

1075

61(04)

Estudio Histoquimico Preliminar y Determinaciones
en el Extracto Cereo del Tallo de la Candelilla

TESIS

CIRA PIÑA PEREZ.

MEXICO, D. F.

1967



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

1. *Palmita de mango y blanco* 61 (04)
12. *microfotografías*
1. *Guayacil*
2. *Talpa*

ESTUDIO HISTOQUIMICO PRELIMINAR Y DETERMINACIONES EN
EL EXTRACTO CERVO DEL TALLO DE LA CANDELILLA.

TESIS
que presenta para su exámen profesional
de
QUIMICO-FARMACEUTICO-BIOLOGO
CIRA PIÑA PEREZ.
ante la
Escuela Nacional de Ciencias Químicas
Universidad Nacional Autónoma de México.

INSTITUTO MEXICANO DE INVESTIGACIONES TECNOLOGICAS
Sección de Productos Químicos Vegetales

1957

*A la memoria de mi padre
y a mi madre, con todo cariño.*

*A mi hermano Porfirio,
con cariño y agradecimiento.*

RECONOCIMIENTO

Deseo expresar mi reconocimiento a la Dirección y Técnicos del Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas por la asistencia y facilidades que me fueron brindadas para la realización del presente trabajo.

A la Oficina de Investigaciones Industriales del Banco de México, S. A., por el apoyo otorgado a través de su Sección de Educación y Becas.

I N D I C E .

I. - INTRODUCCION.

II. - CARACTERISTICAS GENERALES DEL VEGETAL.

- a) *Historia*
- b) *Descripción de la planta.*
- c) *Clasificación Botánica.*
- d) *Varietades.*
- e) *Zonas de vegetación.*
- f) *Descripción de las muestras procedentes del Estado de Coahuila.*

III. - PARTE EXPERIMENTAL.

- a) *Estudio Anatómico.*
 - 1) *Preparación de la muestra.*
 - 2) *Observaciones Microscópicas.*
- b) *Estudio Químico.*
 - 1) *Preparación de la muestra.*
 - 2) *Determinación de la humedad.*
 - 3) *Determinaciones Histoquímicas.*
 - 4) *Extracciones sucesivas.*
 - 5) *Determinaciones efectuadas en el extracto céreo.*

IV. - RESULTADOS.

- a) *De la Histoquímica de la cera.*
- b) *De la Histoquímica de la celulosa, lignina y Almidón.*

c) *Datos obtenidos de las extracciones Sucesivas*
(tablas).

V.- DISCUSION DE RESULTADOS.

a) *Del estudio Anatómico.*

b) *Del estudio Químico.*

VI.- CONCLUSIONES.

VII.- APENDICE.

a) *Microfotografías del Estudio Anatómico.*

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

La Cera de Candelilla ha alcanzado una gran importancia en los últimos años, debido a su creciente uso como materia prima, en la Industria de gomas de masticar; así como también en otras industrias, entre las que se encuentra principalmente la de lustreadores*. La mayor parte de esta cera proviene de los plantíos que crecen en el norte de México y el Sur de Texas.

Actualmente se obtiene por procedimientos rudimentarios, los cuales resultan poco eficientes y costosos. El rendimiento apenas si alcanza un 4 a 5% del peso de la planta seca, ocasionando que los costos de producción sean relativamente elevados.

En virtud de esa situación surgió la necesidad de hacer un estudio de la extracción de la cera, con el fin de mejorar o modificar los métodos ya existentes*. A fin de contribuir a ese programa, se hizo el presente trabajo que consiste fundamentalmente en la caracterización de las substancias principales que se encuentran en el tallo, con particular interés en la determinación del contenido de cera en la planta, así como también de su distribución en la misma.

INTRODUCCION

- * *"The Mexican Candelilla Plant and Its Wax" Economy Botany 10, 34-54 Hodge H. N. 1956.*
- ** *"Algunos Datos sobre la Hierba de Candelilla" Servicio de Información Agrícola y Comercial 10, 1956.*

CARACTERISTICAS GENERALES DEL VEGETAL.

(Ver Microfotografías en Apéndice)

a) Historia.

Por el año de 1905, el extinguido Instituto Médico Nacional, actualmente clausurado, inició el estudio de la vara de Candelilla, principiando por plantar un ejemplar, y cuando llegó a la floración procedió a clasificarla el Sr. D. Gabriel Alcocer, dándole el nombre de *Euphorbia cerífera*, nombre con la que es conocida actualmente.

b) Descripción de la planta.

Planta vivaz de cepa grasa, tuberiforme, leñosa; tallos o ramas múltiples, mimbreados, levemente flexuosos; algo subdicótomos, cilíndricos, estrangulados en algunos nudos; lampiños de color verde glauco; tienen de 30 a 45 cm. y a veces 75 a 80 cm. de largo y 5 mm. de diámetro. Hojas caulinares esparcidas y distantes sumamente pequeñas y por lo mismo poco visibles en los tallos tiernos, son caedizas en los tallos adultos y dan a las ramas del vegetal el aspecto de áfilos. Su color es moreno-rojizo-oscuro y llevan diseminados pequeños pelos blancos. Su forma no es común; la lámina colorida casi siempre encorvada o retorcida de base ancha, se es-

trecha en seguida para ensancharse después formando un limbo lineal-lanceolado acuminado de 3, 4 ó 5 mm. de largo por mm. o menos de ancho en su parte media. Esta lámina se articula sobre un peciolo verde, carnoso, hinchado que se funde en el tallo y lateralmente se dilata para sostener las estípulas (rudimentarias) rojizas y vellosas, que parecen 2 puntas coloridas.

"Los ramos llevan en su extremidad superior grupos de 2 a 4 hojas tiernas (yema terminal), lanceoladas y a veces coloridas, en las que es más visible la tumefacción del peciolo que disminuye gradualmente de arriba a abajo, hasta ser poco aparentes en las cicatrices inferiores.

"Las inflorescencias axilares, son cimas uníparas contraídas, con involúucros muy pequeños, coloridos, vellosos y caedizos unos completos y otros incompletos. Los involúucros completos, tienen un pedicelo corto y rollizo con 2 brácteas oval-agudas y opuestas en su base, son casi hemisféricas y llevan en su borde 5 lóbulos membranosos divididos en 2 grandes dientes, cuyas márgenes son afleco-dentadas y alternan con 5 glándulas reniformes y enteras (a veces divididas por un estrangulamiento de su parte media en 2 redondas ó discoideas), de color rojizo o púrpura obscuro con pelitos escamosos blancos; glándulas que llevan un apéndice oval petaloide

y extendido 2-3 dentado en un extremo libre, blanco o rosado por encima y de color obscuro casi morado por debajo. (Ver Fig. No. 1).

"Flor femenina con los caracteres comunes del género, siendo bífidos los estilos rojos, y lo mismo los tiene el pequeño fruto pediculado y lobado de 3-4 mm. de largo y cuyos 3 granos son faveolados.

"Los involúcras incompletos carecen de flor central femenina y como fueron los únicos que florecieron y se observaron durante el año de 1909 en la planta viva que posee el Instituto Médico, se aseveró que la especie debía ser dioica; pero habiendo floreado en éste año los involúcras incompletos debe considerarse la planta como polígama.

"El color blanquizco de los tallos, depende de la cantidad de cera vegetal de que está revestida su epidermis, lo que ha dado lugar a diversos ensayos de explotación de esa cera y probablemente el origen del nombre vulgar, se debe a la forma especial de los tallos y esta circunstancia induce a proponer como nombre específico el de *Euphorbia cerífera* que está al frente de esta descripción (12).

c) Clasificación botánica.

Según el sistema Natural de Engler, la Euphorbia cerífera conocida vulgarmente con el nombre de Vara de Candelilla, queda clasificada como sigue:

REINO: Vegetal

DIVISION: Embriófitas sifonógamas, Espermatófitas, Antófitas o Fanerógamas.

SUBDIVISION: Angiospermas.

CLASE: Dicotiledóneas.

ORDEN: Tricomas

FAMILIA: Euphorbiáceas.

GENERO: Euphorbia.

ESPECIE: Cerífera.

d) VARIETADES.

Las plantas que proporcionan la cera de Candelilla, corresponden a la familia de las Euphorbiáceas, siendo algunas especies del género Euphorbia y otras del género Pedilanthus, las últimas de menor importancia como productoras de cera.

Se han mencionado principalmente 3 variedades cuyas características botánicas pertenecen a: Euphorbia antisiphilítica, Euphorbia cerífera y Pedilanthus pavonis.

1).- La variedad E. antisiphilítica, debe su nombre.

al botánico Zuccarini (1829) el cual hace una descripción fugaz pero precisa, no hace mención de la cera de la planta, pero sí del latex, el cual es usado para enfermedades venéreas.

2).- La variedad E. cerífera, debe su nombre a Gabriel Alcocer (1909), el cual hace una descripción botánica completa así como una amplia explicación de la cera. No hace mención respecto al primer nombre dado por Zuccarini.

Las 2 variedades E. antisiphilítica y E. cerífera, son muy semejantes entre sí, algunos autores como Martínez, opinan que la E. antisiphilítica descrita por Zuccarini es diferente a la E. cerífera descrita por Alcocer; pero no así otros autores como Standley los cuales consideran que se trata de una misma variedad (12).

3).- La variedad P. pavonis (Bois), difiere de las otras 2 en tener; tallos más gruesos y largos, una cantidad insignificante de cera, y un líquido lechoso de propiedades muy enérgicas y peligrosas.

e) Zonas de Vegetación.

La Candelilla, vegeta principalmente en regiones semidesérticas, situadas entre los 1000, y los 2000 m. sobre el nivel del mar (16), con climas extremoso, escasez de lluvias y atmósfera seca. Esta zona incluye

principalmente la región norte del país, correspondiente a Coahuila, Chihuahua y Nuevo León, pero se considera que el área de vegetación de la Candelilla es más amplia, abarcando también los estados de Durango, Zacatecas, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí, Oaxaca y Baja California (12). No se desarrolla ni en zonas muy frías, ni en las altas montañas.

f) Descripción de las Muestras Vara de Candelilla Procede-
dente del Estado de Coahuila.

Es una mata que aproximadamente alcanza 1 m. de alto. Está constituida por una raíz de color café-rojizo (persistente y funcional durante toda la vida de la planta), se llama nudosa y pertenece al tipo de las fasciculadas tuberosas; cerca de la superficie de la tierra, se divide la raíz en 2 y cada una de estas subdivisiones en otras 2. Estas subdivisiones de la raíz, al salir a la superficie, se continúan con igual número de tallos; cada tallo, se ramifica en 2 (dicotómicos), los tallos más largos miden 80 cm. de longitud y 5 mm. de diámetro en su base adelgazándose ligeramente, en su extremidad tienen un diámetro de 3 mm, su color va del verde glauco al amarillo verdoso, su aspecto es polvoso (polvo blanco, fino, adherente), untuoso al tacto, al frotar suavemente la superficie del tallo, se vuelve blanco y brillante

(cera); todo el tallo está recorrido por las cicatrices que dejan las hojas caedizas, estas cicatrices son alternas y aproximadamente a 4 cm. entre sí.

Se observan los pedúnculos florales que sostenían las inflorescencias y las infrutescencias en las axilas de los tallos.

Efectuando un corte transversal del tallo, escurre el latex y se observan microscópicamente del exterior al interior.

- 1).- Una capa blanquecina (cera).
- 2).- Una capa amarilla verdosa (epidermis).
- 3).- Una capa verde (parénquima clorofílico).
- 4).- Una capa blanca (fibras esclerosas y vasos del xilema y floema).
- 5).- Una parte central, de color amarillo claro (parénquima medular).

El latex sale entre la zona amarilla verdosa y la verde (vasos laticíferos), no es tan abundante como en otras Euphorbiaceas, pero está en proporción con el espesor del tallo.

La Euphorbia a semejanza de las xerófitas, posee diversas características para disminuir la transpiración: aumenta el espesor de la membrana externa de las células epidérmicas, así como el espesor de la cutícula

que se impregna de secreciones mucilaginosas, cerosas y resinosas. Se observa también una reducción en el número de estomas, así como el estrechamiento u obstrucción de éstos, por substancias cerosas o resinosas; formación en la epidermis de criptas de cámaras aéreas externas (ver foto # 4 y 5). Otra protección eficaz contra la evaporación, se logra por una intensa reducción de las superficies transpiradoras, ramificación escasa, disminución de la masa foliar, desaparecen los limbos de las hojas y solo quedan los tallos con cicatrices de la inserción de los peciolos (16).

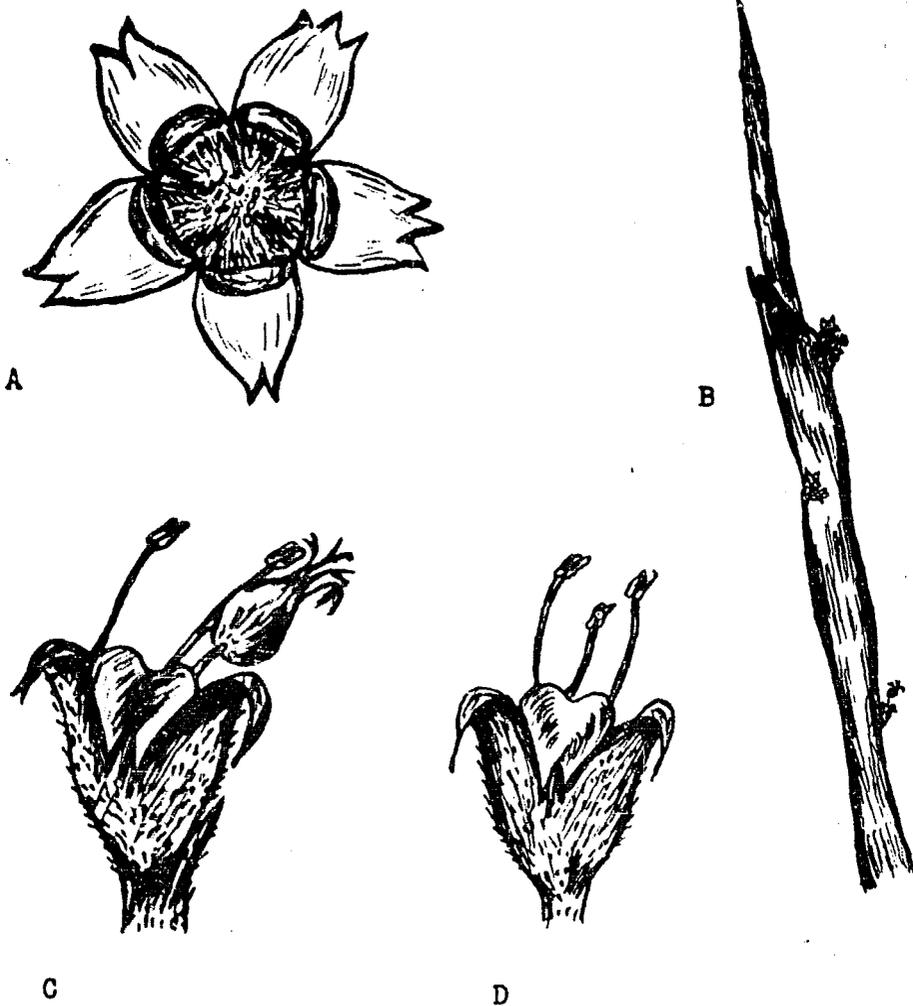


Fig. 1.- *Euphorbia cerífera*. Alcozer. A. ciato de frente; B. Tallo en floración; C. ciato visto de lado (ovario súpero); D. ciato visto de lado (estambres).

PARTE EXPERIMENTAL

a).- *Estudio Anatómico*

b).- *Estudio Químico*

(ver microfotografías en Apéndice)

a). - ESTUDIO ANATOMICO.

1. - PREPARACION DE LA MUESTRA. - De 5 haces de Candelilla (de aproximadamente 50 Kg. cada uno), se escogió planta de la más fresca, y se le quitó la raíz. Los tallos fueron cortados a 5 niveles diferentes en piezas de 1 a 1.5 cm. de longitud aproximadamente. Las piezas previamente etiquetadas, fueron llevadas al microtomo de congelación en donde se prepararon cortes transversales y longitudinales de 25 a 50 micras de grosor.

Secciones en Estado Fresco. - En éste estudio anatómico, fué indispensable la observación de las secciones montadas en estado fresco, porque nos permite observar ciertos detalles en el estado más cercano a las condiciones de la vida vegetal; ya que las secciones teñidas, se hace uso de los fijadores (1), que por lo general alteran la morfología celular.

Fijación y Tinción. - Para efectuarlas, se necesitó previamente una fijación; para ello, se prepararon varios líquidos fijadores (1) con el objeto de escoger de entre ellos el más apropiado, o sea, aquel que actuando

rápida y produjera las menores modificaciones morfológicas y estructurales posibles, a fin de que estas no falseen los resultados y poder llevar a cabo con éxito el estudio morfológico de células y tejidos, siendo en este caso la formalina al 10%.

2. - OBSERVACIONES MICROSCOPICAS. - Observando el microscopio un corte transversal del tallo de la Candelilla, se nos presenta una forma circular constituida por una serie de tejidos diferenciados dispuestos en capas concéntricas. En la observación de un corte longitudinal, dichas capas concéntricas están dispuestas en hileras paralelas.

Los diferentes tejidos que constituyen al tallo previamente mencionado están dispuestos en el siguiente orden: Tejido Epidérmico, corteza y Cilindro Central.

10. - Tejido Epidérmico. - Está constituido por una serie de células con un grosor aproximado de 11 micras, dichas células están dispuestas de un modo continuo, tienen forma prismática y poseen en su interior un núcleo esferoidal excéntrico y sobre sus superficies libres una cubierta constituida por 2 partes: una exterior fácilmente desprendible e irregular y una interior que impregna la superficie cuticular de las células epidérmicas (ver Foto # 3). A intervalos más o menos regulares, se interrumpe la cubierta epidérmica por un conducto intercélulo-

Lar denominado estoma, el cual comunica hacia afuera por un pequeño espacio (poro u ostiolo) y hacia adentro se encuentra la cámara estomática de 45 micras rodeadas de células parenquimatosas (ver Foto # 4 y 5). Vistas tangencialmente, las células epidérmicas presentan forma de panal cuya pared externa superior presenta la cubierta previamente mencionada (ver Foto # 5 y 6).

En el tejido epidérmico se encuentran protuberancias unicelulares o pluricelulares en forma de pelos (tricomas) rectos o con sus extremidades ganchudas (los pelos midieron de 40 a 150 micras de largo), los cuales son más numerosos cerca de los nudos.

Unida a las células epidérmicas se encuentra otra serie de células de 11 micras, de forma poliédrica que poseen en su interior un núcleo esferoidal excéntrico (ver Foto # 3). Este es el colénquima ó tejido subepidérmico de resistencia).

20. - Corteza:

Corteza externa.

Corteza interna.

Endodermis.

La corteza está constituida por tejido parenquimatoso, el cual está formado por 2 clases de células, constituyendo de esta manera 2 clases de tejidos parenquimato-

sos, los cuales se encuentran dispuestos en el siguiente orden: :

Corteza externa. - Tejido parenquimatoso clorofílico de 450 micras de grosor, está constituido por células de 40 por 70 micras, de membranas delgadas, cuyo protoplasma encierra numerosas cloroplastos agrupados y núcleo ex céntrico de 4 micras (ver Foto No. 4 y 5).

Corteza interna. - Tejido parenquimatoso de reserva, de 470 micras de grosor, está constituido por células poliédricas de 40 por 80 micras, algunas ligeramente redondeadas y de paredes delgadas. Almacena: agua, grasas, almidón etc. (ver Foto # 2).

El protoplasma de las células parenquimatosas encierra un núcleo esferoidal excéntrico de 4 micras, un corpúsculo rearingente en forma de capuchón de 8 a 10 micras, pequeños globulitos adheridos al mencionado corpúsculo, o bien aislados en el protoplasma y con un promedio de 2 micras de tamaño, (ver Foto # 2).

Endodermis. - La endodermis o endodermo, es la capa más profunda de la corteza y no aparece tan clara como en las raíces; está en contacto con el cilindro central, sus células están estrechamente unidas sin dejar espacios, y son generalmente ricas en granos de almidón, por lo que se llama vaina amilífera.

Vasos Laticíferos. - En el corte transversal, se ob-

servan los vasos laticíferos como conductos anulares de paredes engrosadas, siendo más numerosas y de mayor tamaño los dispuestos hacia el interior y miden de 10 a 30 micras. Los vasos laticíferos vistos longitudinalmente son conductos alargados, cilíndricos y ramificados, cuyas ramificaciones recorren la corteza y desembocan al nivel del tejido epidérmico. Estos conductos encierran una inclusión granular con globulitos de diferentes tamaños los cuales miden de 5 a 15 micras (ver Foto # 11 y 12). Se observaron también en la inclusión antes mencionada gránulos ovoides, refringentes, que polarizan la luz en cruz.

30.- Cilindro Central.— Está constituido por las siguientes partes:

periciclo

floema

cambium

xilema

parénquima medular

Fibras Pericíclicas.— Estas fibras, se encuentran aisladas, son fibras con sus membranas celulósicas muy engrosadas y un lumen muy escaso (ver Foto # 9 y 12).

Periciclo.— El periciclo comprende una o varias hileras de células que hacia afuera limitan con la endodermis y por su parte interna con el parénquima medular

y los haces liberoleñosos. Se llama también capa rizógena porque de allí se generan las raíces adventicias que se forman en algunos tallos.

Floema.— El floema está constituido por los vasos liberianos, fibras liberianas, células anexas y pirénquina liberiano. Están colocadas hacia afuera, apoyándose en el periciclo, Los vasos leñosos que junto con otros elementos constituyen el xilema, están colocados hacia el centro del tallo.

Xilema.— Está formado por fibras esclerenquimatosas (ver Foto # 9), colocadas en grupos que poseen la forma de vaina, cada vaina está formada de 4 a 10 cordones y cada cordón de 15 a 25 fibras. Las vainas están recorridas desde su base por células parenquimatosas poliédricas que aumentan de tamaño a medida que se acercan a la médula constituyendo los radios medulares (ver foto # 9), vistas transversalmente, presentan numerosas puntuaciones y encierran numerosos gránulos refringentes esféricos u ovoides de 10 a 20 micras, y con una presión central.

En el corte longitudinal, se observaron dos clases de vasos leñosos; anillados y espiralados, predominando los últimos y comunicándose entre ellos por medio de puntuaciones, aereoladas (18).

Cambium.— Entre los vasos liberianos y los vasos

leñosos se encuentra el cambium o zona generatríz, meristemo secundario que al reproducir sus células, proporciona el crecimiento en grosor y origina los tejidos secundarios. El cambium tiene el aspecto de una capa anular más o menos continua, que recorre toda la longitud del tallo (ver Foto # 9).

Médula.— Está formada por tejido parenquimatoso de células poliédricas o ligeramente redondeadas, de paredes delgadas, con numerosos espacios intercelulares, observándose además numerosos gránulos refringentes, ovides y esféricos de 10 a 20 micras de tamaño, (ver Foto # 10).

El parénquima medular, ocupa el resto del cilindro central, formando el centro de la médula, a partir de la cual se forman los radios medulares que se insinúan entre los vasos libero-leñosos hasta llegar al periciclo.

B. - ESTUDIO QUIMICO

1. - Preparación de la Muestra. - La muestra se preparó en las mismas condiciones que para el estudio anatómico (Sección, Fijación). Se preparó también muestra de raíz, dando reacción negativa en la identificación de grasas, por lo cual fué desechada.

2. - Determinación de Humedad. - Esta determinación se llevo a cabo en estufa de vacío, a una temperatura de 70° C. y a una presión de 75mm. hasta peso constante, durante 2hrs. Se efectuó una determinación de humedad en la muestra recién llegada, con resultados de 51 a 54% de humedad.

Humedad del polvo 3.5%

3. - Determinaciones Histoquímicas:

Identificación de Cera y grasas. - Se emplearon métodos de coloración selectivos, usandose principalmente los de Hersheimer (1), Smith y Mair (1) (5), Simultánea de Sudán-Hematoxilina (10) y Técnicas combinadas de Sudán III, IV y Sudán Negro B, (ver apendice).

Identificación de Lignina. - Las reacciones efec-

tuadas para la identificación de lignina, fueron las siguientes:

- a).- Reacción del floroglucinol (4) (6), (ver foto # 9).
- b).- Reacción del cloro-yoduro de zinc (5).
- c).- " " yodo~~yoduro~~ yoduro de potasio (9).

Identificación de Celulosa.- Las reacciones seguidas para la identificación de celulosa, fueron las efectuadas para identificación de lignina, (4) (5) (6) (9).

Identificación de Almidón.- La identificación de almidón se efectuó por medio de la reacción del yodo-yoduro de potasio (Lugol), y por medio de la luz polarizada, (4) (5) (6).

Estudio del Latex.- La Candelilla, que pertenece a la familia de las Euphorbiáceas, posee como una de sus principales características, una secreción de aspecto granuloso, denominado latex. Para examinar detalladamente dicha secreción se escogió un tallo de los más frescos, y por presión se obtuvo el latex, que fué colocado en un portaobjetos.

Microscópicamente, se observó que el latex se seca rápidamente quedando una película adherida al portaobjetos. Microscópicamente se observaron numerosos cristales que polarizan la luz, los cuales presentaron las

siguientes características:

- 1.- De forma alargada, con uno o los dos extremos a largados. La mayoría con sus extremos no engrosados.
- 2.- Tomaron coloración café-oscuro con la solución yodo-yodurada.
- 3.- Solubles en HCl , NH_3 y NH_4OH .
- 4.- La reacción xantoprotéica dió negativa.

4.- Extracciones Sucesivas:

10.- Preparación de la Muestra.- De 5 haces de Candelilla, de 50 Kg cada uno, se escogió planta homogénea y representativa del total; se despojó de la raíz y se cortó en pequeños trozos de 2 a 5 cm de longitud; dicho material fué colocado en charolas de aluminio, las que fueron llevadas a un secador de aire entre 45 y 50° C. de temperatura.

20.- Técnica seguida en las Extracciones Sucesivas.- El polvo obtenido de la molienda, se sometió a una serie de extracciones sucesivas, en forma exhaustiva, efectuadas en extractor Soxhlet. El método seguido, fué el propuesto por Wattiez (21) con algunas modificaciones. El método queda resumido en el diagrama de la página siguiente.

Los extractos 1, 2, 3, etc., se obtuvieron después de concentrar las soluciones resultantes obtenidas con cada solvente, después de su correspondiente extracción.

La extracción No. 1, que proviene del éter de petróleo, es de mayor porcentaje 11.2%, con algunas características peculiares de las ceras, por lo que el extracto obtenido fué puesto a peso constante a una temperatura de 60 C. y a una presión de 76 mm de mercurio

en estufa de vacío.

5.- Determinaciones Efectuadas en el Extracto Céreo:

10.- Punto de Fusión.- El extracto céreo se fundió en una cápsula y ya fundido se introdujo un tubo capilar abierto hasta que el líquido alcanzó dentro del capilar una altura de 1 cm. se retiró de la cera fundida y permaneció 24hrs. en el refrigerador. Posteriormente se determinó el punto de fusión (14).

Punto de Fusión 67°C.

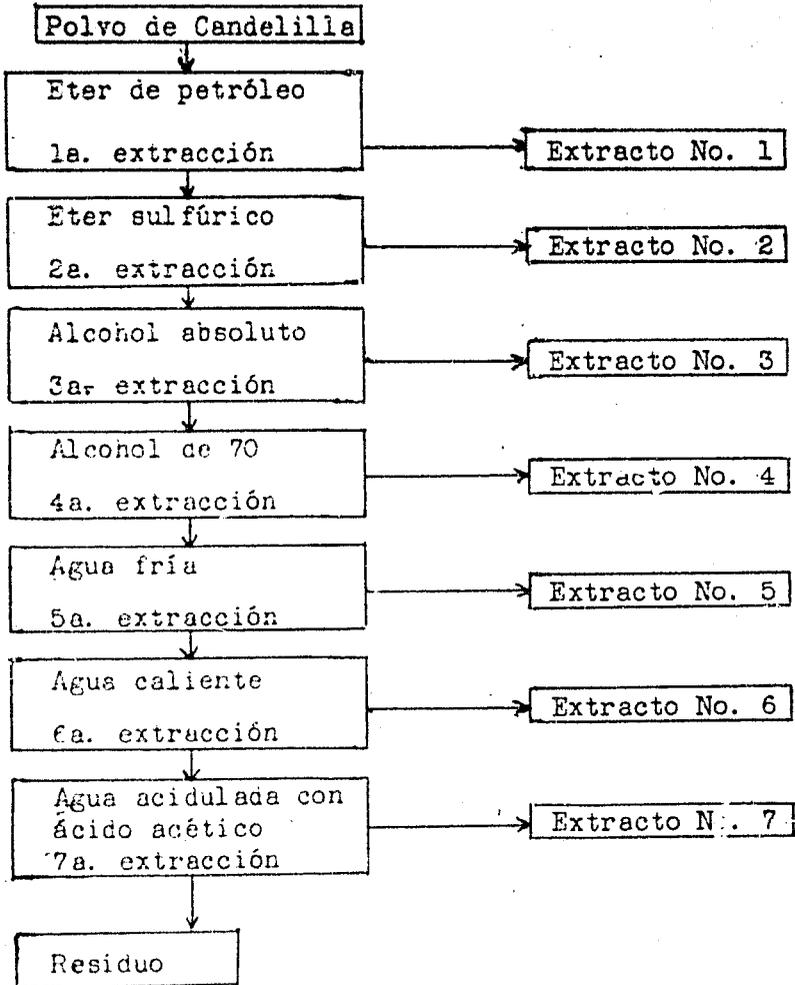
20.- Índice de Acidez.- Índice de acidez o neutralización, es el número de miligramos de potasa necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres contenidos en 1 gr. de grasa.

Procedimiento.- En un matraz Erlenmayer de 250 ml, se colocaron 2 gr. del extracto céreo, se disolvieron en una mezcla de 2 partes de benceno por 1 parte de alcohol, 40 c.c. en total, previamente neutralizados a la fenolftaleína. Se añadió 1 c.c. de fenolftaleína al 1%. y finalmente se tituló la solución con potasa alcohólica 0.1N. hasta coloración rosa-pálidos (14) (20).

Índice de Acidez 15.3

30.- Índice de Saponificación.- Índice de saponificación, es el número de miligramos de potasa necesarios

DIAGRAMA DE LAS EXTRACCIONES



para la neutralización de los ácidos grasos contenidos en 1 gr. de grasa, bien se hallen estos libres, o combinados en forma de éster o lactona.

Procedimiento. - En un matraz Erlenmayer de 250 ml. se colocaron 2 gr. del extracto céreo y se agregaron 25 ml. de potasa alcohólica 0.5N, se hirvió la mezcla a reflujo durante 1/2 hora, usándose un refrigerante de aire (tubo de vidrio de 90 cms. de longitud), se agitó frecuentemente y en forma circular para asegurar un mejor contacto. Transcurrida 1/2 hora, se separó el matraz y en caliente se tituló el exceso de potasa con ácido clorhídrico 0.5N en presencia de fenolftaleína. Se efectuó una prueba testigo con la misma cantidad de reactivos y en las mismas condiciones (14) (20).

Índice de Saponificación 58.1

RESULTADOS

RESULTADOS:

a).- Histoquímica de la Cera.

- 1.- Con Sudanes III y IV en los diferentes solventes:

Coloración naranja en la epidermis, latex y glóbulos refringentes de las células del parénquima de la corteza.

- 2.- Con Sudan Negro B en los diferentes solventes:

Coloración azul-marino en la epidermis.

- 3.- Coloración de Smith y Mair (Sulfato Azul de Nilo):

Coloración rosa en la capa exterior de la epidermis (la fácilmente desprendible). Coloración azul en la capa interior (la que impregna las células epidérmicas), y los glóbulos refringentes de las células del parénquima de la corteza.

b).- Histoquímica de Celulosa, Lignina y Almidón.

- 1.- Reacción del Floroglucinol:

Coloración rojo-carmín, en las paredes celulares del xilema,

celulosa lignificada, el resto de las paredes celulares sin teñir, celulosa.

2.- Reacción del CloroYoduro de zinc:

Coloración azul en las paredes celulares del parénquima, grupos de fibras del floema, celulosa. Coloración amarilla, en las paredes celulares del xilema, lignina, cutina o suber.

3.- Reacción del Yodo-Yoduro de potasio (Lugol):

Coloración azul, almidón, representado por los gránulos observados en las células parenquimatosas que rodean el xilema; así como los observados en los vasos de éste último. Coloración amarilla, lignina, las paredes celulares del xilema. La misma reacción después de añadir ácido sulfúrico, coloración azul que desaparece celulosa, en las paredes celulares del parénquima.

4. Acción a la Luz Polarizada:

Todas las paredes celulares polarizan la luz (aparecen brillantes). Los gránulos observados polarizan la luz en forma de cruz y presentan una depresión.

c). - Datos obtenidos de las extracciones sucesivas.

Resumen de las características principales, determinadas durante las extracciones sucesivas del tallo de la "Candelilla".

| Solventes | Tiempo * | Extracto | | |
|-------------------------------------|-------------|----------------------------------|---------------|--------|
| | | (%) base seca sobre peso muestra | Color | Peso |
| Eter de petróleo | 45 | 11.1 | verde oscuro | 1.0769 |
| Eter sulfúrico | 20 | 2.0 | verde | 0.2034 |
| Alcohol absoluto | 68 | 11.7 | café amarillo | 1.425 |
| Alcohol de 70% | 52 | 9.4 | café | 0.9145 |
| Agua fría | 80 | 9.2 | amarillo | 0.8923 |
| Agua caliente | 55 | 10.2 | café amarillo | 0.9938 |
| Agua acidulada con ácido acético 5% | 34 | 3.8 | café | 0.3701 |
| Total | 354 | 57.4 | | 5.5935 |

* Tiempo en que la extracción fué exhaustiva.

Cuadro comparativo de las constantes
de la cera de Candelilla de varias
especies, comparadas con las del
extracto etéreo obtenido.

| Determinaciones | Límites* | <i>P. Pavonis</i> | <i>E. cerífera</i> | <i>E. antisiphilitica</i> | Extracto obtenido |
|--------------------------|----------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| Índice de acidez | 12 a 20 | 16.6 | 15.4 | 0.2 | 15.3 |
| Índice de saponificación | 46 a 65 | 58.1 | 60.7 | 105.7 | 58.1 |
| Punto de fusión | 65 a 69 | 67.5 | 68.0 | 77.2 | 67.0 |

* Valores límite de cada determinación marcados por la Unión de Crédito de Productores de Cera de Candelilla, S. A. de C. V.

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

a).- Estudio Anatómico.

Del estudio anatómico, citológico e histológico, de la vara de Candelilla, se observó que está perfectamente acondicionada a las exigencias climáticas de las regiones donde se desarrolla.

Su sistema de protección, se adapta a los agentes atmosféricos, como son las sequías y los cambios bruscos de temperatura, propios de las regiones semi-desérticas, pues la cubierta de cera que recubre la epidermis de todo el tallo, obstruye numerosos estomas (ver Foto # 5), disminuyendo por lo tanto la transpiración. La epavoración del agua se reduce también al desaparecer las superficies foliares que solo permanecen en los tallos muy jóvenes, pues a medida que el vegetal secreta cera, se caen las hojas, permaneciendo solamente las cicatrices en el lugar de la inserción del peciolo con el tallo.

El sistema de resistencia lo constituyen el colénquima y el esclerénquima, que además de dar sostén y protección a la planta, le confieren cierta elasticidad.

Su sistema de asimilación y de reserva, están igualmente acondicionados a las condiciones del medio ambiente.

Los diferentes métodos seguidos para la identificación de la cera nos revelan que forma una cubierta epidérmica. Dicha cubierta cérea, se ha visto que está constituida por 2 partes: una exterior fácilmente desprendible la cual está formada posiblemente en su totalidad por lípidos neutros y una interior que impregna las paredes de las células epidérmicas y que parece estar formada por ácidos grasos.

Respecto a los glóbulos encontrados en las células parenquimatosas de la corteza, parecen presentar en su composición, alguna substancia grasa asociada a otros componentes, los cuales tal vez impidan revelar totalmente sus características químicas verdaderas (8).

Entre los componentes de la cera de *Cand. lilla*, se encuentran resinas, entre 2 y 1% (20), las cuales se consideran que forman parte del látex (8) (16), ya que además de que con el Sudan III y IV presentan afinidad, se encuentran en forma de globulitos (ver Foto # 11) y solo pueden encontrarse en conductos especiales llamados conductos resiníferos (8), o bien en el jugo laticífero.

Por lo anterior, se considera que al efectuar una extracción, además de extraerse la cubierta cérea, son fáciles de obtener también durante el proceso, las subs

ancias grasas antes mencionadas así como el contenido de los tubos laticíferos y de esta manera, bajar la calidad de la cera.

Lignina, Celulosa y Almidón (3)(7)(8)(18).- En el tallo de la Candelilla, la lignina se encuentra impregnando las paredes celulares de los haces fibrosos del xilema (ver Foto # 9), constituyendo el tejido esclerenquimatoso. El esclerenquima, es un tejido de gran utilidad para las plantas debido a que da consistencia, resistencia y elasticidad.

El resto de la planta está formado por celulosa, la cual es el componente principal de las paredes celulares de las plantas, en las que se halla asociada con las hemicelulosas (7).

El almidón es uno de los principales productos de asimilación de la planta viva. Se encuentra en los más diversos tejidos y órganos vegetales, depositado en las células como gránulos microscópicos de tamaños variados, desde 0.5 hasta 170 micras, los cuales presentan formas muy variadas. Constan generalmente de un núcleo alrededor del cual se agrupan numerosas capas concéntricas (7) (3).

En el tallo de la candelilla, el almidón se encontró en las células parenquimatosas de la corteza y de

la médula (ver Foto # 10), (muy pocos gránulos se observaron en el latex) (13). Los gránulos observados fueron ovales y esféricos variando de 10 a 20 micras.

Latex. - Sabiendo que el latex de la Candelilla posee una acción purgante muy enérgica sobre el organismo, y de acuerdo con las reacciones previamente mencionadas, se puede suponer que los cristales corresponden a los alcaloides que posee la planta en estudio.

b). - Estudio Químico.

En el cuadro No. 1; la fracción No. 1, que proviene de la extracción con éter de petróleo, es de las mayores ya que representan un 11.1%, además posee algunas características peculiares de una cera. El color verde del extracto, se debe a que el solvente utilizado extrae parte de la clorofila de la planta. La extracción efectuada con alcohol absoluto representa también un porcentaje elevado 11.7%, habiéndose identificado taninos, por lo cual sería de interés un estudio posterior, así como en la extracción con alcohol de 70%. El extracto obtenido con agua caliente, posiblemente esté integrado en su mayor parte por almidón de acuerdo con el estudio histoquímico efectuado. El agua acidulada extrae principalmente la fitina (21).

Siendo el principal punto de interés la cera y ha-

biéndose obtenido el doble porcentaje del que actualmente se extrae, se orientó el estudio para determinar las principales constantes químicas de ésta cera.

En el cuadro No. 2, se puede apreciar en primer lugar: 1) que el extracto céreo obtenido en las extracciones sucesivas queda dentro de los límites establecidos por la "Unión de Crédito de Productores de Cera de Candelilla" S. A. de C. V., 2) que las constantes químicas fueron semejantes a las variedades cerífera y pavonis, inclinándose por la primera variedad debido al origen y características botánicas, no habiendo sido completas debido a la falta de flores de la planta en estudio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

I.- El presente estudio permitió conocer en forma preliminar la anatomía general del tallo de la "Candelilla" encontrando las características siguientes:

1.- Tejido epidérmico de células prismáticas impregnadas de cera. En este tejido aparecen:

a).- Pelos unicelulares y pluricelulares impregnados de cera.

b).- Estomas incrustados de cera.

2.- Corteza formada por:

a).- Corteza externa. Tejido parenquimatoso clorofílico de células poliédricas.

b).- Corteza interna. Tejido de reserva de células poliédricas y almidón.

c).- Vasos laticíferos.

3.- Cilindro central formado por:

a).- Fibras pericíclicas (celulosa).

b).- Periciclo (celulosa).

c).- Floema (celulosa).

d).- Cambium (celulosa).

e).- Xilema con vasos anillados, espiralados impregnados de lignina.

4.- Médula. Tejido de células poliédricas y aldon.

II.- La cera de Candelilla forma una cubierta epidérmica.

III.- En el tallo de la "Candelilla" existe un 11% de extracto céreo sobre base seca extraíble por solventes, presentando las siguientes características:

| | |
|--------------------------------|-------|
| Color | verde |
| Índice de acidez..... | 15.3 |
| Índice de saponificación | 58.1 |
| Punto de fusión | 67 C. |

IV.- La raíz de la Candelilla carece de cera.

APENDICE

Microfotografías

MICROFOTOGRAFÍAS *

- No. 1.- Corte longitudinal tratado con Azul de Nilo. Morfología celular (nótese el tubo laticífero). 120X.
- No. 2.- Corte longitudinal tratado con Azul de Nilo. Células del parénquima de reserva mostrando sus inclusiones. 1250X.
- No. 3.- Corte transversal tratado con Sudán III-Azul de Anilina. De fuera hacia adentro: cubierta cérea interna (naranja); hilera de células epidérmicas; hilera de células del tejido colénquima; parte del tejido parénquima clorofílico. 450X.
- No. 4.- Corte transversal, a la altura de un estoma. Tratado con Sudán IV-Verde-Luz. Parte del parénquima clorofílico mostrando los cloroplastos agrupados. 120X.
- No. 5.- Corte transversal a la altura de un estoma tratado con Sudán Negro B. Se observa: cubierta epidérmica (azul marino); cámara estomática; tejido parénquima clorofílico (nótese la incrustación de la cera.) 120X.
- No. 6.- Corte Longitudinal, luz polarizada. Conjunto de estomas rodeados de células impregna

* Todas las microfotografías son originales.

das de cera (nótese la polarización de la luz causada por la cutina). 120X.

No. 7.- Corte longitudinal tratado con Sudán IV. Se observa estomas rodeados de células impregnadas de cera; corteza; parte del xilema. 33X.

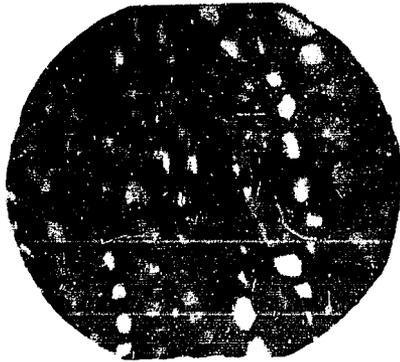
No. 8.- Corte transversal a la altura de un nudo. tratado con Sudán IV, luz polarizada. (Nótese la polarización de las paredes celulares de los tubos laticíferos. 33X.

No. 9.- Corte transversal tratado con floroglucinol. Luz polarizada. Se observa: fibras del xilema con la coloración característica; zona de cambium (sin teñir) floema; fibras pericíclicas; conductos laticíferos. Todos polarizan la luz. 33X.

No. 10.- Corte transversal tratado con Verde Luz. luz polarizada. Se observa: parte del xilema y médula cuyas células muestran granos de almidón con la cruz característica de polarización. 33X.

No. 11.- Corte longitudinal tratado con Sudán III. conducto laticífero con inclusión, (Nótese los globulitos adheridos de color naranja). 1250X.

No. 12.- Corte transversal tratado con Azul de Ni-
lo. Se observa principalmente los tubos
laticíferos; dos de ellos con sus inclu-
siones y uno vacío; fibras del periciclo
y células anexas. 1250X.



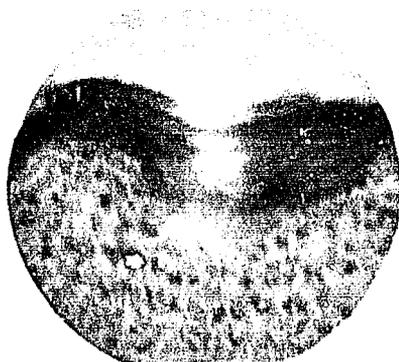
Microfotografía No. 1



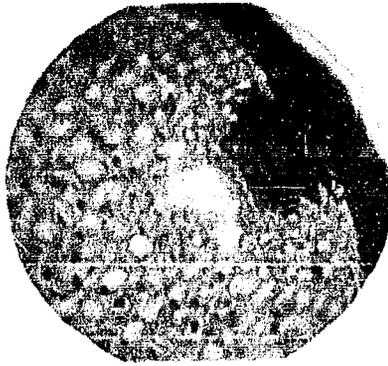
Microfotografía No. 2



Microfotografía No. 3



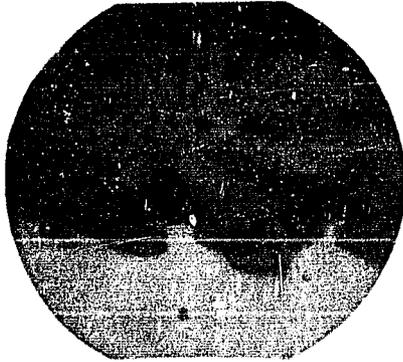
Microfotografía No. 4



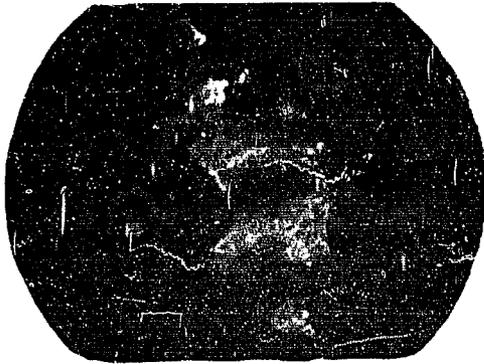
Microfotografía No. 5



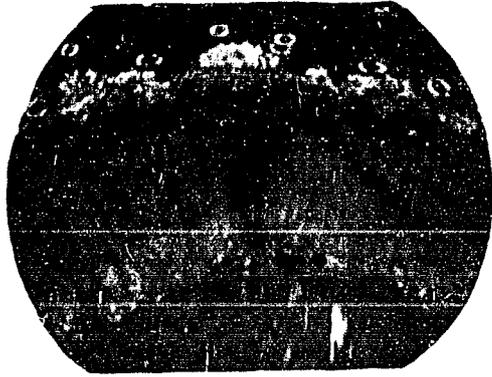
Microfotografía No. 6



Microfotografia No. 7



Microfotografia No. 8



Microfotografía No. 9



Microfotografía No. 10



Microfotografía No. 11



Microfotografía No. 12

BIBLIOGRAFIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Connm H. J. y Darrow A. M.
 "*Staining Procedures*", 138, 1315. 1955.
- 2.- Deane B. Swingle
 "*A Textbook of Systematic Botany*", 113.
- 3.- Esau Katherine
 "*Plant Anatomy*", 1945.
- 4.- Glick, D. ;
 "*Techniques of Histo and Cytochemistry*", 43-51. 1949.
- 5.- Gray, P. ;
 "*The Micromist's formulary and guide*", 449-450. 1954.
- 6.- Heyn, A. N. J. ;
 "*Fiber Microscopy*" 1954.
- 7.- Holleman, A. F. ;
 "*Tratado de Química Orgánica*", 292-295-294-298. 1951.
- 8.- Hollman and Robins:
 "*Textbook of General Botany*", 49-50-141 a 143. 1950
- 9.- Johansen, D. A. ;
 "*Plant Microtechniques*", 189-191-461-462. 1940.
- 10.- Liebbman, E. ;

- "Stain Technology", 17, 89. 1942.
- 11.- Langeron, M.;
"Précis de Microscopie", 1264 a 1266-1368. 1942.
- 12.- Martínez, M.;
"Plantas Útiles de México", 87 a 90. 1936.
- 13.- Mclean, R. C.;
"Textbook of Practical Botany", 237. 1942.
- 14.- Otero, A. E.;
"Análisis de Grasas, Ceras y sus Mezclas Comerciales". 1946.
- 15.- Rawlins, T. E.;
"Technics of Plant Histochemistry and Virology".
1952.
- 16.- Ruiz, O., Nieto, R. y Larios, R.;
"Botánica" 1950.
- 17.- Sinnott, E. W.;
"Botany Principles and Problems", 107-108. 1955.
- 18.- Strasburger, E.;
"Tratado de Botánica" 40-47. 1953.
- 19.- Thuringer, J. M.;
"Stain Technology". 1942.
- 20.- Wart, H. A.;
"The Chemistry and Technology of Waxes", 1947.
- 21.- Wattiez, N. y Sternon, E.;
"Elements de Chimie Végétale", 103 a 106. 1942.

TESIS

1957

M-t-182

PIÑA P.

Estudio Histoquímico
preliminar y Determinación
en el extracto del
tallo de la Candelilla

FECHA DE
ENTREGA

NOMBRE DEL LECTOR

TESIS
1957

M-t-182