



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO EN EXTRACTOS  
DE LA SEMILLA  
*THEVETIA THEVETHIOIDES (HBK.)***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

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

**ROSAS MAQUEDA JEANETE**



MÉXICO, DF.

2012



## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dra. Yolanda Caballero Arroyo.

**VOCAL:** Profesor: M. A. Rosa Luz Cornejo Rojas.

**SECRETARIO:** Profesor: Q. Katia Solórzano Maldonado.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Q. Ana Adela Sánchez Mendoza.

**2º SUPLENTE:** Profesor: Dr. Federico Jesus Jiménez Cruz.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Anexo del Laboratorio 2B Edificio A  
FACULTAD DE QUIMICA. UNAM

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO**

---

**SUSTENTANTE (S):**

**JEANETE ROSAS MAQUEDA**

---



## Contenido

<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	1-2
<b>Capítulo II. Objetivos</b> .....	4
<b>Capítulo III. Antecedentes</b>	
3.1 Familia Apocynaceae.....	5
3.2 Generalidades.....	6
3.2.1 Thevetia thevetioides.....	6
3.3 Descripción morfológica.....	7
3.4 Usos.....	7
3.5 Características botánicas.....	8
3.6. Distribución Geográfica y ecología.....	9
3.7 Composición Química.....	10-11
3.8 Farmacología.....	12
3.9 Toxicología.....	12
3.9.1. Cuadro clínico de la intoxicación, pronóstico y dosis letal.....	12
3.9.2 Tratamiento.....	13
<b>Capítulo IV Fundamentos teóricos</b>	
4.1 Caracterización de lípidos.....	14
4.1.1 Generalidades.....	14
4.2 Estructura química.....	15
4.2.1 Lípidos saponificables.....	16-17
4.2.2. Ácidos grasos.....	17
4.2.3 Propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos.....	20
4.3. Lípidos Insaponificables.....	21
4.4. Métodos de extracción de aceites y grasas.....	21
4.5. Análisis de lípidos.....	25
4.5.1. Índice de refracción.....	25
4.5.2 Índice de Yodo (método de Wijs).....	26
4.5.3 Determinación del índice de Saponificación.....	27
4.5.4. Análisis Cromatográficos.....	29



## Capítulo V. Métodos de Análisis de Compuestos Polares

5.1 Identificación de Carbohidratos.....	35
5.2. Pruebas de Fehling y Benedict para determinar azúcares reductores.....	36
5.2.1 Reacción de Benedict.....	36-37
5.2.2 Reacción de Fehling.....	37-38
5.2.3. Reacción de Mölish.....	38-39
5.3. Fenoles.....	40
5.3.1 Método de identificación de fenoles totales.....	41
5.4. Cuantificación de fenoles totales.....	41

## Capítulo VI. Parte Experimental

6.1 Obtención del aceite.....	43
6.1.1. Material vegetal.....	43
6.1.2. Extracción del aceite.....	44
6.2. Caracterización de lípidos.....	46
6.2.1 Índice de refracción.....	46
6.2.2. Determinación del índice de yodo.....	47
6.2.3. Determinación del índice de saponificación.....	48-49
6.2.4. Análisis cromatográficos.....	50-51
6.3. Extracción de compuestos polares.....	51-52
6.4. Determinación de azúcares.....	53
6.5. Identificación de Fenoles.....	54
6.6 Cuantificación de fenoles totales.....	54
6.6.1. Preparación de la curva de calibración.....	55

## Capítulo VII. Resultados.....58-60

## Capítulo VIII. Conclusiones y Recomendaciones.....61-62

## Capítulo IX. Anexos

9.1 Índice de figuras y cuadros.....	63
9.2 Índice de diagramas.....	63
9.3 Lista de tablas.....	64

## Capítulo X. Bibliografía Referencias.....65-67



## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Yolanda Caballero Arroyo** por su valiosa colaboración y dirección en la elaboración de esta tesis. Por todo el apoyo que recibí de su parte en mi estancia en el laboratorio.

A la **MAO. Rosa Luz Cornejo Rojas** sus comentarios en la revisión de esta tesis.

A la **Q. Katia Solórzano Maldonado** por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis. Al igual por el su tiempo para la realización de los ensayos que se realizaron en horario de extra clase.

A la USAI por el apoyo recibido en la elaboración de los espectros de IR.

A Bob por su apoyo y consejos en los últimos semestres de la carrera.

A mí querida Universidad Nacional Autónoma de México, y a la facultad de Química, por mi formación profesional.



## DEDICATORIAS.

Le dedico esta tesis a mis papas, hermanos, sobrin@s por el apoyo que me han dado.

Así mismo a mis abuelitos adoptivos, la Sra. Lorenza González y el Sr. Jerónimo Romero, brindarme apoyo durante mis estudios.

A mis amigas con las que inicie y continúe muy buenos momentos durante la carrera Lena, Belén, Karina, Elizabeth, Montserrat, Joanna, mi hermanita Pili, Magalli, Sonia, Angélica,

Al gran equipo que formamos en el laboratorio 2B, Elva E. Maguey, Ana Silvia. Ofelia, Jaz, cinthya Ale, Alicia, Leslie, Rebeca, gracias por todo su apoyo, por compartir conmigo los buenos y malos momentos, pero sobre todo por darme lo más valioso, su amistad.

A todos mis profesores por sus valiosas enseñanzas y consejos.



*Si no sigues un autentico camino hasta el final, una pequeña maldad al principio se convierte en una gran perversión. **Miyamoto Musashi***

*Uno nace con un temperamento producto de herencias ancestrales. Se es, como se es. Pero algunos los mejores, un día se miran y no se gustan. Dirán: voy a rehacerme voy a recrearme para no ser como soy sino como debo y quiero ser. Toman su naturaleza, la moldean, la cincelan, la transfiguran. Crean un hombre nuevo. Ya no son hijos de sus padres, sino hijos de sí mismos, nadie los reconoce, como cuando no se reconoce a un bloque de piedra cuando de ella se ha hecho una estatua, del ser original solo queda la materia prima, pero lo que cuenta ahí es la forma. Sin embargo el hombre no es como la piedra que recibiendo cincelazos, ya permanece como lo dejo el artista. No, el hombre tiene que esculpirse todos los días, todas las horas, todos los instantes, porque si no, vuelve a ser lo que era. **Mohadas Karamchad Ghandi***



## ABREVIATURAS

<b>A.C</b>	antes de cristo
<b>°C</b>	grados centigrados
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de carbono
<b>CG</b>	cromatografía de gases
<b>cm</b>	centímetros
<b>g</b>	gramos
<b>HCl</b>	ácido clorhídrico
<b>I.S.</b>	índice de saponificación
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>Kg</b>	kilogramos
<b>KOH</b>	hidróxido de potasio
<b>M</b>	molaridad
<b>m</b>	metros
<b>mcg</b>	microgramos
<b>mg</b>	miligramos
<b>mL</b>	mililitros
<b>N</b>	normalidad
<b>nm</b>	nanometros
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud



# I. CAPÍTULO

## INTRODUCCIÓN.

El interés por la investigación en plantas medicinales se ha incrementado en todos los países. De acuerdo a la OMS, el 80 % de la población mundial recurre cotidianamente a la medicina herbolaria.

México, en particular, posee una de las floras más variadas de América, por lo que se tiene un amplio potencial en principios activos de origen natural.

Las investigaciones en plantas medicinales deben estar enfocadas no solo a la conservación de las mismas, sino también a la investigación química de sus metabolitos secundarios y al establecimiento de su potencialidad como fuentes de principios bioactivos. Por ello es necesario complementar el saber popular con estudios fitoquímicos y fitoterapéuticos.

La planta seleccionada como objeto de estudio, es *Thevetia thevetioides* (HBK), que pertenece a la herbolaria mexicana y es popularmente conocida como Codo de Fraile o yoyote. Las condiciones de adquisición de esta planta son relativamente fáciles, lo que representa una ventaja. Para la realización de este estudio, las semillas se adquirieron en el Mercado de Sonora ubicado en el Distrito Federal.



En lo que se refiere al conocimiento popular, también la registran como planta ornamental debido al elegante follaje que ofrece. Sus semillas son usadas por artesanos en la producción de collares e indumentarias de adorno y danza.

En la tradición popular se emplea para el tratamiento de afecciones de la piel; en la curación de hemorroides y várices, se utiliza también como antiinflamatorio, analgésico, antiparasitario, abortivo, en padecimientos bucales como dolor de muelas y caries, como tratamiento para el control de la obesidad.

En este trabajo se busca ampliar la información encontrada y dar una mejor orientación al uso de la semilla, ya que hoy en día ésta es ampliamente utilizada para controlar la obesidad, sin embargo, su uso no controlado puede causar serios problemas de salud e incluso la muerte.

La planta puede ser tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos. La inhalación, ingestión o contacto con las mucosas de la savia o extractos de la planta, puede causar muchas reacciones adversas como: náuseas, vomito, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, midriasis y trastornos cardiovasculares.

En estudios químicos realizados al Codo de Fraile (*Thevetia thevetioides*), se han encontrado los siguientes metabolitos secundarios: tevetina A, Tevetina B, tevefolina, terpenoides, acetato de  $\alpha$ - amirina, teveriina, quercetina, Kaempferol, entre otros.

Uno de los objetivos del presente trabajo es, proporcionar información acerca del uso de la semilla de *Thevetia thevetioides*, ya que se puede adquirir en el mercado de productos naturales comerciales sin receta médica y que puede llegar a causar daños irreparables.



---

Este trabajo, muestra los estudios realizados a la semilla con objeto de determinar el porcentaje de fracción lipídica y de los componentes polares.

Con el estudio del aceite extraído de las semillas se determinó la composición en ácidos grasos.

Para la realización del trabajo se emplearon técnicas básicas de la química: extracción, cristalización, cromatografía, etc, que se describirán con detalle.



## II. CAPÍTULO

### OBJETIVOS

➤ **Generales:**

- Efectuar una revisión bibliográfica de la planta seleccionada que incluya los compuestos químicos que han sido identificados en ella.
- Contribuir al estudio químico de la semilla del Codo de fraile (*Thevetia thevetioides*)

➤ **Particulares:**

- Separación de los componentes químicos polares y no polares empleando disolventes de diferente polaridad
- Cuantificación de las fracciones polares y no polares
- Reacción de saponificación del aceite para obtener un jabón.
- Empleo de la técnica de Wijs para determinar del grado de instauración del aceite.
- Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas del aceite
- Realización de pruebas cualitativas para la identificación de carbohidratos presentes en la fracción polar.
- Realización de pruebas cualitativas y cuantitativas para la identificación de fenoles totales.



# III. CAPÍTULO

## ANTECEDENTES

### 3.1- FAMILIA APOCYNACEAE

La familia Apocynaceae es un grupo conformado por aproximadamente 1500 especies agrupadas en 180 géneros de gran importancia económica y medicinal.<sup>(20, 22)</sup> En su mayoría se encuentra en climas tropical y subtropical, con pocos representantes en las regiones de clima templado. La familia está formada por árboles, arbustos y trepadoras. Generalmente poseen látex de color blanco, hojas opuestas o en ventrículos, a veces alternadas, simples, rara vez con estípulas. Inflorescencia racemosa o cimosa, a veces con las flores solitarias. Por lo general las flores son hermafroditas y por lo regular presentan 5 pétalos.

El fruto puede ser un folículo o una drupa, dehiscente o indehiscente, semillas con o sin endospermo, a veces con alas o pelos para su dispersión anemófila. Muchas de sus especies son productoras de alcaloides tóxicos ó medicinales así como de látex utilizado en la industria, y muchas otras se cultivan con fines ornamentales por sus llamativas y fragantes flores. Se cultivan especies arborescentes de los géneros: Nerium, Acokanthera, Achorosia, Plumeria, Rauwolfia y Thevetia.<sup>(20,23)</sup>

La familia Apocynaceae ha sido utilizada popularmente contra el reumatismo, como purgativo, el látex como queratolítico, las hojas como analgésico y antiinflamatorio. Los metabolitos más comunes son: terpenoides, glicósidos, lignanos y alcaloides.<sup>(1, 11., 12., 23)</sup>



## 3.2.- GENERALIDADES DE *THEVETIA THEVETIOIDES*

### 3.2.1 *THEVETIA THEVETIOIDES* (H.B.K). (CODO DE FRAILE)

El género *Thevetia* lleva este nombre como un reconocimiento al misionero francés *André Thévet* (1502/1590), quien dedicó gran parte de su vida a recolectar y estudiar plantas en Sudamérica.<sup>(14)</sup>

*Thevetia thevetioides* (H.B.K) es una especie muy llamativa, tanto por su porte general y su follaje verde oscuro, como por poseer las flores y frutos de mayor tamaño y más vistosos dentro del género *thevetioides*. (Figura 1). Se le suele cultivar para su uso ornamental, aunque en menor grado que *T. peruviana*. Es reconocido su uso en medicina popular contra varias afecciones, pero debe tomarse muy en cuenta que estas plantas contienen sustancias peligrosas por su gran toxicidad. Las "semillas" se han utilizado desde épocas antiguas como amuletos y también como pequeños instrumentos musicales de percusión.<sup>(11, 14)</sup>



Figura 1. *Thevetia thevetioides* (H.B.K) (Apocynaceae)



### 3.3- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

**Nombre Científico:** *Thevetia thevetioides* (H.B.K) K. Schum. In Engl.& Prantl, Pflanzenfam. 4:159.1895. *Cerbera thevetioides* H.B.K., Nov. Gen. Sp. Pl. 3: 223. 1819. (1,18, 19,23)

**Nombre. Vulgar:** Yoyote, yucacaca, calaveritas (Oaxaca), Chavaquín, Fraile (Guanajuato), Narciso Amarillo (Morelos), Cabrito (Jalisco), yoyote, hueso de fraile, Akitz (Yucatán), rejagar ( paramita, Nayarit), cobalonga, hueso de fraile, joyote.<sup>(1, 18)</sup>

### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

- **Reino** Plantae
- **División** Angiospermas
- **Clase** Dicotiledoneas
- **Subclase** Metaclamideas
- **Familia** *Apocynaceae*
- **Género** *Thevetia*
- **Especie** *Thevetia thevetioides*

### 3.4- USOS

Esta planta se recomienda para el tratamiento de afecciones de la piel como barros y espinillas (Morelos); padecimientos bucales como dolor de muelas y caries; problemas cardiovasculares, hemorroides o várices. Para estos dos últimos casos, en Michoacán se recomienda moler la semilla con vaselina y aplicar la pomada en la parte afectada. También es utilizada para quitar el dolor causado por la picadura de alacrán.



Se emplea contra algunas enfermedades culturales como el “mal de ojo” en niños y para la mollera caída en los niños recién nacidos o de pocos meses (se presenta el cráneo hundido y dificultad para respirar). Para ello se utilizan las flores y las semillas de la planta. Se le relaciona también con la terapéutica del paludismo. <sup>(11.22)</sup>

En el siglo XX, Maximino Martínez (maestro y botánico) consigna su uso como antiinflamatorio y como tratamiento para la dermatosis. <sup>(3)</sup>

El profesor Alfonso Herrera fue el primero que hizo el estudio químico de la planta y separó un glucósido que llamó Tevetosa. En Europa, la planta fue analizada por un investigador llamado Vry, quien menciona haber encontrado también un glucósido al que llamó Tevetina.

### 3.5.- CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Árbol pequeño, de 3 a 8 m de altura, hojas con peciolo no siempre bien definido, hasta de 0.5 cm de largo, las hojas son alargadas en forma de espátula, brillantes en el anverso y con muchos pelos en el reverso. Las flores son de color amarillo.

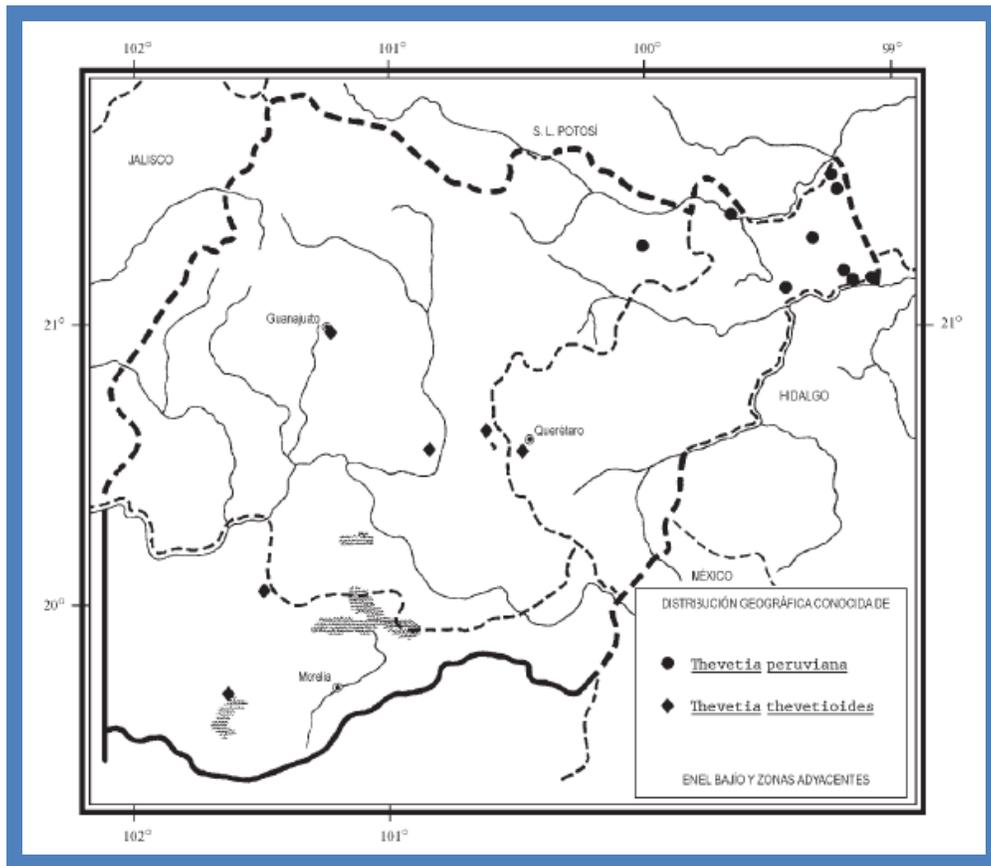
**Fruto:** Son casi triangulares, hasta de 5 cm de ancho, las semillas frescas son de color verdoso, cuando las semillas maduran son de color café claro; cada fruto contiene de 2 a 4 semillas.



### 3.6 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ECOLOGÍA.

Especie endémica del centro y sur de México: Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Yucatán.

(Figura 2.)



(Figura 2.) Distribución geográfica de la especie *Thevetia thevetioides* (H.B.K).

Se produce en climas cálido, semicálido y templado, y en altitudes de 1900-2200 m sobre el nivel del mar; florece y fructifica principalmente en la época lluviosa, de junio a septiembre.

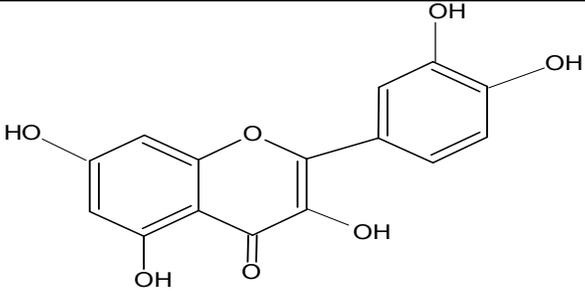
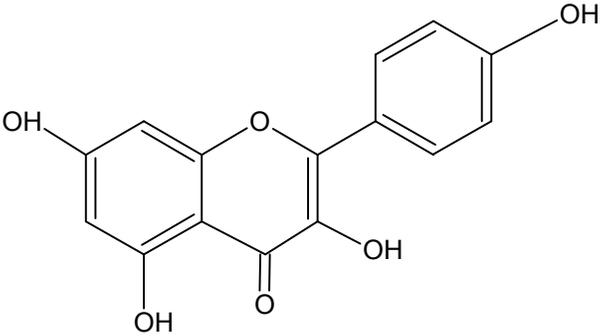


Forma parte del bosque tropical caducifolio, bosque mesófilo de montaña, bosque espinoso, bosque de encino y de pino.

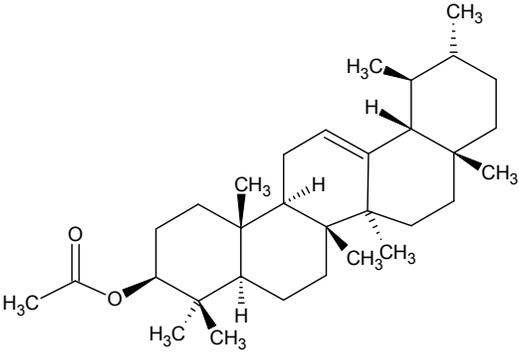
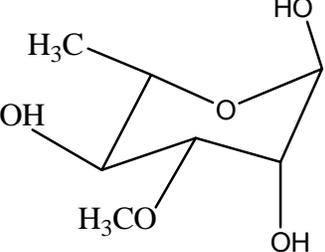
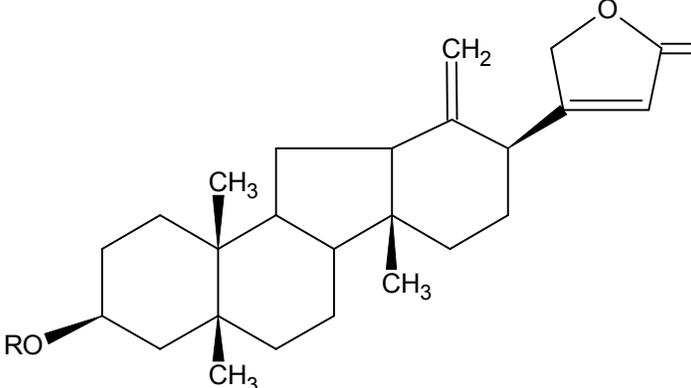
### 3.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en varios estudios incluyen: tevetina A y B, tevefolina, acetilneriifolia, teveneriina, terpenoides, quercetina, Kaempferol, acetato de  $\alpha$ -amirina, estigmasterol. Se indica la presencia de alcaloides en hojas y tallos. <sup>(7,11, 14)</sup>

**Cuadro 1.-** Estructuras de los metabolitos aislados en diferentes especies de *Thevetia*.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>Thevetia peruviana</b> <b>Thevetia thevetioides</b>	 <p>Quercetina</p>	<b>Kuklinski et. al., 2000</b>
<b>Thevetia peruviana</b>	 <p>Kaempferol</p>	<b>Kuklinski et. al., 2000</b>



<p><b>Thevetia peruviana</b></p>	 <p>Acetato de <math>\alpha</math>- amirina</p>	<p><b>Kuklinski et. al., 2000</b></p>
<p><b>Thevetia peruviana</b></p>	 <p><math>\alpha</math>-L- tevetosa</p>	<p><b>Kuklinski et. al., 2000</b></p>
<p><b>Thevetia neriifolia</b></p>	 <p>Tevetósido</p>	<p><b>Kuklinski et. al., 2000</b></p>



### **3.8.FARMACOLOGÍA**

Esta planta ha sido muy poco estudiada desde el punto de vista de sus propiedades farmacológicas.

Se ha observado actividad de un extracto de la planta como inhibidor de la ATPasa, a la concentración de 0.5 mcg/ml y 500 mg/kg de peso.<sup>(22)</sup>

Se ha comprobado la acción analgésica en el hombre, a partir de pomadas hechas con las almendras (semillas peladas), mediante aplicación tópica<sup>(23)</sup>

### **3.9.- TOXICIDAD**

#### **3.9.1. Cuadro clínico de la intoxicación, pronóstico y dosis letal**

La mayor parte de los cuadros son sintomáticos, sin embargo, un porcentaje de los pacientes pueden permanecer asintomáticos. Los signos y síntomas más frecuentes son: vómitos, cambios electrocardiográficos, bloqueo aurículo-ventricular, mareos, vértigo, dolor abdominal y diarrea.

La respuesta de cada paciente resulta muy variable y su pronóstico va a depender de factores como la edad, cantidad del compuesto absorbido, del tiempo transcurrido y el hecho de que la exposición haya sido intencional o no.

La dosis letal varía de acuerdo al sector de la planta que esté implicada y a la edad del paciente. Resulta potencialmente letal una cantidad en el rango de 1-2 semillas en niños y 8-10 semillas en adultos. En cuanto a las hojas, se ha calculado en 4g la dosis letal; la muerte ocurre habitualmente dentro de las primeras 24 horas.



Un extracto metanólico obtenido de las semillas provocó ataxia (trastorno caracterizado por la disminución de la capacidad de coordinar los movimientos del cuerpo) en ratones administrados por la vía intraperitoneal a la concentración de 75mg/kg de peso, así como la muerte de los animales cuando se administró por vía intraperitoneal a la dosis de 100mg/kg.<sup>(22)</sup>

De las semillas se ha aislado un glucósido cardiotónico, de las hojas y tallos se han aislado alcaloides. Se ha planteado que estos componentes pudieran explicar los efectos tóxicos reportados.<sup>(11,14,18, 22)</sup>

### 3.9.2 TRATAMIENTO

El manejo inicial del paciente intoxicado con *Thevetia peruviana* resulta similar al de otras intoxicaciones, como el de la conocida semilla castaño de indias, e incluye por ejemplo, medidas generales de soporte, hidratación y administración de antieméticos. En caso de vómitos severos se recomienda la administración de carbón activado.<sup>(23)</sup>



# IV *CAPÍTULO*

## CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

### 4.1.- GENERALIDADES

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, que se caracterizan por baja polaridad o por su baja solubilidad en disolventes polares. Los lípidos tienen diferentes funciones biológicas, sirven como moléculas combustibles, como almacenes de energía altamente concentrada, como moléculas señal y como componentes de las membranas.

Un grupo de lípidos muy importante lo forman los glicéridos que son ésteres de ácidos grasos y glicerol.

Los glicéridos pueden ser de origen animal o de origen vegetal. En los vegetales se localizan sobre todo en frutos y semillas.<sup>(16)</sup>

La mayoría de los lípidos poseen una gran parte apolar o hidrofóbica (“rechazo al agua”), lo que significa que no se solubiliza en disolventes polares. Puede ser que alguna otra parte de su estructura sea polar o hidrofílica.

La región hidrófoba de los lípidos es la que presenta solo átomos de carbono unidos a átomos de hidrógeno, como la larga “cola” alifática de los ácidos grasos o los anillos de esterano del colesterol; la región hidrófilica es la que posee grupos polares o con cargas eléctricas, como el hidroxilo (-OH) del colesterol, el carboxilo (-COO-) de los ácidos grasos libres, el fosfato (-PO<sub>4</sub>-) de los fosfolípidos, etc.<sup>(1, 2, 4,16)</sup>



En resumen, los lípidos constituyen un grupo sumamente importante de sustancias muy heterogéneas, que tienen en común las siguientes características:

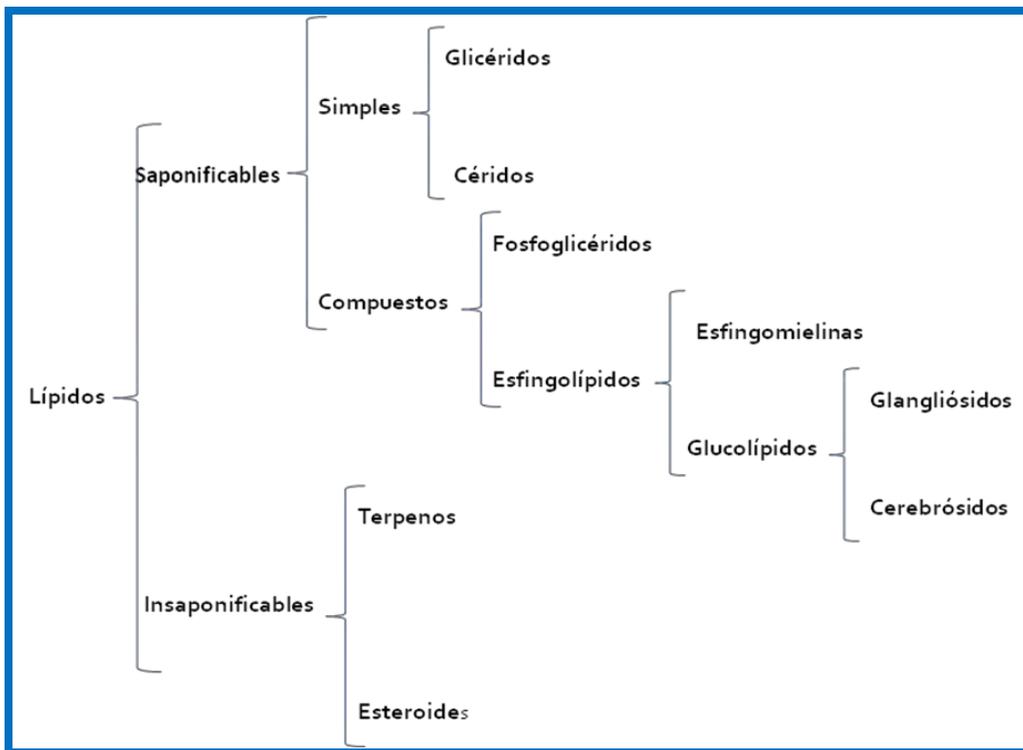
- I. Son insolubles en agua.
- II. Son solubles en disolventes no polares o débilmente polares como: éter, cloroformo, benceno, hexano, diclorometano.

#### 4.2.- ESTRUCTURA QUIMICA:

Los lípidos usualmente se clasifican en dos grupos, atendiendo a que posean en su composición ácidos grasos esterificados (**lípidos saponificables**) o no lo posean (**lípidos insaponificables**). (1, 2, 4, 16,17)

- **Saponificables**: pueden ser hidrolizados
- **Insaponificables**: no se hidrolizan.

#### Cuadro 2.-CLASIFICACIÓN DE LIPIDOS



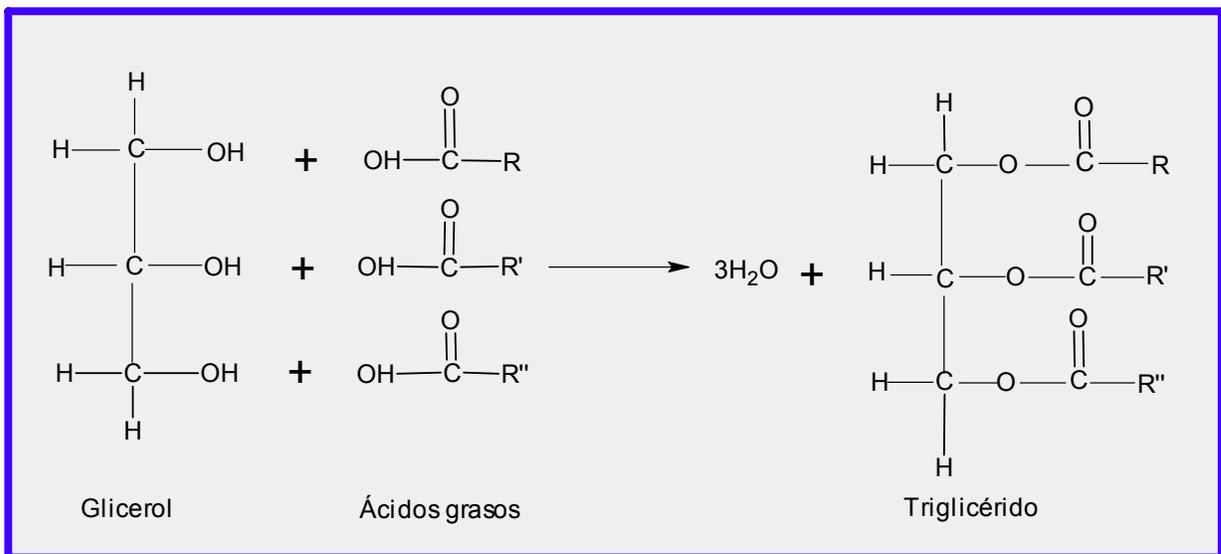


## 4.2.2. Lípidos Saponificables

Estos se dividen en simples y complejos

**Lípidos Simples:** Lípidos que sólo contienen carbono, hidrogeno y oxigeno.

Los aceites y grasas son sustancias de origen vegetal, marino o animal, que consisten predominantemente de mezclas de triésteres de la glicerina con ácidos grasos, es decir, triglicéridos, tal como lo muestra la siguiente reacción:



**Ecuación de saponificación:**

$$I.S = \frac{N * PM * (V_2 - V_1)}{m}$$

N = normalidad de la solución de HCl

PM = Peso molecular de la base utilizada.

V<sub>1</sub> = volumen (L) de HCl utilizado en la titulación del KOH remanente de la saponificación.

V<sub>2</sub> = volumen (L) de HCl utilizado en la titulación del blanco.

m = masa del aceite en gramos.



**Lípidos Complejos:** Son los lípidos que además de contener en su molécula carbono, hidrogeno y oxigeno, también contienen otros elementos como nitrógeno, fosforo, azufre u otra biomolécula como un glúcido. A los lípidos complejos también se les llama lípidos de membrana, pues son las principales moléculas que conforman las membranas celulares.

#### 4.2.2. Ácidos grasos

Los **ácidos grasos** son componentes de los glicéridos y céridos, son ácidos carboxílicos constituidos por largas cadenas carbonatadas (entre 12-24 carbonos) y un grupo carboxilo terminal, presentándose siempre los carbonos en número par.

Los ácidos grasos pueden ser saturados, si todos los carbonos están unidos por enlaces sigma o enlaces simples, o insaturados si tiene uno o más enlaces dobles.<sup>(2,16,17)</sup>

**Tabla 1.** Ejemplos de ácidos grasos comunes.

<b>ACIDOS GRASOS SATURADOS</b>			
	<b>Nombre sistemático</b>	<b>Punto de Fusión (°C)</b>	<b>Nombre común</b>
C- 10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ ácido decanoico	31.0	Ácido cáprico
C- 12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2	Ácido laúrico



	ácido dodecanoico		
C- 14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ ácido tetradecanoico	54.0	Ácido mirístico
C-16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ácido hexadecanoico	63.0	Ácido palmítico
C-18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ácido octadecanoico	69.6	Ácido esteárico
<b>ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS</b>			
C-18	$\text{COOH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ ácido 9-octadecenoico	4.0	Ácido oleico
C-18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ $\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ Ácido cis,cis-9-12- octadecadienoico	-12.0	Ácido linoleico



C-20	$\begin{aligned} & \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\mathbf{CH=CH}- \\ & \text{CH}_2-\mathbf{CH=CH}-\text{CH}_2- \\ & \mathbf{CH=CH}-\text{CH}_2-\mathbf{CH=CH}- \\ & (\text{CH}_2)_3-\text{COOH} \\ & \text{ácido 5,8,11,14-} \\ & \text{eicosatetraenoico} \end{aligned}$	-49.5	Ácido araquidónico
------	--	-------	-----------------------

**Ácidos grasos saturados:** No presentan dobles enlaces y son sólidos a temperatura ambiente.

**Ácidos grasos insaturados:** Los ácidos grasos insaturados se caracterizan por poseer dobles enlaces en su configuración molecular. Son fácilmente identificables, ya que estos dobles enlaces hacen que su punto de fusión sea menor que el ácido graso saturado de igual número de carbonos. Generalmente líquidos a temperatura ambiente. Este tipo de sustancias disminuyen el colesterol en sangre y también son llamados ácidos grasos esenciales.

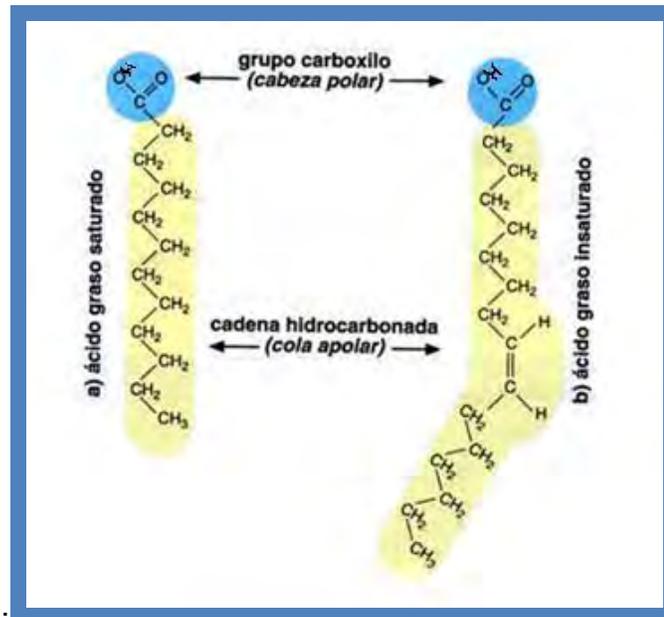


Fig.3 Estructura de ácidos grasos.

#### 4.2.3. Propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos.

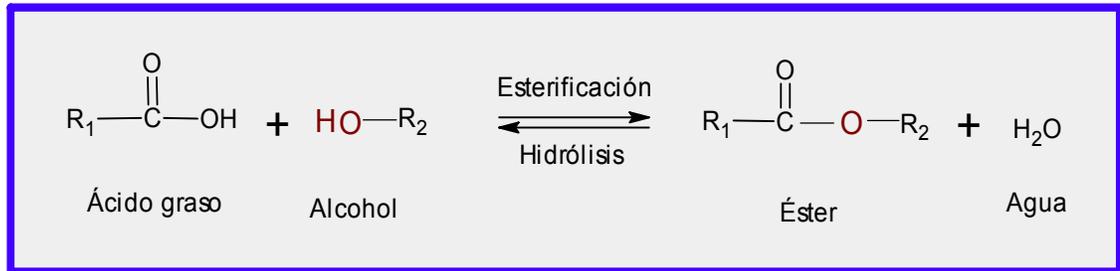
Los **ácidos grasos** poseen carácter anfipático, la cadena hidrocarbonada larga (cola) es insoluble en agua o hidrofóbica, el extremo constituido por un ácido carboxílico que es polar, (cabeza) permite la solubilidad en agua. <sup>(16)</sup>

**Punto de fusión:** Depende de la longitud de la cadena y de su número de insaturaciones, siendo los ácidos grasos insaturados líquidos a temperatura ambiente.

**Esterificación.** Los ácidos grasos pueden formar ésteres con el grupo alcohol de otras moléculas.



La hidrólisis de los ésteres es el proceso inverso de la esterificación; cuando un éster de ácido graso se hidroliza, se produce un ácido graso y un alcohol.



**Saponificación.** Por hidrólisis alcalina los ésteres de ácidos grasos dan lugar a jabones (sales de ácidos grasos).

La saponificación se descubrió antes del año 500 A. C. El término **saponificación** (del latín saponis, “jabón”) significa “hacer jabón”. El jabón se obtiene a partir de la hidrólisis básica de las grasas, que son mezclas de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga (ácidos grasos) con glicerol. Cuando se agrega una base por ejemplo (KOH, NaOH), la grasa se hidroliza; la mezcla de sales de sodio de los ácidos grasos de cadena larga que se obtiene, es lo que se denomina jabón. <sup>(16)</sup>

**Auto-oxidación.** También conocida como rancidez oxidativa. Los ácidos grasos insaturados pueden oxidarse en presencia de luz y oxígeno, dando como resultado aldehídos que dan origen a un olor característico. <sup>(2, 4)</sup>

### 4.3. LÍPIDOS INSAPONIFICABLES

Se caracterizan por la ausencia del grupo funcional éster y no tiene la posibilidad de formar jabones. Un grupo importante y frecuente en las plantas son los **terpenos**, abundantes en células vegetales que se clasifican según el número de unidades isoprénicas que contengan. En este tipo de moléculas aparecen enlaces conjugados, estos enlaces pueden ser excitados por la luz o la



temperatura, por ello, estas moléculas están relacionadas con la recepción de estímulos lumínicos o químicos.<sup>(24)</sup> Un grupo importante de lípidos insaponificables son los terpenos.

**TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE TERPENOS**

<b>Clasificación</b>	<b>No. de isoprenos que componen la molécula</b>	<b>Función</b>	<b>Ejemplo</b>
Monoterpenos	2	Aromas y esencias en plantas	Geraniol, mentol
Sesquiterpenos	3	Intermediario, en la síntesis del colesterol	Farnesol
Diterpenos	4	Forman pigmentos y vitaminas.	Clorofila, vitaminas A, E
Triterpenos	6	Intermediario en la síntesis del colesterol.	Escualeno
Tetraterpenos	8	Pigmentos vegetales	Carotenos y xantófilas



---

Politerpenos

n

Aislantes

Látex, caucho

---

**Esteroides:** Derivan del estereo o ciclo pentanoperhidrofenantreno.

El colesterol es el esteroide más abundante en los humanos, y también el más importante, porque todos los demás se originan a partir de él.

**Prostaglandinas:** Son ácidos carboxílicos con 20 carbonos y contienen un anillo de ciclopentano. Tienen grupos hidroxilo en C-11 y C-15

Sustancias potentes en extremo, que ejercen sus efectos fisiológicos en concentraciones muy bajas. Actúan en la coagulación de la sangre, causan dolor e inflamación cuando hay traumatismos, son responsables de la fiebre, regulan la presión sanguínea, reducen la secreción de jugos gástricos y regulan el trabajo del aparato reproductor femenino al iniciarse al parto.

#### 4.3.-FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS

En los vegetales se encuentran diferentes tipos de lípidos con diversas funciones:

- 1.- Función estructural formando parte de estructuras celulares: fosfolípidos, glucolípidos, céridos, esteroides y esfingolípidos.
- 2.-Función del revestimiento: ceras y cutícula.
- 3.- Función de reserva como fuente de energía del vegetal: ácidos grasos y grasas.

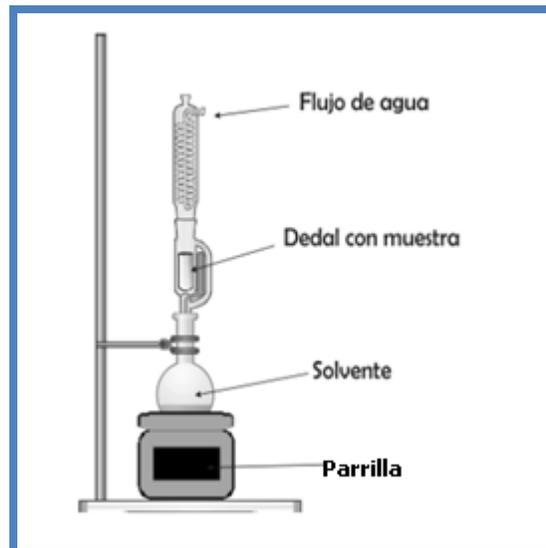


Los lípidos almacenados en el tejido funcionan como fuentes de energía. Actúan como aislantes y amortiguador de choques de órganos vitales. Asociados con proteínas forman lipoproteínas, importantes componentes de las membranas celulares. Protegen, lubrican y en algunos casos decoran la capa exterior de hojas, y de frutas. <sup>(1, 2, 4)</sup>

#### 4.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES Y GRASAS.

La extracción Soxhlet es una técnica de separación sólido-líquido en continuo, empleando un disolvente, con posterior evaporación de este para la recuperación final del residuo. Esta técnica es comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza.

La extracción continua empleando equipo Soxhlet ha sido el método estándar de extracción más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. <sup>(9,10)</sup>



**Fig 4. Dispositivo de extracción Soxhlet**



## 4.5.. ANÁLISIS DE LÍPIDOS

Las características analíticas de mayor importancia para los lípidos son, entre otros: índice de refracción, índice de yodo, índice de saponificación

### 4.5.1. ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

El índice de refracción (IR) es una determinación sencilla y rápida que permite identificar un compuesto ó detectar adulteraciones por comparación con el índice de refracción del aceite ó ácido graso patrón puro.

El índice de refracción de un aceite se define como la razón de la velocidad de la luz en el aire con respecto a la velocidad de la luz en el aceite evaluado. El índice de refracción es característico dentro de ciertos límites para cada aceite, por lo que es un indicador de pureza del aceite.

El índice de refracción se ve afectado por la temperatura, al aumentar la temperatura baja dicho índice. Los ácidos grasos libres presentes también abaten el IR.

Para los aceites la determinación se hace a 25°C. Si la temperatura es mayor de 25 °C, se suma un factor de 0.000385, y este se resta si la temperatura es menor de 25°C.

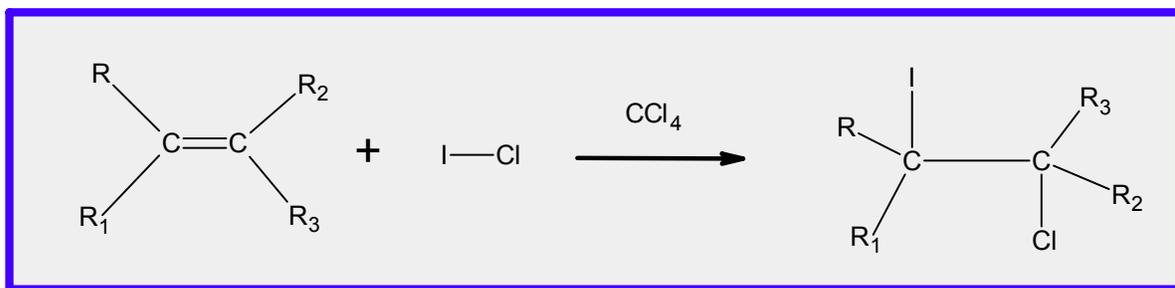
El IR está relacionado con el grado de insaturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces, y puede estar influenciado por el daño que sufre un aceite tras la oxidación.



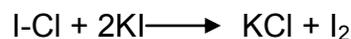
#### 4.5.2. ÍNDICE DE YODO (MÉTODO DE WIJS)

El valor del índice de yodo de un aceite es una medida de su grado de insaturación, puesto que mide el contenido de dobles enlaces capaces de reaccionar con el reactivo empleado. También expresa concentraciones de ácidos grasos insaturados, en un solo número por lo que es un parámetro de calidad muy sencillo y útil. El método de Wijs emplea una solución de cloruro de yodo (ICl) que se adiciona a las dobles ligaduras.<sup>(8)</sup>

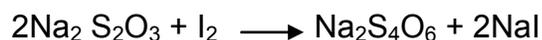
#### REACCIÓN:



El índice de yodo se define como el número de gramos de yodo absorbidos por 100 mg de aceite o grasa. El yodo liberado se cuantifica con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio usando una solución de almidón como indicador. El excedente de ICl se hace reaccionar con KI, la reacción efectuada es la siguiente:



El tiosulfato de sodio reacciona con el yodo de la siguiente forma:





El punto final se registra por la desaparición del complejo azul de yodo con el almidón. Esta determinación es quizá el mejor método para clasificar los aceites, pues permanece casi inalterable por ligeros cambios en el estado de estos, además, permite caracterizar a la muestra, dando una base para saber si es pura o se encuentra mezclada.

### **Cálculo del índice de yodo**

El índice de yodo de se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{ÍNDICE DE YODO} = \frac{100 \cdot (T_2 - T_1) \cdot M \cdot 127}{W}$$

Donde T1 es el volumen de tiosulfato de sodio consumidos en la titulación del aceite o grasa tratado, T2 es el volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación de la solución de reactivo Wijs, M es la molaridad del tiosulfato, W es la masa del aceite o grasa en gramos

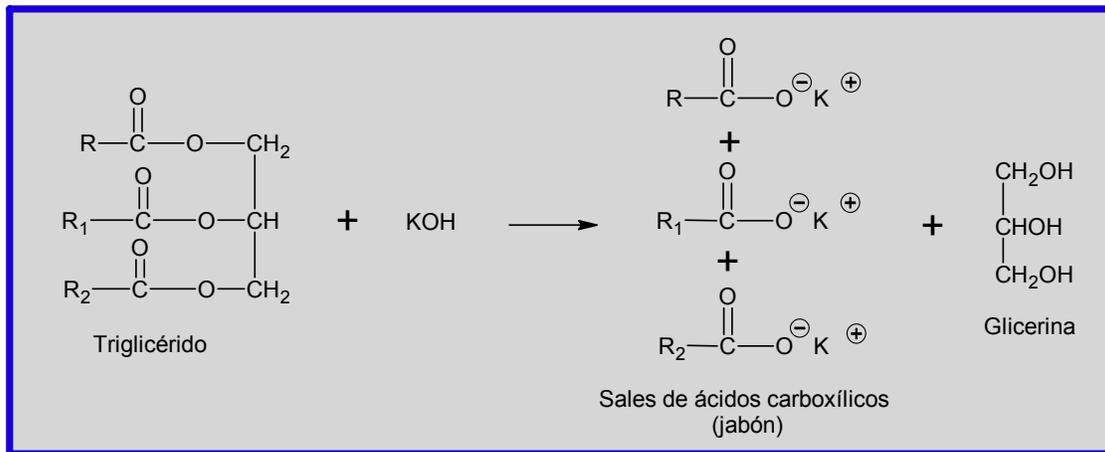
### **4.5.3 DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN**

Representa el número de mg de KOH necesario para saponificar 1g de grasa en condiciones específicas. Es un dato específico de cada grasa y/o aceite natural y es una medida del peso molecular promedio del glicérido.

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{\text{mg de KOH}}{\text{g de grasa}}$$



## REACCIÓN:



El índice de saponificación se puede calcular mediante una valoración volumétrica por retroceso, para lo cual se lleva a cabo la saponificación de una muestra grasa o aceite, se titula el KOH remanente con una solución estándar de HCl.

El índice de saponificación se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$I.S = \frac{N * PM * (V_2 - V_1)}{M}$$

N = normalidad de la solución de HCl

PM = Peso molecular de la base utilizada.

V<sub>1</sub> = volumen (L) de HCl utilizado en la titulación del KOH remanente de la saponificación.

V<sub>2</sub> = volumen (L) de HCl utilizado en la titulación del blanco.

m = masa del aceite en gramos.



#### 4.5.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Para la caracterización de aceites, en la actualidad se utiliza la técnica de cromatografía de gases, con la cual es posible conocer el porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes.

#### CROMATOGRAFÍA

La **cromatografía** es un método físico de separación en el cual los componentes de la mezcla, se distribuyen entre dos fases, una sólida o líquida dispuesta sobre un soporte de gran área superficial, conocida como fase estacionaria, y otra fase que es un fluido que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, que se utiliza como portador de la mezcla y que pasa a través de la fase estacionaria, esta fase se conoce como fase móvil. Los componentes son separados por su diferente velocidad de migración (IUPAC). La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base a la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: **analítica**, utilizada para determinar los compuestos presentes en una mezcla y su concentración; y **preparativa**, utilizada para separar cantidades grandes de mezclas.

**CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).** Es una técnica de separación que ha revolucionado la química analítica. En la cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un gas inerte, que funciona como fase móvil, a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito a través de la columna. Hay dos clases de cromatografía de gases: **cromatografía gas-sólido (de adsorción)** y **cromatografía gas-líquido (de partición)**. De ellas, la más importante es la cromatografía gas-líquido, usada en la forma de una columna capilar.



La **cromatografía gas-sólido** consiste en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de adsorción física. La cromatografía gas-sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas polares y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular.

**Cromatografía gas-liquido.** El concepto de cromatografía gas-liquido fue enunciada por primera vez en 1941 por Martin y Synge, quienes fueron también los responsables del desarrollo de la cromatografía de distribución líquido-líquido. Se fundamenta en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte

La **cromatografía de gases (CG)** se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. La cromatografía de gases (CG) proporciona información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Los componentes son separados por sus diferencias de partición entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria en la columna.

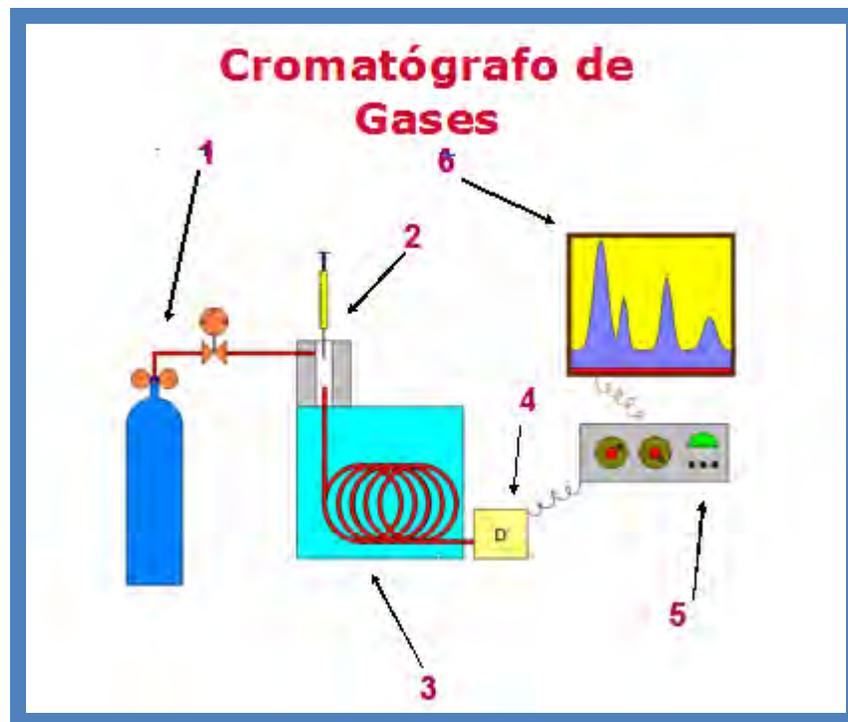
Un cromatografo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para:

- 1.- Proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil)
- 2.- Permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye
- 3.- Contener la longitud apropiada de fase estacionaria



- 4.- Mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura).
- 5.- Detectar los componentes de la muestra conforme se eluyen de la columna.
- 6.- Proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente.

Los módulos se muestran en la siguiente figura:



- 1.- Reservorio de gas y controles de presión
- 2.- Inyector (vaporizador) de muestra.
- 3.- Columna cromatográfica y horno.
- 4.- Detector.
- 5.- Electrónica de tratamiento (amplificación) de señal.
- 6.- Registro de señal.

**Fig. 5. Módulos de un cromatografo de gases**



## Aplicaciones de la cromatografía de gases en análisis de aceites.

Las principales aplicaciones de la cromatografía de gases en aceites, se centran en la determinación de la fracción de ácidos grasos y sus derivados, así como de la fracción insaponificable.

Los ácidos grasos libres suelen analizarse por CG en forma de ésteres volátiles, por lo general, ésteres metílicos.

Empleando columnas capilares de gran longitud se pueden identificar de forma adecuada los ácidos grasos en función del número de átomos de carbono y de insaturaciones, e incluso se pueden llegar a separar isómeros geométricos y de posición de dobles enlaces, es decir, se pueden determinar los ácidos grasos cis y trans.

Mediante CG puede establecerse el contenido de ácidos grasos totales, así como determinar cuales esterifican las diferentes posiciones del glicerol en los triglicéridos. Estas determinaciones resultan de gran utilidad, ya que la composición de ácidos grasos de los triglicéridos es característica de los distintos tipos o variedades de aceites, y por otra parte, puede detectarse cualquier alteración en un aceite, ya sea con fines fraudulentos o a causa de la propia manipulación industrial, que afecte a su composición.

Este tipo de análisis requiere tres etapas previas a la separación cromatográfica:

- 1.- Hidrólisis química de los triglicéridos determinándose el total de los ácidos grasos.
- 2.- Hidrólisis enzimática con lipasa pancreática para conocer el porcentaje de ácidos grasos en posición  $\beta$  del glicerol, y por diferencia los de la posición  $\alpha$ .



3.- Hidrólisis enzimática con fosfolipasa que permite conocer los ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 del triglicérido.

Los ácidos grasos aislados se determinan, al igual que los libres, previa esterificación con metanol, por cromatografía de gases.

## **Espectroscopía infrarroja (IR)**

### **Fundamento:**

La absorción de radiación en la región infrarroja del espectro electromagnético produce cambios en la energía vibracional de las moléculas.

Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en su momento dipolar. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga de los átomos que forman la molécula y por la distancia entre ellos. Dado que las moléculas vibran, se producirá una fluctuación regular del momento dipolar lo que origina un campo que puede interactuar con el campo eléctrico asociado a la radiación IR. Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular; como consecuencia se absorbe la radiación. De manera análoga, la rotación de moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa produce una fluctuación dipolar periódica que puede interactuar con la radiación.

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), se basa en interferometría y hace uso del espectro completo de la fuente en lugar de las longitudes de onda individuales que se usan en la espectroscopia IR convencional. La espectroscopía FTIR tiene grandes ventajas respecto a la relación señal-ruido y la posibilidad de detección de todas las frecuencias simultáneamente, reduciéndose así el tiempo de análisis sin pérdida de resolución.



---

Se han desarrollado metodologías de FTIR para la determinación cuantitativa rápida de ácidos grasos libres, utilizando como dispositivo de muestreo tanto celdas de transmisión como reflectancia total atenuada (ATR). Estos métodos son rápidos, poco contaminantes y pueden aplicarse a muestras de diferente categoría.



## V. CAPÍTULO

### MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LOS COMPUESTOS POLARES PRESENTES.

#### 5.1. IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS

Hay dos tipos de reacciones de identificación, las generales, destinadas a detectar la presencia de todos los azúcares, y las específicas de determinados azúcares.

Los carbohidratos son compuestos orgánicos formados por carbono, hidrogeno, y oxígeno. Estos forman parte e intervienen en una gran cantidad de procesos de los seres vivos. Los más importantes son de tres tipos: energéticos, de reserva y estructurales. La glucosa constituye el material de más rápido aprovechamiento en el organismo y su oxidación satisface necesidades energéticas. <sup>(1,7,8)</sup> Como materiales de reserva, los carbohidratos existen en el reino vegetal en forma de almidones y en el reino animal en forma de glucógenos; tanto uno como el otro son susceptibles de convertirse en glucosa para poder ser utilizados. Los carbohidratos son componentes estructurales de las paredes de las células vegetales de plantas y árboles. La información genética se guarda y transfiere a través de los ácidos nucleicos especializados de los carbohidratos.

Algunos azucares tienen la propiedad de oxidarse en presencia de agentes oxidantes como el ion  $\text{Fe}^{3+}$  o el  $\text{Cu}^{2+}$ . Esta característica radica en la presencia de un grupo carbonilo-aldehídico, el cual es oxidado y genera un grupo carboxilo, son carbohidratos llamados azúcares reductores y aquellos en los que el grupo carbonilo se encuentra combinado en unión glicosídica, se conocen como azucares no reductores. Existen varias reacciones químicas que permiten determinar si se está en presencia de un azúcar reductor o no



## 5.2. Pruebas de Fehling y Benedict para determinar azúcares reductores.

Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos (excepto la sacarosa), son azúcares reductores en medio alcalino, reducen con facilidad a agentes oxidantes suaves como los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Ag}^+$ . Estas reacciones constituyen las bases de las pruebas de Fehling y Benedict, que permiten identificar la presencia de azúcares reductores en un material biológico, y han sido frecuentemente utilizadas en la determinación del contenido de glucosa en sangre y orina para el diagnóstico de la diabetes mellitus.

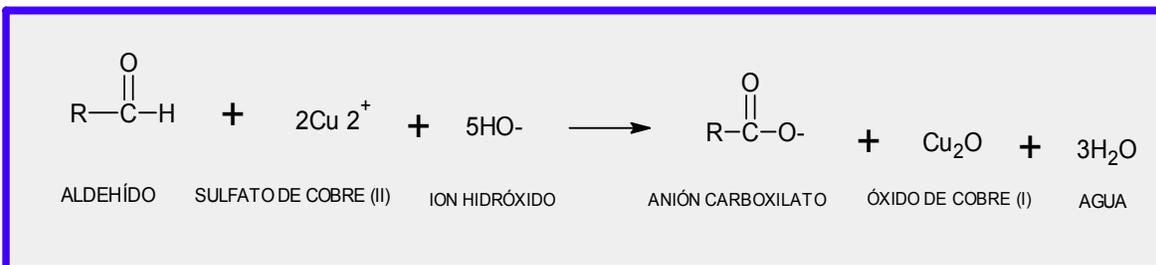
Si el azúcar es reductor se oxida al reaccionar con el reactivo de Fehling, que es un complejo de tartrato y sulfato de cobre (II), el carbono carbonílico se oxida a ácido carboxílico, que en el medio alcalino se transforma a carboxilato; mientras que el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) se reduce a ion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ), que precipita de la disolución en forma de óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) de color rojo ladrillo.

### Reacción de Benedict

Una solución de sulfato de cobre (II) en forma de su complejo con citrato de sodio en medio básico (**reactivo de Benedict**), oxida al grupo carbonilo libre (generalmente de un aldehído) para formar el ácido carboxílico correspondiente en forma de sal (carboxilato).



## REACCIÓN:



La formación de un precipitado rojo de óxido de cobre (I), debido a la reducción de cobre (II), se toma como resultado positivo en el análisis de un aldehído. Los carbohidratos que dan positivo con el reactivo de Benedict se llaman **azúcares reductores**.<sup>(1, 7,8)</sup>

El reactivo de Benedict contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para conferir el pH alcalino necesario para que la reacción pueda llevarse a cabo. El citrato de sodio forma con el  $\text{Cu}^{2+}$  un complejo de color azul. Si se le agrega al reactivo una solución de azúcar reductor y se calienta hasta llevar la mezcla a ebullición, el azúcar en la solución alcalina a elevadas temperaturas reaccionará con el  $\text{Cu}^{2+}$ ; se obtiene entonces un azúcar oxidado y el óxido de  $\text{Cu}^{1+}$ .

### Reacción de Fehling

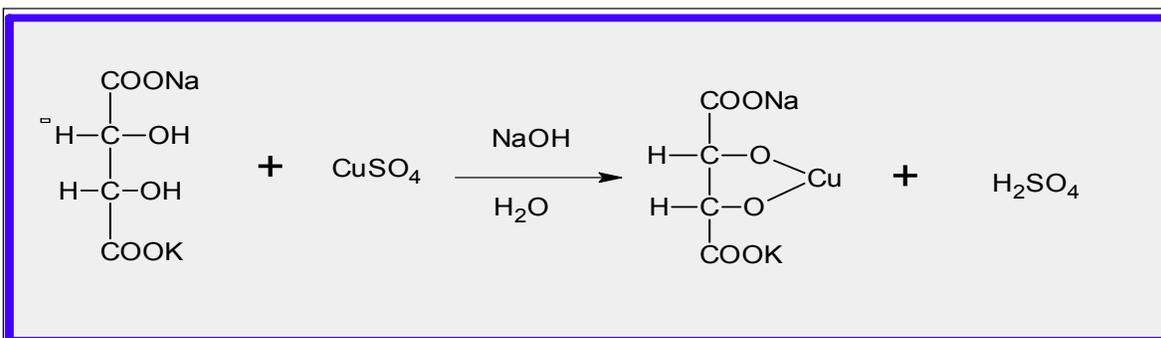
Las aldosas reaccionan con el reactivo de Fehling ( $\text{Cu}^{2+}$  en tartrato de sodio acuoso).

El reactivo de Fehling consiste en dos soluciones acuosas:

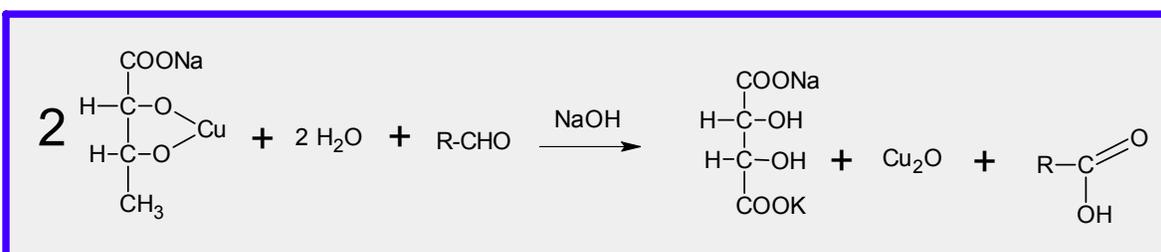
Fehling A:  $\text{CuSO}_4$  disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$

Fehling B:  $\text{NaOH}$  y tartrato de sodio, potasio en agua.

Cuando se mezclan las dos soluciones, se obtiene un complejo cúprico tartárico en medio alcalino, de color azul, de la siguiente manera:



Este ensayo se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Este se oxida a ácido carboxílico y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que formara un precipitado de color rojo.



### 5.2.1. REACCIÓN DE MÖLISH

**Esta es una prueba cualitativa para todo tipo de azúcares. Es la reacción universal para todo tipo de carbohidrato.** La reacción se basa en la acción hidrolizante y deshidratante del ácido sulfúrico sobre los hidratos de carbono. En dicha reacción, el ácido sulfúrico cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de la muestra, y la deshidratación a furfural (en las pentosas) a hidroxifurfural (en las hexosas). Estos furfurales se condensan con el  $\alpha$ -naftol del reactivo de Mölish, dando complejos de un color intenso.



## REACCIÓN:

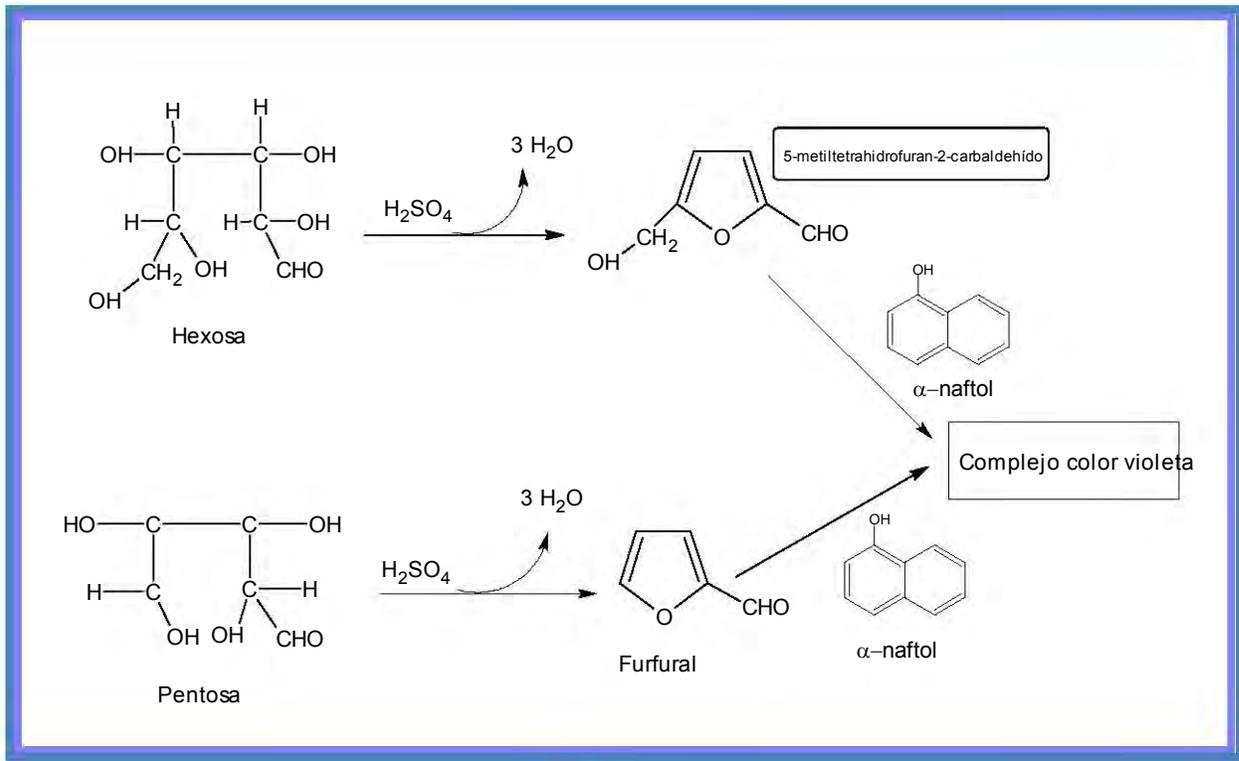


Fig. 5. Reacción de Mölish.



### 5.3. FENOLES

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Existe un interés creciente en los compuestos fenolicos debido a sus propiedades antioxidantes lo cual permite que protejan contra algunas enfermedades, como ciertos canceres y desordenes cardiacos.

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captores de radicales libres, neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno y iones metálicos. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinados con un ácido orgánico, un azúcar, o bien, con ellos mismos para formar polímeros.<sup>(1,7,9)</sup>

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

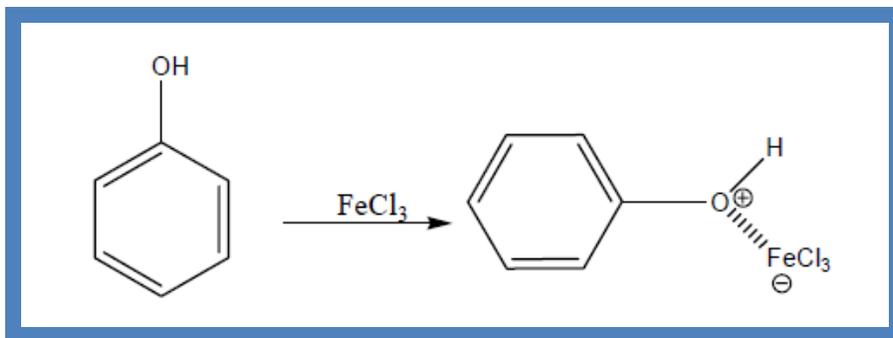
- **Como captadores de radicales libres.** Los compuestos fenolicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres.
- **Como quelantes de metales.** Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilo cercano en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton.



Sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad antioxidantes de los compuestos fenólicos. El número y posición de grupos hidroxilo, la presencia de azúcares unidos y el grado de polimerización determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno.

### 5.3.1. METODO DE IDENTIFICACIÓN DE FENOLES.

Una prueba cualitativa de identificación de fenoles se lleva a cabo con el reactivo cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 1%, la reacción producida es la siguiente:



Esta se considera positiva cuando la reacción entre la muestra y el reactivo da una coloración que va desde púrpura a morada.

### 5.4. CUANTIFICACION DE FENOLES TOTALES

La cantidad de fenoles totales se puede determinar espectroscópicamente con el método de Folin-Ciocalteu, donde se emplea una curva patrón de ácido gálico, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Mediante este método se puede calcular el contenido de fenoles totales en la muestra estudiada.



El método de Folin-ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico() La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula



# VI. CAPÍTULO

## PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE LA SEMILLA DEL CODO DE FRAILE (*Thevetia thevetioides*)

#### 6.1.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (semillas) utilizado en el presente estudio fue obtenido en el Mercado de Sonora en la Ciudad de México, en donde el proveedor informó que provenía del estado de Guerrero.

Las semillas que se utilizaron fueron separadas de la cáscara; posteriormente se molieron utilizando un molino eléctrico, el granulado obtenido se utilizó para las extracciones a realizar.



Figura 7.- Semilla de codo de fraile.

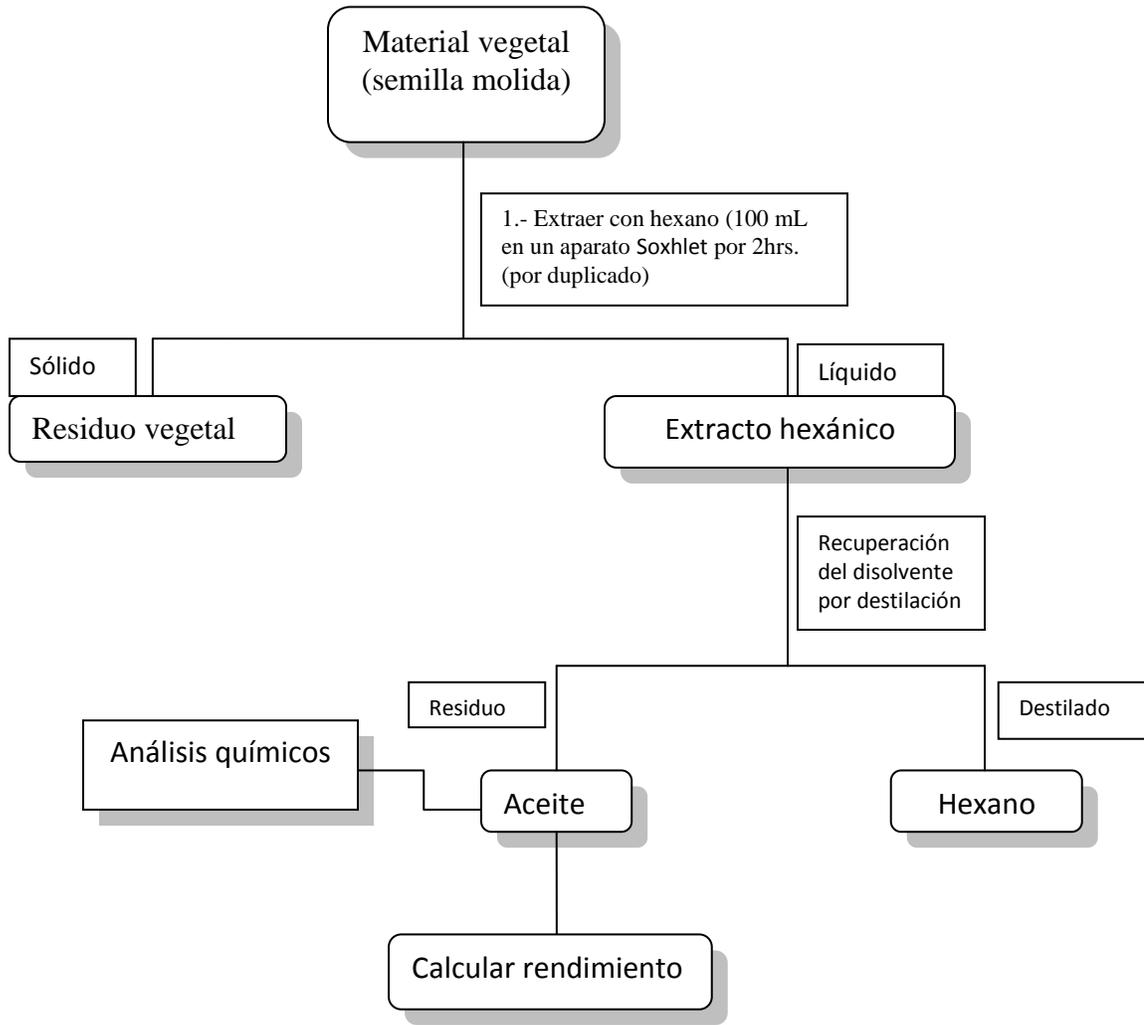


### 6.1.2. Extracción del aceite

Se pesaron 33.1 g de las semillas molidas, se colocaron en un cartucho de papel filtro (10 X 10 cm). Se montó el aparato Soxhlet, se utilizó hexano como disolvente y se mantuvo la extracción continua durante dos horas.

En el diagrama 1 se describe el procedimiento empleado.

Se recuperó el hexano por destilación, evitando llevar a sequedad para proteger el aceite obtenido. El extracto se trasvasó a un vaso de precipitados previamente pesado y se colocó en la campana para la eliminación completa del disolvente; de esta manera se obtuvo el extracto concentrado. Se calculó el rendimiento. Se guardó el aceite en un frasco ámbar y posteriormente se realizaron las pruebas correspondientes.



**Diagrama 1.** Proceso de extracción del aceite de la semilla de **Thevetia thevetioides**



## Cálculo del rendimiento de la extracción del aceite.

Se obtuvieron 13.25 g de aceite con un rendimiento total de 40.03 %.

### Cálculo:

$$33.1 \text{ g} \text{-----} 100 \%$$

$$13.25 \text{ g} \text{-----} X$$

$$X = 40.03 \%$$

## 6.2. CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

### 6.2.1. INDICE DE REFRACCIÓN

Se empleó un refractómetro de campo, adecuadamente calibrado.

Se anotaron los siguientes datos: Índice de refracción, temperatura de la muestra y tipo de muestra.

#### RESULTADO:

TIPO DE MUESTRA	TEMPERATURA (°C )	ÍNDICE DE REFRACCIÓN
Aceite	23.3	1.469/ 71.2%

El índice de refracción del aceite (1.469), se comparó con el de algunos aceites reportados en la literatura como son: oliva, algodón, cacahuate, girasol, pepita de uva, etc., el índice de refracción del aceite de Thevetia thevetiodes se encuentra dentro del rango de dichos aceites.



## 6.2.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO

### Método de Wijs para la determinación de índice de yodo

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de aceite dentro de un matraz de yodo, el peso exacto se indicará en el cálculo del índice de yodo. Se agregaron 10 mL de  $\text{CCl}_4$  y 10 mL del reactivo de Wijs, se mezcló y se dejó reposar en la oscuridad por 30 min, después de ese tiempo, se agregaron 10 mL de una disolución de yoduro de potasio y 100 mL de agua destilada y se mezcló.

Posteriormente se tituló el yodo liberado, con una disolución valorada de tiosulfato de sodio 0.1M, agregando unas gotas de disolución de almidón como indicador. La mezcla se tornara amarillo pálido. Al volumen de tiosulfato de sodio empleado en la titulación se le llama  $T_1$ ,

Se llevó a cabo el procedimiento por duplicado asimismo, se tituló el reactivo de Wijs con la disolución valorada de tiosulfato de sodio 0.1 M, sin añadir aceite, por lo que no fue necesario dejar reposar en la oscuridad; al volumen de tiosulfato empleado en esta titulación se le llama  $T_2$ , y se emplea en el cálculo del índice de yodo.

**Fórmula para determinar índice de yodo:**

$$\text{Índice de yodo} = \frac{100 (T_2 - T_1) (M) (127)}{m}$$



Los resultados fueron los siguientes:

Muestra	Muestra (g) (m)	Volumen de Tiosulfato gastado 0.1 M (mL)	ÍNDICE DE YODO
Blanco	-----	14.2 (T <sub>1</sub> )	
1	0.2123	2.0 (T <sub>2</sub> )	72.98
2	0.2100	2.7 (T <sub>2</sub> )	69.55
Promedio			<b>71.265</b>

#### Cálculo para la muestra 1:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{100 (14.2 - 2.0) (0.1 \text{ M}) (127)}{0.2123} = 72.98$$

El promedio del índice de yodo fue de 71.265, para el aceite de la semilla codo de fraile. Este índice se explica por la alta saturación del aceite, pues se observa que tiene una gran cantidad de ácidos grasos saturados como es el ácido palmítico, esteárico y butírico. Los anterior se confirmó con los resultados del análisis de la composición de ácidos grasos que se realizó por cromatografía de gases.

#### 6.2.3. DETERMINACION DEL INDICE DE SAPONIFICACIÓN.

De acuerdo a la técnica general, se pesaron aproximadamente 0.5 g del aceite obtenido y se colocaron en un matraz de bola, se adicionaron 12.5 ml de disolución de KOH al 0.5 M, para obtener las sales de sodio de los ácidos grasos presentes. Se calentó a reflujo hasta que ya no se observaran gotas de aceite, lo cual indicó que la reacción estaba concluida.



Posteriormente, a la mezcla de reacción se le adicionaron gotas de fenolftaleína al 0.1 % como indicador, y se tituló en caliente el exceso de álcali con una disolución de HCl 0.5N.

Se dejó enfriar y se recuperó de la parte sobrenadante, el jabón.

Se calculó el índice de saponificación de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I.S = \frac{\text{mg KOH}}{\text{gr. grasa}}$$

Los resultados fueron los siguientes:

MUESTRA	Peso del aceite (g.)	Vol. de KOH 0.5M (mL)	Vol. gastado de HCl 0.5N (mL)	Índice de saponificación
Blanco	-----	12.5	10.65	-----
M1	0.5042	12.5	6.7	219.36
M2	0.5061	12.5	6.9	207.47
Promedio				<b>213.41</b>



### Ejemplo de cálculo para una determinación:

$$10.65 - 6.7 = 3.95 \text{ mL de HCl } 0.5 \text{ N}$$

$$3.95 \text{ mL HCl} \left[ \frac{0.5 \text{ mol HCl}}{1000 \text{ mL}} \right] \left[ \frac{1 \text{ mol KOH}}{1 \text{ mol HCl}} \right] \left[ \frac{56 \text{ g KOH}}{1 \text{ mol KOH}} \right] = 0.1106$$

$$0.1106 \text{ g KOH} \left[ \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right] = 110.6 \text{ mg KOH}$$

$$\text{I.S} = \frac{\text{KOH mg KOH}}{\text{gr. grasa}} = \frac{110.6 \text{ mg}}{0.5042 \text{ g}} = 219.36 \text{ mg KOH/ gr. grasa}$$

Se obtuvo un promedio de 213.415 mg KOH/gr. Grasa. El I. S está relacionado con el peso molecular medio de la grasa.

#### 6.2.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Se realizó el análisis de composición del aceite de la semilla *Thevetia thevetioides* mediante la técnica de cromatografía de gases.

El análisis fue realizado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química, UNAM.

Se realizaron en una muestra de aceite obtenida por extracción con hexano.

Los resultados del análisis de la composición de los ácidos grasos del aceite de la semilla de codo de fraile (*Thevetia thevetioides*) fueron los siguientes:



COMPONENTE	No. CARBONOS	No. DE INSATURACIONES	(%) DE ACIDOS GRASOS
ACIDO PALMITICO	C-16	0	30.26
ACIDO ESTEARICO	C-18	0	14.5
ACIDO BUTIRICO	C-4	0	20.95
ACIDO OLEICO	C-18	1	10.1

Es importante hacer notar que se tiene un porcentaje del 65.71% de ácidos grasos saturados y un 10.1% de ácidos grasos insaturados (ácido oleico).

El contenido total de ácidos grasos es de 75.81 %, lo cual deja, como parte insaponificable un 24.19%, que hace particularmente interesante continuar el estudio del aceite.

### 6.3. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLARES

Después de haber extraído el aceite, se dejó en el aparato soxhlet mismo cartucho de papel filtro que contenía el material de codo de fraile desengrasado. Se efectuó una extracción continúa empleando metanol como disolvente. Una vez obtenido el extracto, se procedió a destilar la mayor parte del metanol para recuperarlo y, como en el caso del hexano, la última porción se trasvasó a un vaso de precipitados previamente tarado, y se evaporó a sequedad, obteniéndose 1.4 g de extracto polar. Se calculó el rendimiento que fue: 5.10 %.

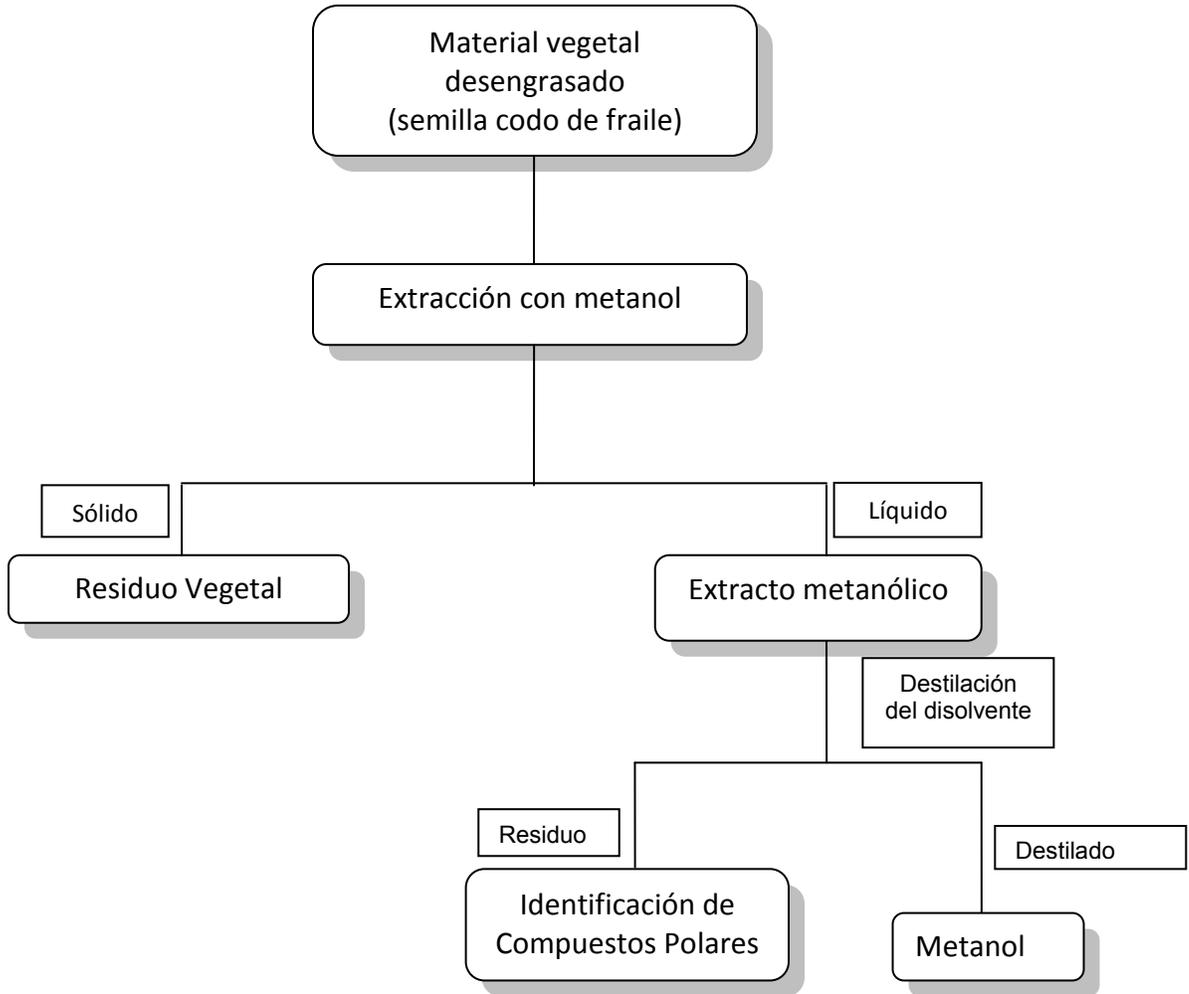
#### Rendimiento:

27.3 g-----100 %

1.40 g----- X            X= 5.10 %



El procedimiento efectuado se describe en el **diagrama 2**



**Diagrama 2.-** Proceso de extracción de compuestos polares de la semilla Codo de Fraile (*Thevetia thevetioides*).



## 6.4. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

### ➤ Prueba de Benedict.

Se colocó en tubo de vidrio 1 mL de la solución de Benedict (complejo cúprico con ion citrato) y se agregó 0.5 g de la muestra, se calentó a ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se considera prueba positiva cuando hay decoloración de la disolución y formación de un precipitado de color rojo ladrillo.

### Resultado:

Prueba positiva, hubo un cambio de color azul a incolora y la precipitación de  $\text{Cu}_2\text{O}$  de color rojo ladrillo.

### ➤ Reacción de Mölish

Se pesaron aproximadamente 0.5 g del compuesto, se disolvieron en 3 ml de agua destilada, posteriormente se adicionó 1ml de solución de  $\alpha$ -naftol, y por último se agregó de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Se considera una prueba positiva si se observa una coloración violeta en la interfase.

Se utilizó un estándar de sacarosa como control positivo.

### Resultado:

La prueba es positiva, ya que presento en la interfase un anillo de color violeta.

## 6.5. Identificación de Fenoles (cualitativa):

Esta técnica se llevó a cabo con el reactivo cloruro férrico al 1%, en la semilla previamente molida. La prueba se considera positiva cuando la reacción entre la muestra y el reactivo da un color azul o verde intenso.



### **Resultado:**

La prueba es positiva ya que presentó una coloración azul.

## **6.6. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES**

Para la cuantificación de fenoles totales se empleó el extracto metanólico obtenido mediante la extracción soxhlet de la semilla.

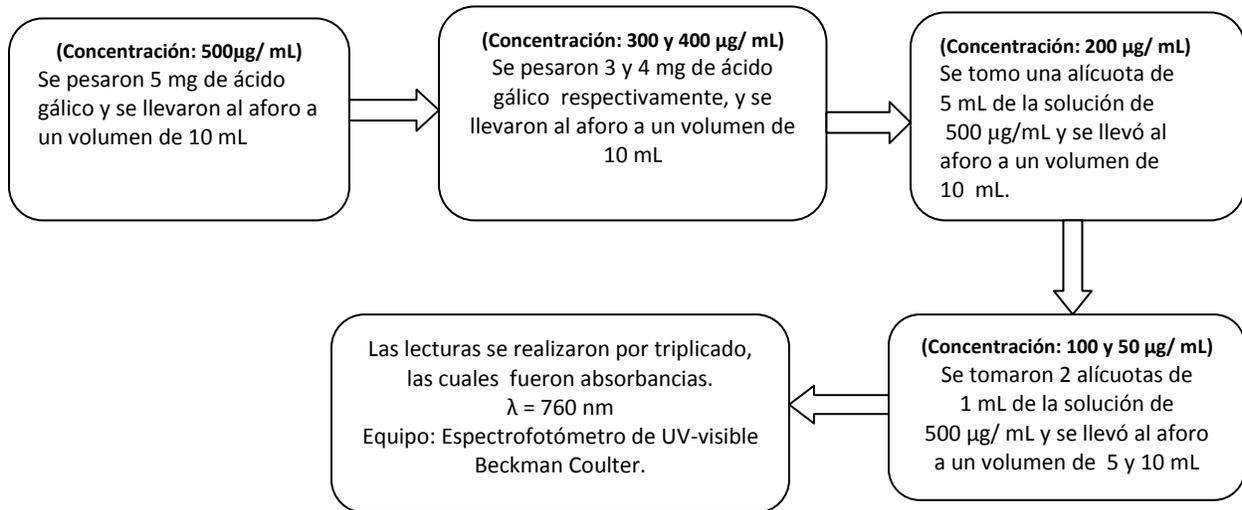
Para la extracción de fenoles se utilizan disolventes polares, cuyo extracto posteriormente se concentra. Para este ensayo se trabajó con el extracto metanólico obtenido.

La cantidad de fenoles totales fue determinada espectroscópicamente por la prueba de Folin-Ciocalteu, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante, y una curva patrón de ácido galico. Que se basa en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción.



### 6.6.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se utiliza en soluciones estándar de ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 50 a 500  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/ mL de agua, la longitud de onda con la que se trabajo fue de 760nm. El procedimiento de cuantificación se muestra en el **diagrama 3**:

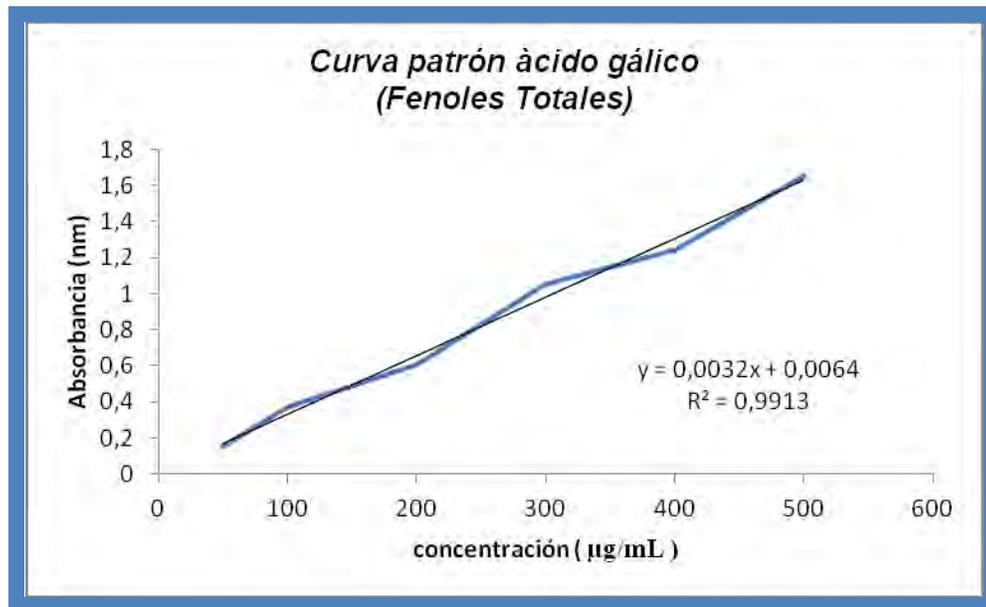


La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la fig. 7. Los resultados presentados en la tabla 3, muestran las absorbancias de cada una de las soluciones estándar que se utilizaron para realizar la curva patrón.



**Tabla 3. Resultados curva de calibración de ácido gálico**

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>Blanco</b>	0	0	0	0
<b>50</b>	0.161	0.124	0.166	0.150
<b>100</b>	0.359	0.366	0.391	0.372
<b>200</b>	0.606	0.61	0.6	0.605
<b>300</b>	1.059	1.036	1.056	1.050
<b>400</b>	1.247	1.249	1.23	1.242
<b>500</b>	1.6	1.672	1.691	1.654



**Fig 8. Curva de calibración utilizando ác. gálico como estándar a 760 nm.**



Para obtener las concentraciones de fenoles totales en las muestras, se extrapolaron en la curva patrón resultados de las absorbancias obtenidas de la muestra.

Los resultados de fenoles totales son los siguientes:

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0.061	19.0561
2	0.045	14.0561
Promedio		16.5561

La ecuación de la recta de la curva patrón fue:

$$y = 0.0032x + 0.0064$$

$$R^2 = 0.9913$$

Con la que se realizaron los cálculos correspondientes para obtener las concentraciones de fenoles totales en las muestras.

El contenido total de fenoles para los extractos metanólico- acuosos de la semilla Codo de Fraile, fue de 16.5561  $\mu\text{g/mL}$

El contenido de compuestos fenólicos fue bajo por lo que la actividad antioxidante será baja también. Esto puede ser un indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pre-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante



## VII. CAPÍTULO

### RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis efectuado a la semilla Codo de Fraile.

Las características fisicoquímicas del aceite obtenido fueron:

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>RESULTADO</b>
Color del aceite	Amarillo claro
Olor del aceite	Sin olor
Consistencia	Ligeramente viscosa
Rendimiento	40.03 %
Índice de refracción	1.469/71.2 %
Índice de yodo	71.265
Índice de saponificación	213.41mg KOH/g.de grasa
Porcentaje de ácidos grasos (%)	Ác. Palmítico: 30.26 % Ác. Esteárico: 14.5 % Ác. Butírico: 20.95 % Ác. Oleico: 10.1 %

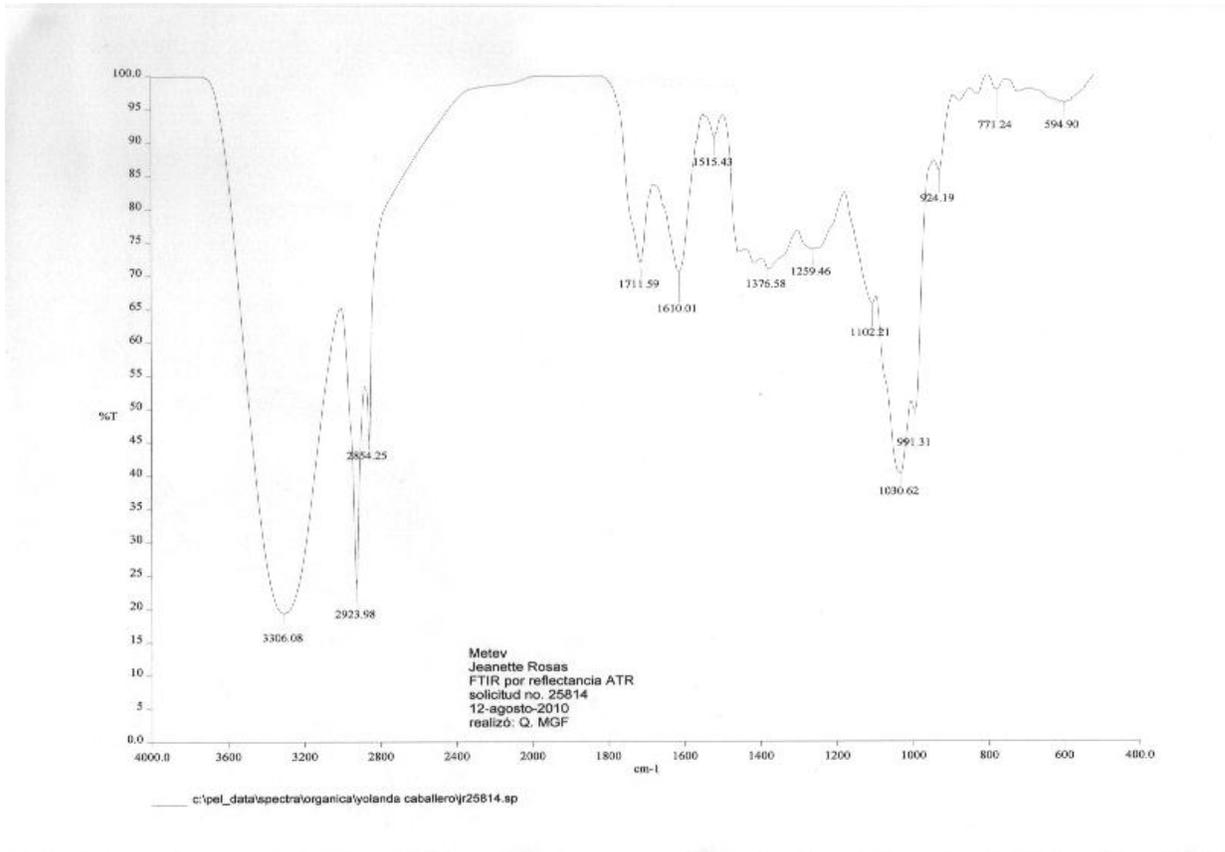


Los resultados para la fracción polar fueron los siguientes:

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>RESULTADO</b>
Rendimiento de la extracción metanólica	5.01 %
Azúcares reductores (prueba cualitativa)	Positiva
Fenoles (prueba cualitativa)	Positiva
Fenoles totales (prueba cuantitativa)	16.5561 µg/mL



## Espectro. 1



En el espectro de infrarrojo del extracto polar (**Espectro.1**) se presenta una banda en  $3306\text{ cm}^{-1}$ , que indica presencia de  $-\text{OH}$ .

Se observan bandas en, 1711, (esta banda se encuentra en la zona de la unión  $\text{C}=\text{O}$ , la cual es perteneciente a un aldehído, cetona, ácido carboxílico y éster.) y otra banda en 1610. Se observan bandas de 2923 y 2854, las indican la presencia de uniones  $\text{C-H}$ , de compuestos saturados e insaturados, como  $-\text{CH}_3$  (metilos) y  $-\text{CH}_2$  (metilenos).



## VIII. *CAPÍTULO*

### CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica y la caracterización experimental de algunos metabolitos que se encuentran en la semilla Codo de Fraile, son de especial interés pues permiten justificar o rechazar el empleo que se ha dado a la semilla.

Se encontró que la semilla contiene un alto porcentaje de aceite (40 %). lo cual hace del codo de fraile una materia prima adecuada para la producción de jabones.

La determinación cuantitativa de los ácidos grasos presentes en la fracción lípida de la semilla, se realizó por cromatografía de gases y se encontró que esta contiene un alto porcentaje de ácidos grasos saturados (~ 66 %).

Se le realizaron las siguientes determinaciones al aceite: índice de refracción, índice de yodo y análisis cromatográficos, las cuales contribuyen al estudio químico del aceite, ya que estos datos no se habían descrito anteriormente.

Se obtuvo un jabón a partir del aceite, y se determinó por diferencia, la cantidad de material insaponificable presente, cuyo estudio será realizado posteriormente.

En el extracto polar se identificaron cualitativamente carbohidratos reductores.

Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar la cantidad de fenoles presentes en la fracción polar de la semilla.



## RECOMENDACIONES

Debido al alto contenido de aceite encontrado en la semilla codo de fraile, a dicho aceite se le puede dar uso como materia prima para la obtención de jabones, lo cual le daría un valor agregado a dicha semilla.

La semilla se ha empleado como coadyuvante para bajar de peso, este empleo debe ser evitado ya que la semilla contiene glucósidos cardiotónicos que pueden provocar daños graves a la salud, e incluso la muerte.

Si se determina la cantidad de los glucósidos presentes, es probable que puedan ser separados y empleados de acuerdo a sus propiedades farmacológicas



# IX. CAPÍTULO

## ANEXOS

### Índice de Figuras y cuadros

Figura	Título	Página
1	Thevetia thevetioides	6
2	Distribución geográfica de la especie Thevetia thevetioides (H.B.K)	9
3	Estructura de ácidos grasos	20
4	Dispositivo de extracción soxhlet	24
5	Reacción colorida de mölish	26
6	Módulos de cromatografo de gases	31
7	Semilla Codo de Fraile	43
8	Curva de calibración de fenoles totales	56
<b>Cuadros</b>		
1	Metabolitos aislados de Thevetia thevetioides	10-11
2	Clasificación de lípidos	15

### Índice de Diagramas.

Diagrama	Título	Página
1	Proceso de extracción del aceite de la semilla Thevetia thevetioides	45
2	Proceso de extracción de compuestos polares de la semilla Codo de Fraile (Thevetia thevetioides)	52
3	Preparación de la curva de calibración de fenoles totales.	55



## Índice de Tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Ejemplos de ácidos grasos saturados e insaturados	17-19
2	Clasificación de terpenos	22, 23
3	Resultados curva de calibración de ácido gálico	60



# X. CAPITULO

## BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

1.-Bruneton, J.; **Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales**, 2<sup>a</sup>.ed; Acribia: España, 2001; pp. 713-740.

2.-Domínguez, X.; **Métodos de Investigación Fitoquímica**, ed. Centro regional de ayuda técnica: México-Buenos Aires, 1973, pp. 281.

3.-Horton, H.; Robert; Moran.; Ochs Raymond S; Rawn, J.; **Bioquímica**, 2<sup>a</sup> ed., Prentice-Hall Hispanoamericana: Buenos Aires, 1995; pp 256-262..

4.-Hart, F.; **Análisis moderno de los alimentos**, 2<sup>a</sup> ed; Acribia: España, 1991 pp 198-200.

5.- <http://gaceta.iztacala.unam.mx/187.pdf> (consultada 29-10-10)

6.-[http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2007\\_09\\_01\\_archive.html](http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2007_09_01_archive.html) (consultada 28-10-10)

7.-<http://www.arbolesornamentales.es/Apocynaceae.htm> (consultada 28-10-10)

8.-[http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2007\\_09\\_01\\_archive.html](http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2007_09_01_archive.html) (consultada 23-11-11)

9.-<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7>  
808  
(consultada 25-11-11)



- 10.-<http://www.arbolesornamentales.es/Apocynaceae.htm> (consultada 29-11-11)
- 11.-<http://www.selectividad.net/cem/apuntesexámenes/apuntes/biologia/lipidos.pdf>  
( consultada 7-12-11)
- 12.-[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng)  
( consultada 29-10-10)
- 13.-<http://www.nmrdb.org> (consultada 15-10-10)
- 14.<http://webdelprofesor.ula.ve/farmacia/gmendez/manuales%20PDF/EXPERIMENTO%204%20IDENT%20CARB%2006-05.pdf> ( consultada 24-11-10)
- 15..<http://almez.pntic.mec.es/~mbam0000/FYQ/paginas/LABORATORIOS/AZUCARES1.htm>.( consultada 7-11-11)
- 16.-Kirk, R.; **Composición y análisis de alimentos de Pearson**, 2<sup>a</sup> ed., Continental SA. de CV: México, 1996.
- 17.- Kuklinski, C.;**Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural**. 2<sup>a</sup> ed; Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 2000.
- 18.-Lampman, G.; Pavia, D. **Química Orgánica Experimental**, 2<sup>a</sup> ed., Universitaria de Barcelona: Eunibar, 1978 pp 152-157.
- 19.-**Manual de laboratorio de análisis de alimentos**, Facultad de Química, UNAM



20.-**Manual de Química Orgánica III**, Reacciones de adición sobre dobles ligaduras determinación del grado de insaturación de un aceite (Técnica de Wjis), Facultad de Química, UNAM.

21.- Matisseek y colaboradores, **Análisis de alimentos, Fundamentos, métodos y Aplicaciones**, ed. Acribia.

22.- PLANTS-THEVETIA. Micromedex Thompson Healthcare. POISINDEX® Managements:1974-2009. Thomson Reuters.

23. - Rojas, M.; **Tratado de Medicina Tradicional Mexicana. Tlahui**, México, 2007.

24.-R. G, Alfonso Gennaro, **Remington. Farmacia Médica**, Tomo 1, 20<sup>a</sup>. Edición. Ed. Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina 2003 pp. Consultadas: 475-480.

25. Torres N.; **Actualización sobre intoxicación con Thevetia peruviana**, Facultad de ciencias médicas UNR. pp.: 1-18

26.- **Técnicas Avanzadas en Química**, Ciencias Ambientales, curso 2004/05.

27.-Wade, L. G., Jr. **Química Orgánica**, 5<sup>a</sup>. Ed.; Pearson Prentice Hall: España, 2004. pp. 1162-1167.

28.-Yurkanis B.; **Química Orgánica**, 5<sup>a</sup>. Ed.; Pearson educación de México, S.A de C.V.: México, 2008, pp.1162-1164.