangre humana recién obtenida de voluntarios sanos y cronometrando su tiempo de coagulación a temperatura ambiente, (hasta que la sangre no fluya por el tubo al inclinarlo 90°).

a) Tubo problema.

Se determinó el tiempo de coagulación de 1 ml de sangre en contacto con 0.1 ml de una solución al 2% aproximadamente (peso/volumen) de los principios activos solubles en solución salina isotónica o en el disolvente adecuado para cada extracto.

b) Testigo negativo.

Paralelamente a la determinación del tiempo de coagulación del tubo problema, se realizó la determinación, a un testigo negativo, para controlar el efecto del disolvente, empleando 1 ml de sangre en contacto con 0.1 ml de solución salina isotónica o de disolvente adecuado.

c) Testigo positivo.

Al igual que el testigo negativo se empleó el mismo tiempo de las determinaciones anteriores un tubo testigo positivo, con 1 ml de sangre y 0.1 ml de solución de heparina (5000 UI/ml) (ver esquema 1).

Se compararon los resultados entre el tiempo de coagulación del tubo problema y el testigo negativo y se calculó el % de alargamiento.

Los resultados se muestran en la tabla 5.

B. DETERMINACION DE INHIBICION DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA.

En segundo lugar se realizó una prueba de evaluación de la inhibición de la adhesividad plaquetaria<sup>(11)</sup>, utilizando un extracto con fuerte actividad anticoagulante (extracto metanólico sin saponinas de madera oscura).

**B.1) TECNICA EMPLEADA EN LA DETERMINACION DE INHIBICION DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA.**

En este caso se obtuvieron muestras de sangre de donadores sanos con anticoagulante, (EDTA al 10%), en una proporción sangre-anticoagulante de 9:1 y en tubos de plástico.

Primeramente se determinó a estas muestras el número de plaquetas mediante el método manual:

La muestra de sangre diluída 1:100 con oxalato de amonio al 1% se coloca en una cámara de Newbaver y se cuentan, observando al microscopio, la cantidad de plaquetas en 5 cuadros de la cuadrícula central de la cámara. El resultado se multiplica por 5,000.

Después de éste primer recuento plaquetario se pone en contacto 2.25 ml de sangre con 0.25 ml de la solución al 2% aproximadamente de los principios activos del extracto, solubles en solución salina isotónica, en un tubo de plástico y en contacto con perlas de vidrio. Paralelamente se corre un tubo blanco para controlar el efecto del disolvente, con 2.25 ml de sangre y 0.25 ml de solución salina isotónica.

Estos tubos se incuban en baño de agua a 37°C, 30 minutos, al cabo de los cuales se hace un nuevo conteo plaquetario (2do. Recuento). (Ver esquema 2).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

C. DETERMINACION DE TIEMPO DE PROTROMBINA, TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA Y TIEMPO DE TROMBINA.

En tercer lugar y como una contribución más de este trabajo al estudio de la madera de "parota", se determinaron el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de trombo-plastina (TTP) y el tiempo de trombina (TT), a plasmas de donadores sanos mezclados con soluciones de diferentes concentraciones de los principios activos de un extracto metanólico sin saponinas.

C.1) TECNICA EMPLEADA EN LA DETERMINACION DE TP, TPT, TT.

La sangre para la prueba se mezcló con anticoagulante (citrato de Na) en una relación de 9:1 respectivamente y se centrifugó para obtener plasma rico en plaquetas, el cual se mezcló en partes iguales, con diluciones 1:4, 1:8 y 1:16 de una solución al 2% aproximadamente del extracto metanólico sin saponinas de madera oscura. Las pruebas se realizaron según las instrucciones del fabricante de cada reactivo y en un fibrinómetro "Becton-Dickinson"<sup>(12,13,14)</sup> que detecta automáticamente la formación del coagulo. Además se corrió en cada prueba un blanco, mezclando el plasma en prueba, con un volumen igual de solución salina

isotónica (ver esquema 3).

Los resultados se muestran en las tablas 7, 8, 9.

#### D. ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VIVO.

En cuarto lugar se realizó un estudio de toxicidad in vivo, de un extracto acuoso y otro metanólico total de madera oscura.

##### D.1) OBTENCION DE EXTRACTOS ACUOSO Y METANOLICO TOTAL DE MADERA OSCURA.

El extracto acuoso se obtuvo al hervir 430 g de aserrín, con 3500 ml de agua destilada por un tiempo aproximado de 2 hrs., se dejó reposar 1 día, de la infusión obtenida de color café oscuro, se filtró y se obtuvo un extracto seco de 25.8 g. Se preparó una solución al 0.6% (240 mg en 40 ml de solución salina isotónica) del extracto en polvo, para después hacer diluciones cuya concentración final fuera de 6 mg/ml, 3 mg/ml y 1.5 mg/ml (ver esquema 4).

El extracto metanólico se obtuvo después de someter a reflujo 100 g de aserrín de la madera oscura con 3 porciones de heptano de 250 ml cada una, una cada día, se filtró el aserrín y el extracto heptánico fue desechado. Ya seco el aserrín se hizo una extracción con 300 ml de metanol tres veces consecutivas. El extracto metanólico se evapo-



ró a sequedad, obteniéndose una pasta de color negro, a la cual se le eliminó el exceso de metanol por calentamiento en "baño maría". Se obtuvieron 11.5 g. De este extracto se hizo una solución al 0.6% en propilenglicol de tal manera que se obtuvieron las siguientes concentraciones: 6 mg/ml, 3 mg/ml y 1.5 mg/ml (ver esquema 5).

Ya obtenidos los extractos acuoso y metanólico total, las pruebas de toxicidad se realizaron en Colombia, por el Doctor Jorge Olarte, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Bogotá, en virtud de que la Facultad de Química no cuenta con un Departamento de Farmacología.

El extracto acuoso fue inyectado a 8 ratones machos blancos cuyo peso promedio era de 25 g, con las siguientes dosis escogidas arbitrariamente 60 mg/Kg, 30 mg/Kg y 15 mg/Kg, dos ratones para cada dosis y dos testigos. Los ratones fueron observados para los efectos de sedación, excitación, salivación, defecación, piloerección por un lapso de 2 horas y no se observó ninguno de estos síntomas, los ratones fueron observados una vez más, después de 24 horas se contaron las muertes y se efectuó la necropsia (ver esquema 4).

Los resultados fueron que la dosis donde se observó mayor efecto letal fué la dosis más alta (60 mg/Kg), presentando el ratón sangre no coagulada en la cavidad toráxi-

ca, los dedos y uñas presentaban un color morado (ver tabla 10).

El extracto metanólico fue administrado por vía intraperitoneal a un lote de 9 ratones en las dosis de 60 mg/Kg, 30 mg/Kg, 15 mg/Kg y propilenglicol la centésima parte de su peso, teniendo para cada dosis 2 ratones y un testigo (ver esquema 5). En el transcurso de una hora se observaron los siguientes efectos de sedación, incoordinación motora, depresión, pérdida del equilibrio de todos los ratones excepto el testigo (síntoma atribuido al propilenglicol).

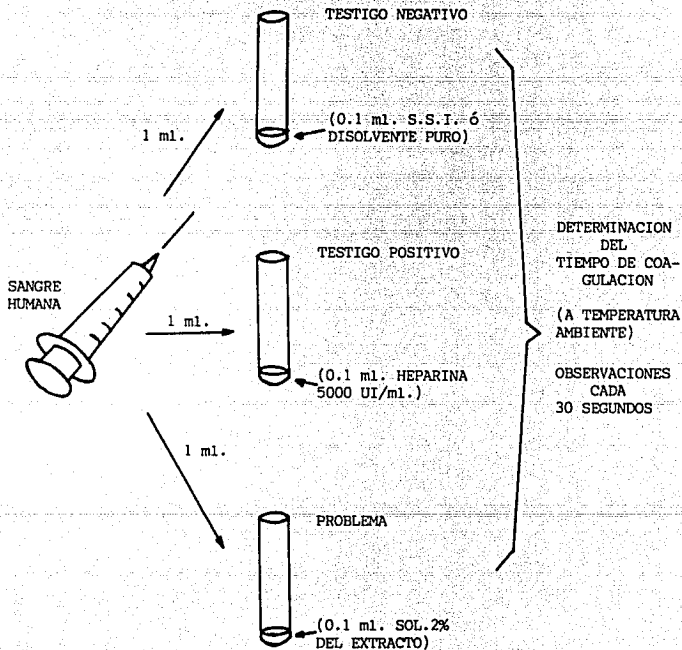
Los resultados se muestran en la tabla 11.

#### E. ESTUDIO CRONICO DE TOXICIDAD.

Por último se realizó un estudio crónico de toxicidad, realizado también en Colombia por el Dr. Jorge Olarte. A un lote de 10 ratones, 5 hembras y 5 machos se les tubo en observación por un lapso de 42 días en camas con aserrín de la madera oscura de parota, cambiándolas, cada 3-4 días para que estuvieran en contacto directo con el aserrín.

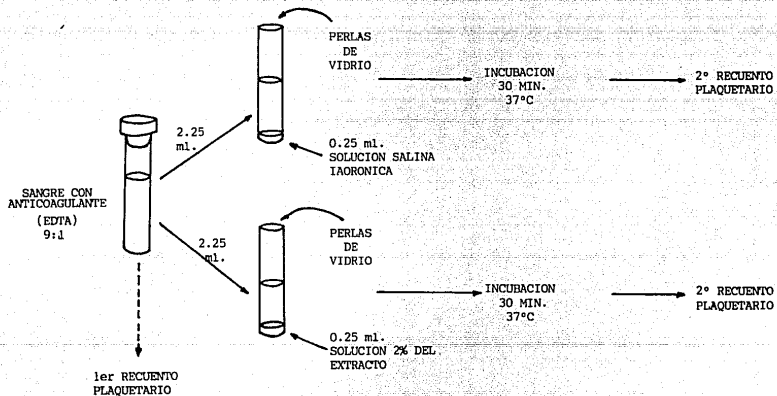
No se observó ningún cambio aparente a simple vista en estos animales, se sacrificaron al cabo de dicho tiempo y en la necropsia tampoco se observó ninguna alteración, se les extirparon los órganos (riñón, hígado, pulmones, corazón) para posterior observación microscópica, que quedó pendiente.

"DETERMINACION DE TIEMPO DE COAGULACION"



ESQUEMA 1

"DETERMINACION DE INHIBICION DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA"



ESQUEMA 2

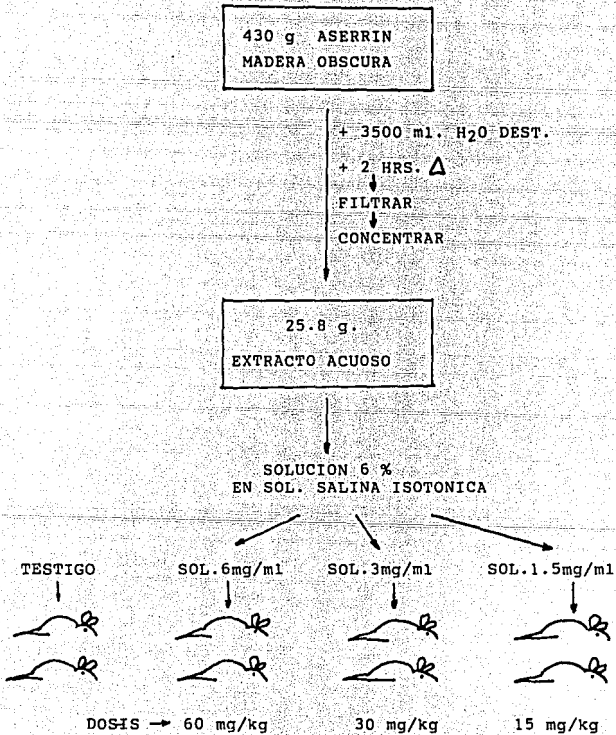
"PREPARACION DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE  
 TIEMPO DE PROTROMBINA, TIEMPO PARCIAL DE  
 TROMBOPLASTINA Y TIEMPO DE TROMBINA "

TUBO	PLASMA	SOLUCION SALINA ISOTONICA	EXTRACTO METANOLICO 1:16	EXTRACTO METANOLICO 1:8	EXTRACTO METANOLICO 1:4
1	0.2 ml.	---	---	---	---
2	0.2 ml.	0.2 ml.	---	---	---
3	0.2 ml.	---	0.2 ml.	---	---
4	0.2 ml.	---	---	0.2 ml.	---
5	0.2 ml.	---	---	---	0.2 ml.

DETERMINACION DE: 1  
 -TIEMPO DE PROTROMBINA 2  
 -TIEMPO PARCIAL DE -- 3  
   TROMBOPLASTINA  
 TIEMPO DE TROMBINA

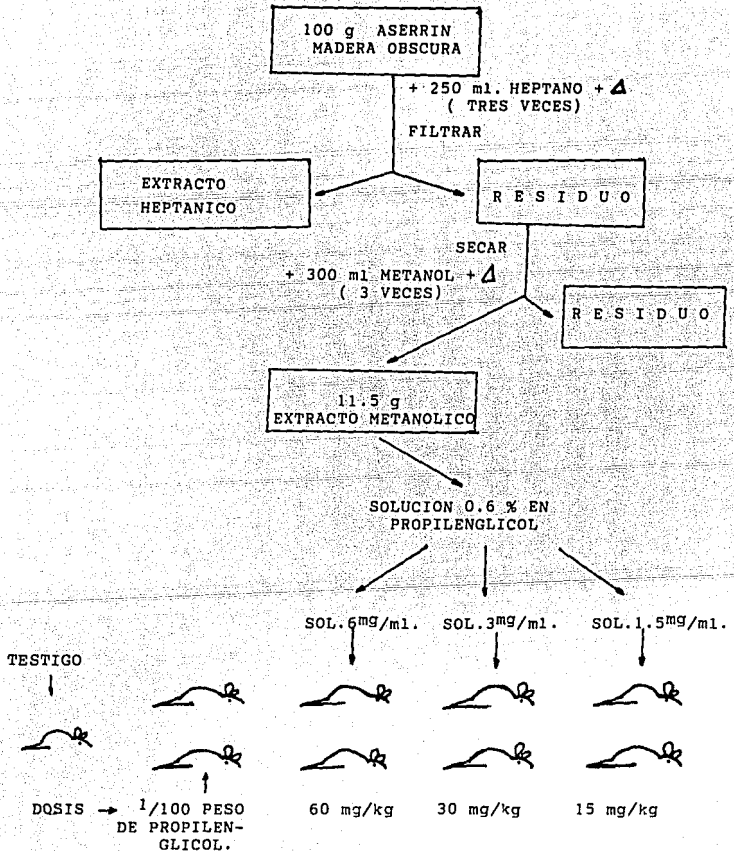
ESQUEMA 3

"PRUEBA DE TOXICIDAD EXTRACTO ACUOSO"



-OBSERVACION A LAS 2 HRS. Y 24 HRS DESPUES-

"PRUEBA DE TOXICIDAD EXTRACTO METANOLICO"



-OBSERVACION A LA HORA Y 24 HORAS DESPUES-

## "DETERMINACION DEL TIEMPO DE COAGULACION".

#	CLAVE	MUESTRA	MIN-TUBO	MIN. TUBO ALARGA NEG.	% ALARGA MIENTO	OBSERVACIONES
1	C <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	EXT. ACETATO DE ETILO	40	8	400	
2	C <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	EXT. METANOLICO	18	8	125	
3	C <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	17	7.5	127	
4	C <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	" " "	19	7.5	153	
5	C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	EXT. METANOLICO	17	7.5	127	
6	C <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	15	7.5	100	
7	C <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	" " "	25	7.5	233	
8	C <sub>1</sub> I <sub>3</sub>	SAPOGENINAS	9	7	29	
9	C <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	EXT. MeOH 5/ SAPONINAS	15	9	67	
10	C <sub>1</sub> B <sub>4</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	9	9	0	
11	C <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	EXT. METANOLICO	10	10	300	
12	C <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	SAPONINAS MAD. COLIMA	18	10	80	
13	C <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	EXTR. NO IDENTIFICADO	35	7	100	
14	C <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	" " "	25	7	257	
15	C <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	" " "	23	7	229	
16	C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	EXT. METANOLICO	26	7	271	
17	C <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	EXT. MeOH 5/SAPONINAS	29	7	314	
18	C <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	17	7.5	127	
19	C <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	EXT. MeOH 5/SAPONINAS	19	7.5	153	
20	C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	EXT. METANOLICO	17	7.5	127	
21	C <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	15	7.5	100	
22	C <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	" " "	25	7.5	233	
23	C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	EXT. METANOLICO	9	7	29	
24	C <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	EXT. MeOH 5/SAPONINAS	9	7	29	



"DETERMINACION DEL TIEMPO DE COAGULACION"  
(CONTINUACION)

#	CLAVE	MUESTRA	MIN.	MIN. TUBO NEG.	% ALARGAMIENTO	OBSERVACIONES
25	C <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	EXT. MeOH <sup>S</sup> /SAPONINAS	7	6	17	
26	C <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	EXT. NO IDENTIFICADO	6	6	0	
27	1 dil.	MUESTRA DE FABIO M.	10	10	0	} TUPO NEGATIVO y DISOLUCION DE MUESTRAS EN S.G.I. MeOH (9:1)
28	1'	" " " "	11	10	10	
29	2 dil.	" " " "	11	10	10	
30	2''	" " " "	13	10	30	
31	I	" " " "	15	11.5	30	
32	II	" " " "	11.5	11.5	0	
33	IV	" " " "	7	11.5	0	
34	VI	" " " "	11.5	11.5	0	
35	X	" " " "	10	11.5	0	
36	XI	" " " "	10	11.5	0	
37	F - 40	" " " "	20	8	150	
38	503-538	CERAS MADERA BLANCA	10	9	11	} NO DISOLUCION EN SANGRE (PROBADAS DIRECTAMENTE)
39	X <sub>1</sub>	" " " "	10	9	11	
40	542-690	" " " "	7	9	0	
41	50-80	" " " "	7	9	0	
42	91-94	" " " "	11	9	22	
43	"EVAPO-	EXT. CLOROFORMICO	8.5	8	6	NO MISCIBLE
44	RADO EN	EXT. ACETATO DE ETILO	15	8	87	HEMOLISIS DES NATURALIZACION
45	TRAMPAS	EXT. ETANOLICO	18	8	125	DES NATURALIZACION
46	" DISOL-	CLOROFORMO	10	8	25	NO MISCIBLE
47	VEN-	ACETATO DE ETILO	15	8	87	HEMOLISIS DES NATURALIZACION
48	TES"	ETANOL	18	8	125	DES NATURALIZACION

"TABLA 5" (CONTINUACION).

"DETERMINACION DE INHIBICION DE LA  
ADHESIVIDAD PLAQUETARIA"

1er RECUENTO ( $10^3/\text{mm}^3$ )	2º RECUENTO (C/.25mlS.S.I.)	% ADHE- SIVI- DAD.	2º RECUENTO (C/.25ml.EXT.)	% ADHE- SIVI- DAD.	OBSERVACIONES.
252	213	15.5	264	0	
204	161	21.0	163	20.1	
236	196	17.0	209	11.4	
299	288	3.7	329	0	
254	219	13.8	239	5.9	
246	166	32.5	176	28.4	
233	209	10.3	210	9.9	
156	95	39.1	104	33.3	
288	234	18.7	No sedimentó	- -	Falla técnica
265	248	6.4	216	18.5	
247	237	4.0	221	10.5	
325	296	8.9	251	22.8	
294	316	0	285	3.0	
183	186	0	176	3.8	
230	225	2.2	225	2.2	
330	280	15.5	285	13.6	
265	No sedimentó	- -	225	15.1	Falla técnica
285	285	0	295	0	
255	200	21.6	250	2.0	
275	235	14.5	240	12.7	
205	164	20.0	184	10.2	

"DETERMINACION DE TIEMPO DE PROTROMBINA"

TUBO ↓	DETERMINACION →	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$
1	$\Sigma$	12.4" - 12.1" 11.9"	10.9" - 10.5"	12.9" - 13.9"	11.1" - 10.7"	26.3" - 25.8"
	$\bar{x}$	12.1"	10.7"	13.4"	10.9"	26"
	%					
2	$\Sigma$	14.2" - 14.8"	13.4" - 13.4"	16.9" - 16.8"	12.7" - 12.3"	29.9" - 32.3"
	$\bar{x}$	14.5"	13.4"	16.8"	12.5"	31.1"
	%	19.8	25	25.7	14.7	19
3	$\Sigma$	19.7" - 20.4"	14.8" - 15.7"	25.9" - 27.3"	22.5" - 19.9"	34.9"
	$\bar{x}$	20"	15.2"	26.6"	21.2"	34.9"
	%	65	42	98	91	34
4	$\Sigma$	29.5" - 26.2"	20.2" - 20.7"	32.3" - 32.8"	27.7" - 27.4"	41.9"
	$\bar{x}$	28.8"	20.4"	32.5"	27.5"	41.9"
	%	138	91	143	152	60.8
5	$\Sigma$					71.7" - 117"
	$\bar{x}$	> 2'	> 2'	> 2'	> 2'	94.5"
	%	> 800	> 1000	> 1000	> 700	263

% = PORCIENTO LINEAL DE ALARGAMIENTO

TABLA 7

"DETERMINACION DE TIEMPO PARCIAL  
DE TROMBOPLASTINA"

TUBO ↓	DETERMINACION.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
1	$\Sigma$	35.2"-35.6"	26.7"-26.4"	39.9"-43.3"	36.6"-38.3"
	$\bar{x}$	35.4"	26.5"	41.6"	37.4"
	%				
2	$\Sigma$	41.2"-37.4"	31.7"-31.4"	49.8"-55.3"	54.8"-63.8"
	$\bar{x}$	39.3"	31.5"	52.5"	59.3"
	%	11	18.8	26.2	58.3
3	$\Sigma$	111"-109"	131.7"-154"	140"-162"	
	$\bar{x}$	110"	143"	151"	> 2'
	%	210	439	263	> 221
4	$\Sigma$				
	$\bar{x}$	> 2'	> 2'	> 2'	> 2'
	%	> 239	> 353	> 188	> 221
5	$\Sigma$				
	$\bar{x}$	> 2'	> 2'	> 2'	> 2'
	%				

% = PORCIENTO LINEAL DE ALARGAMIENTO

TABLA 8

"DETERMINACION DE TIEMPO DE TROMBINA"

T U B O ↓	DETER- MINA- CION.	$X_1$	$X_2$
1	$x$	23.5"-23.6"	21.6"-22.8"
	$\bar{x}$	23.5"	22.2"
	%		
2	$x$	46.6"-43.2"	27.2"-27.3"
	$\bar{x}$	44.9 "	27.2 "
	%	90.6	22.8
3	$x$	24.7"-23.4"	21.7"-19.9"
	$\bar{x}$	24"	20.8"
	%	2.1	-
4	$x$	27.2"-24.4"	30.4"-30.2" 33"
	$\bar{x}$	25.8"	31.6"
	%	9.5	42.3
5	$x$		
	$\bar{x}$	> 2'	> 2'
	%	> 411	> 440

% = PORCIENTO LINEAL DE ALARGAMIENTO

TABLA 9

"PRUEBA DE TOXICIDAD. EXTRACTO ACUOSO"

RATON	PESO g.	DOSIS mg / kg	O B S E R V A C I O N E S
1	24	S.S.I.	- - - - -
2	23	S.S.I.	- - - - -
3	25	15	NO PRESENTO SINTOMAS APRECIABLES; MUERTE AL 4° DIA.
4	19	15	- - - - -
5	23	30	- - - - -
6	25	30	- - - - -
7	24	60	MUERTE A LAS 18 HRS. PRESENTA SANGRE NO COAGULADA.
8	25	60	MUERTE A LAS 18 HRS. NO PRESENTA COAGULACION SANGUI- NEA EN LA CAVIDAD TORAXICA, SE OBSERVAN RESIDUOS NE- GROS EN PARTES DEL INTESTINO; NARIZ, DEDOS DE MANOS Y PATAS DE COLOR ROJO.

"TABLA 10"

"PRUEBA DE TOXICIDAD. EXTRACTO METANOLICO"

RATON	PESO g.	DOSIS mg/kg	OBSERVACIONES
1	25	15	LENTITUD DE MOVIMIENTOS, CON POSTERIOR RECUPERACION Y MUERTE A LOS 4 DIAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION.
2	20	15	DEPRESION, MUERTE APROX. A LAS 18 HRS. DESPUES DE LA ADMON. EN LA NECROPSIA PRESENTA HEMORRAGIA EN LA PARED DORSAL (PARALUMBAR) HEMORRAGIA SIN COAGULO BIEN FORMADO. DUODENO GELATINOSO.
3	24	30	DEPRESION Y MUERTE A LAS 18 HRS. DESPUES DE LA ADMON. PRESENTA DEDOS DE LAS PATAS Y MANOS ASI COMO LA NARIZ DE COLOR MORADO.
4	24	30	NARIZ, PUNTA DE LOS DEDOS Y UÑAS DE COLOR ROJO.
5	23	60	EN LA NECROPSIA SE OBSERVO QUE A PESAR DE TENER MAS DE 6 HRS. DE MUERTO NO PRESENTA COAGULACION EN LA CABIDAD TORAXICA.
6	23	60	DEPRESION Y MUERTE, EN LA NECROPSIA SE OBSERVA EL DUODENO DE ASPECTO GELATINOSO.
7	23	PROPILEN GLICOL	SEDACION E INCORDINACION MOTORA, POSTERIOR NORMALIZACION Y MUERTE AL 8° DIA.
8	22	PROPILEN GLICOL	NO PRESENTO SINTOMAS
9	25	TESTIGO	- - - - -

"TABLA 11"

## CAPITULO IV

## DISCUSION Y RESULTADOS



1. Prueba de tiempo de coagulación.

De los resultados obtenidos en la prueba de tiempo de coagulación (ver tabla 5, parte experimental), se observa una actividad anticoagulante positiva para los extractos y fracciones semipurificadas de madera oscura (mayores del 100% lineal de alargamiento), siendo estos el extracto metanólico, extracto metanólico sin saponinas, extracto de acetato de etilo y la fracción F-40.

No se encontró actividad anticoagulante en las ceras de la madera blanca.

Las pruebas en las que se utilizan disolventes orgánicos no se consideran confiables debido a los efectos hemolizantes y desnaturalizantes.

Se utilizó en esta prueba 0.1 ml de la solución de muestra con 1 ml de sangre debido a que se consideró la más práctica de las reportadas en trabajos anteriores<sup>(1)</sup>.

2. Prueba de inhibición de la adhesividad plaquetaria.

En la prueba de inhibición de adhesividad plaquetaria se observa que si se resta la adhesividad obtenida en el tubo blanco de solvente (con S.S.I.) y la obtenida en el tubo que se utiliza el extracto (ver tabla 2 parte experimental), las diferencias van desde un 0.4 a un 19.5% de adhesividad (ver tabla 12), con una media de 8.2%. En base a que el coeficiente de variación en la cuenta de pla-

quetas es de 8-10% no se considera significativa esta prueba (8).

3. Pruebas de determinación de tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina (TPT) y tiempo de trombina (TT).

El efecto del extracto sobre las pruebas de TP, TPT y TT, resultó altamente positivo a la actividad anticoagulante para el extracto metanólico sin saponinas utilizado.

La prueba de tiempo de protrombina nos muestra que el tubo # 2 utilizado como blanco de disolvente nos da un alargamiento en promedio de 20.8% lineal (ver tabla 13).

El tubo # 3 que utiliza una dilución de 1:16 de la solución del extracto, nos da un alargamiento lineal promedio de 45.8% al restarle el % lineal de alargamiento promedio de tubo # 2.

El tubo # 4 que utiliza una dilución de 1:8 nos da un alargamiento real en promedio de 96.2% lineal. Siendo que en el tubo # 5 es un promedio mayor del 700%.

En la prueba de TPT, el tubo blanco de disolvente nos da un alargamiento promedio de 28.5% lineal. Restando este valor al % lineal de alargamiento promedio del tubo 3 con muestra 1:16 nos da un % lineal promedio de 275%, sin cortar la determinación  $X_4$  debido a que dió más de 2 min. de tiempo de alargamiento.

Los resultados en las diluciones del extracto 1:8 y

1:4 nos muestra una gran actividad anticoagulante, mayor de 220% lineal (ver tabla 14).

Con respecto a la determinación de tiempo de trombina solo se realizaron 2 determinaciones, siendo que los resultados nos muestran una actividad anticoagulante franca en el tubo 5 correspondiente a una dilución 1:4 de la solución del extracto. Obteniéndose en este tubo un alargamiento promedio mayor al 300% lineal.

#### 4. Estudio de toxicidad de extractos acuoso y metanólico total.

En la prueba de toxicidad se observó que tanto el extracto acuoso como el metanólico resultaron tóxicos.

Los resultados de la administración del extracto acuoso indicaron que sólo a dosis de 60 mg/Kg se observaron muertes a las 18 horas debidas al extracto. Presentándose en la necropsia sangre no coagulada en la cavidad torácica, dedos y uñas de color morado.

En el caso de la administración del extracto metanólico, los efectos letales se observan desde la dosis de 15 mg/Kg, por lo que se observa una toxicidad mayor que en la del extracto acuoso.

Observándose en las necropsias hemorragias en pared dorsal, sangre no coagulada, manos, patas y nariz de color morado. Confirmándose con esto la actividad anticoagulante en los dos extractos.

"PRUEBA DE INHIBICION DE LA ADHESIVIDAD  
PLAQUETARIA"

DETERMINACION.	% ADHESIVIDAD TUBO BLANCO (C/ S.S.I.)	% ADHESIVIDAD TUBO PROBLEMA (C/EXTRACTO)	DIFERENCIA
1	15,5	0	15,5
2	21,0	20,1	0,9
3	17,0	11,4	5,6
4	3,7	0	3,7
5	13,8	5,9	9,9
6	32,5	28,4	4,1
7	10,3	9,9	0,4
8	39,1	33,3	5,8
9	---	---	---
10	6,4	18,5	-12,5
11	4,0	10,5	-6,5
12	8,9	22,8	-13,9
13	0	3,0	- 3,0
14	0	3,8	- 3,8
15	2,2	2,2	0
16	15,1	13,6	11,5
17	---	---	---
18	0	0	0
19	21,6	2,0	19,6
20	14,5	12,7	11,8
21	20,0	10,2	9,8

"DETERMINACION DE TIEMPO DE  
PROTROMBINA"

TUBO	DILUCION	% PROMEDIO	% PROMEDIO REAL
2	BLANCO	20.8	----
3	1:16	66.6	66.6-20.8= 45.8
4	1:8	117	117-20.8= 96.2
5	1:4	> 750	750-20.8= >730

TABLA 13

"DETERMINACION DE TIEMPO PARCIAL  
DE TROMBOPLASTINA "

TUBO	DILUCION	% PROMEDIO	% PROMEDIO REAL
2	BLANCO	28.5	---
3	1:16	304	304-28.5= 275.5
4	1:8	> 250	250-28.5= > 220
5	1:4	> 250	250-28.5= > 220

"TABLA 14"

## CAPITULO V

## CONCLUSIONES

**ESTA TESIS NO PUEDE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

1. Se llegó a la selección e implementación de una prueba cualitativa para la determinación de la actividad anticoagulante de muestras puras o extractos de productos naturales en el laboratorio de fitoquímica. Siendo esta la determinación del tiempo de coagulación, por ser más sencilla, no requerir aparatos especiales, ni reactivos manufacturados.

Las condiciones en que se efectúa la prueba fueron:

- Cantidad de muestra 0.1 ml de una solución de concentración aproximada al 2% en solución salina isotónica.
- Sangre de donadores sanos voluntarios.
- Un cronómetro.
- Tubos de ensayo (13x100).

2. Del estudio bibliográfico efectuado y las pruebas realizadas se concluye y confirma que la actividad anticoagulante de la madera de Enterolobium cyclocarpum se encuentra únicamente en la madera oscura, siendo negativa para la madera blanca.

3. De acuerdo a las pruebas de toxicidad efectuadas con ratones con los extractos acuoso y metanólico, de probada actividad anticoagulante, se concluye que los extractos son tóxicos, encontrándose que el extracto metanólico es más activo, mostrando efectos letales a dosis de 15 mg/Kg de peso, siendo que dichos efectos se observan en el extracto acuoso a dosis de 60 mg/Kg de peso.

4. Se sugiere que se haga en México un estudio de toxicidad crónica completo.

5. Se sugiere que se aisle nuevamente el compuesto "fpp1cal"<sup>(2)</sup>, que resultó con actividad anticoagulante, se elucide su estructura por los métodos espectroscópicos y se realice con él las siguientes pruebas:

- Tiempo de coagulación.
- Tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina y tiempo de trombina con plasmas normales y deficientes de factores de coagulación.
- Agregación plaquetaria.
- DL<sub>50</sub>.
- Estudio completo de toxicidad in vivo.

Todo lo anterior encaminado a la posibilidad de utilizarse como medicamento y para llegar al conocimiento del mecanismo de acción como anticoagulante.

6. En base a los estudios químicos realizados en trabajos anteriores se sugiere llegar al aislamiento de otros compuestos puros de los extractos de madera oscura que presentan actividad anticoagulante<sup>(1,2)</sup>, (extracto metanólico sin saponinas, extracto etéreo, extracto de acetato de etilo y extracto acuoso). Realizando los mismos estudios que se siguieron para el compuesto "fpp-1cal", pensando que la actividad anticoagulante confirmada, puede deberse a uno o varios compuestos.



## CAPITULO VI

## BIBLIOGRAFIA

1. Martínez, Maximino; "Las plantas medicinales de México". Ediciones Botas. México. 1944.
2. Martínez, Maximino; "Plantas útiles de la flora Mexicana". Ediciones Botas. México. 1963.
3. Calle Alvarez, Jairo; "Estudio químico y farmacológico de la madera de Enterolobium cyclocarpum (Jacq) griseb". Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. 1978.
4. Toledo Flores, Susana E.; "Estudio de la grasa de la madera oscura del Enterolobium cyclocarpum". Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias Química, Universidad Autónoma de Puebla. 1985.
5. Mayorca Niño, Fabio; "Aislamiento del principio anti-coagulante del Enterolobium cyclocarpum y Síntesis de acetilsalicilato de guayacol". Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. 1984.
6. Vázquez Morgán, Herminio; "Estudio Fitoquímico de la Madera Blanca de una leguminosa". Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla. 1987.
7. Juárez López, Hilda E.; "Estudio del extracto hexánico de la madera blanca de Parota". Tesis de Licenciatura (en proceso). Facultad de Química, UNAM.
8. Dacie, J.V.; Lewis, S.M.; "Practical Hematology" 5<sup>th</sup> Ed. Churchill-Livingstone. London. 1975.
9. Wintrobe, M.M.; "Clinical Hematology" 8<sup>th</sup> Ed. Leal and Febiger. U.S.A. 1981.

10. Lee, R.I.; White, P.D.; "A clinical study of the coagulation time of blood". Am. J. Med. Sci. 145, 495. 1913.
11. Hellem, A.J.; "The adhesiveness of human blood platelets in vitro". Thesis, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12 (Suppl. 51).
12. Quick, A.S.; Stanly-Brown, M.; Brancroft, F.W.; "Determination of Prothrombin". Am. J. Med. Sci. 190, 501. 1935.
13. Proctor, R.A. and Rapaport S.I.; "The parcial Thromboplastin time with Kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies". Am. J. Clin. Pathol. 36, 212. 1961.
14. Jim, R.T.S.; "A study of the plasma thrombin time". J. Lab. Clin. Med. 50:45. 1957.