

5.952324
2730
74
C.C. Q.Q.

094617

Ej. i

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

IDENTIFICACION DE LOS PRINCIPIOS AMARGOS Y TOXICOS
EN LA TORTA DE SEMILLA DE ACEITUNO (SIMAROUBA GLAUCA DC.)

T E S I S

P R E S E N T A D A P O R

ALMA GRACIELA AYALA SUCHICITAL

PARA OPTAR AL TITULO DE

LICENCIADA

EN

QUIMICA Y FARMACIA

E N E R O 1979

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA .



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

DOCTOR EDUARDO BADIA SERRA

SECRETARIO

DOCTOR JORGE FERRER DENIS

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO EN FUNCIONES

DOCTOR EDUARDO BADIA SERRA

DOCTOR JORGE FERRER DENIS



A S E S O R

DOCTOR OSCAR ORLANDO CUELLAR

J U R A D O C A L I F I C A D O R

DOCTORA ROSA MARIA PORTILLO DE RIVAS

LICENCIADA ANGELICA ODILIA VIDES DE VELASCO

DOCTOR OSCAR ORLANDO CUELLAR

L U G A R D E P R A C T I C A S

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES Y TESIS

PROFESIONALES DE LA FACULTAD DE QUIMICA

Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

A nuestro amoroso Padre Celestial,

A mis padres: Carlos Suchicial,

Graciela Ayala y

A mis hermanos: Carlos Tres, Oliver
y Milton.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis Maestros: Doctor Oscar Orlando Cuéllar, Doctora Rosa María Portillo de Rivas, Licenciada Angélica Odilia Vides de Velasco y Profesor Jorge -- Adalberto Lagos, por su asesoramiento, revisión y corrección de este trabajo.

A la Doctora Judith Polonsky, por su valiosa colaboración.

Al Doctor Juan Borges del Castillo y al Doctor Jorge Domínguez, por sus enseñanzas y ayuda.

A la Licenciada María Teresa Manrreza Ferrero, por su preciosa ayuda y amistad.

Al personal Docente y Administrativo de nuestra Facultad, por su enseñanza y ayuda.

A mis familiares, compañeros y amigos por su constante aliento y

A mis hermanos en Cristo, por sus oraciones.

gracias.

R E S U M E N

vi

Se investigó la presencia de amargos y tóxicos en la torta de la semilla de aceituno (Simarouba glauca Dc.), a fin de contribuir con los estudios para encontrar el método para eliminarlos y, así, tener la posibilidad de usarla como forraje (por su alto contenido proteico), ya que aquellas sustancias imposibilitan su uso como tal.

Se aislaron cuatro principios amargos, los cuáles fueron identificados como: glaucarubina, glaucarubol, glaucarubinona y ailantinona -- (los tres últimos probablemente son producto de desgradación del -- primero), por medio de dos métodos de extracción: a) con agua y b) - con alcohol isopropílico al 65%.

Se investigó la acción tóxica de estos amargos en peces del género - Mollinesia, llamados comunmente, "chimbolos", con resultados nega- - tivos. Asimismo, se investigó, la toxicidad de los diferentes extrac- - tos obtenidos (de la harina de la torta de semilla de aceituno) con éter de petróleo, alcohol etílico, agua y cloroformo. El extracto - - clorofórmico mostró mayor acción tóxica.

Se investigó, en la misma harina, la presencia de otros tóxicos bioló- - gicos, como son las aflatoxinas (micotoxinas producidas por hongos del género Aspergillus), que podrían contribuir o ser la causa de la toxi- - cidad. Los resultados fueron negativos.

INDICE DE CONTENIDO

	pag.No.
RESUMEN	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ESPECTROS	xi
LISTA DE FORMULAS	xi
LISTA DE GRAFICAS	xi
I.- GENERALIDADES	1
A. INTRODUCCION	1
B. DESCRIPCION DE LA PLANTA	2
C. USO INDUSTRIAL DE LA SEMILLA DE ACEITUNO	3
II.- PARTE EXPERIMENTAL	5
A. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO	5
B. METODOS Y PROCEDIMIENTOS	3
1. Preparación de la muestra	3
2. Determinación del porcentaje de grasa en la harina de la torta de semilla de aceituno	3
3. Análisis fitoquímico preliminar	9
4. Métodos de extracción	13
5. Determinaciones químicas con los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%	15
6. Pruebas de toxicidad	19
7. Determinación de aflatoxinas en la harina de la torta de la semilla de aceituno	24

	pag.No
III.- RESULTADOS	29
A. PORCENTAJE DE GRASA PRESENTE EN LA HARINA DE LA TORTA DE SEMILLA DE ACEITUNO . . .	29
B. ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.	30
1. Identificación de los extractos	30
2. Resultados de la cromatografía en capa fina	31
C. DETERMINACIONES QUIMICAS DE LOS CRISTALES EXTRAIDOS TANTO CON AGUA COMO CON ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%	42
1. Resultados de las reacciones de coloración con H_2SO_4 concentrado	42
2. Resultados de la cromatografía en capa fina	43
3. Rotación específica a diferentes longitudes de onda	47
4. Lectura e interpretación de los espectros IR, RMN y EM	51
5. Análisis de los espectros	56
D. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD. .	65
E. RESULTADOS DE LA INVESTIGACION DE AFLATOXINAS	70
IV.- DISCUSION	71
V.- CONCLUSIONES	74
VI.- BIBLIOGRAFIA	75

LISTA DE CUADROS

		pag.No.
CUADRO	I Cromatografía en capa fina de los extractos (Benceno-cloroformo 9:1)	36
CUADRO	II Cromatografía en capa fina de los extractos (Benceno-acetona 2:1)	37
CUADRO	III Cromatografía en capa fina de los extractos (Butanol-acético-agua 8:2:1)	38
CUADRO	IV Cromatografía en capa fina de los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%	45
CUADRO	V Cromatografía comparativa en capa fina de los cristales extraídos con agua, con alco hol isopropílico al 65% y el patrón de glauca rubina	46
CUADRO	VI Rotación específica a diferentes longitudes de onda de los cristales extraídos con agua	49
CUADRO	VII Rotación específica a diferentes longitudes de onda de los cristales extraídos con alco hol isopropílico al 65%	49
CUADRO	VIII Pruebas de toxicidad en peces del género - <u>Mollenesia</u> , con harina antes del proceso de extracción (inicial) y harina después - del proceso de extracción (final)	67

CUADRO	IX	Pruebas de toxicidad en peces del género <u>Mollienesia</u> , con los extractos en: éter de petróleo, etanol, cloroformo y agua . . .	68
CUADRO	X	Pruebas de toxicidad en peces del género <u>Mollienesia</u> , con los cristales extraídos con agua y con los extraídos con alcohol - isopropílico al 65%	69

LISTA DE FIGURAS

Fig.	1	Marcha de extracción con solventes en orden de polaridad creciente	9
Fig.	2	Marcha de extracción con solventes en orden de polaridad creciente (Modificada)	10
Fig.	3	Marcha de preparación de los extractos para las pruebas de toxicidad	19
Fig.	4	Cromatograma Benceno-cloroformo 9:1 revelado con cloruro de cobalto	39
Fig.	5	Cromatograma Benceno-acetona 2:1 revelado con cloruro de cobalto	39
Fig.	6	Cromatograma Butanol-acético-agua 8:2:1 revelado con cloruro de cobalto	40
Fig.	7	Cromatograma Benceno-cloroformo 9:1 revelado con yodoplatinato	40
Fig.	8	Cromatograma Benceno-acetona 2:1 revelado con yodoplatinato	41
Fig.	9	Cromatograma Butanol-acético-agua 8:2:1 revelado con yodoplatinato	41

LISTA DE ESPECTROS

			pag.No.
ESPECTRO	1	Espectro IR de los cristales extraídos con agua	59
ESPECTRO	2	Espectro IR de los cristales extraídos con alcohol isopropílico al 65%	60
ESPECTRO	3	Espectro IR de cristales purificados	61
ESPECTRO	4	Espectro RMN de cristales purificados	62
ESPECTRO	5	Espectro de masas de los cristales purificados	63
ESPECTRO	6	Espectro de masas de los cristales purificados	64

LISTA DE FORMULAS

			pag.No.
FORMULA	1	Glaucarubina	58
FORMULA	2	Glaucarubol	58
FORMULA	3	Glaucarubinona	58
FORMULA	4	Ailantinona	58

LISTA DE GRAFICAS

			pag.No.
GRAFICA	1	50

I. GENERALIDADES

A. INTRODUCCION

La torta de semilla de aceituno (Simarouba glauca) es un residuo industrial con un alto contenido proteico (65%), el cual no puede ser utilizado en la nutrición humana o animal, por poseer principios amargos y tóxicos.

En el presente trabajo se aislaron e identificaron algunos de estos principios con objeto de obtener datos experimentales básicos, para tratar de eliminarlos y poder, así, utilizar la torta con fines alimenticios.

Generalmente se ha visto que los compuestos que son tóxicos a dosis excesivas, poseen un potencial medicinal a bajas concentraciones, por lo que se trató de identificar los compuestos aislados y efectuar experiencias para investigar toxicidad.

Se utilizó como materia prima, para el inicio de este trabajo, el residuo industrial que proviene de las semillas de aceituno (Simarouba glauca), que fueron sometidas previamente al proceso de extracción de la grasa, en la Fábrica de Aceites El Dorado S.A.

Los objetivos de este trabajo son: extraer, aislar e identificar, los principios amargos y tóxicos presentes en la torta de

semilla de aceituno (Simarouba glauca), a fin de contribuir a los estudios para eliminar su toxicidad y llegar a utilizarla con fines alimenticios; asimismo, continuar con los estudios fitoquímicos de las especies de la flora nacional que se realizan en el Departamento de Investigación Aplicada y Tesis -- Profesionales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

B. DESCRIPCION DE LA PLANTA

Nombre Científico: Simarouba glauca

Familia: Simaroubaceae

Nombre Vulgar: Aceituno

El aceituno es un árbol de tamaño pequeño o mediano que puede alcanzar hasta 15 mts. de altura, con un tronco glabro de 30 cms. de diámetro, aproximadamente. Se cultiva por lo general, en tierra caliente (desde el nivel del mar hasta más o menos 500 metros de altitud).

Las hojas son pinnadas y presentan de 10 a 20 folíolos coriáceos, oblongo-obovados o estrechamente oblongos, de 5 a 10 -- cms. de largo, por lo general; ápice redondeados y base aguda; haz verde lustroso y envés verde pálido.

Las flores son pequeñas y están reunidas en panículas grandes, a menudo, más largas que las hojas.

El fruto es una drupa ovoide de 1.5 a 2.0 cms. de largo, rojo reluciente primero, tornándose negro cuando madura. (1)

C. USO INDUSTRIAL DE LA SEMILLA DE ACEITUNO

Bajo condiciones de extracción industrial, la almendra de aceituno rinde aceite en una proporción de, aproximadamente, un -- 62% de su peso, aunque los límites de variación en su contenido de aceite, bajo condiciones óptimas en el laboratorio y en base seca, indican, a menudo, valores mucho más altos que este porcentaje.

Para la extracción del aceite se utiliza un proceso continuo de compresión de la almendra con un 20% de cáscara de aceituno o un porcentaje igual de torta para funcionar como almohada, lo cual aumenta el porcentaje de extracción. Antes de pasar a los expulsadores de aceite, la almendra es calentada hasta 38°C en un acondicionador que está unido al expulsador. La producción de aceite por este método es de 62%, por peso, de la almendra entera.(2) (3)

(1) Standley, P.C. and Steyermark, J.A. Flora Of Guatemala. Chicago Natural History Museum, Vol.24 part V. 1946, p.433.

(2) Armour, R.P. Investigaciones sobre Simarouba glauca Dc. (Aceituno) en El Salvador, H. de Sola e Hijos, 1953, pp.22-26.

(3) Armour, R.P. Investigaciones on Simarouba glauca Dc. in El -- Salvador, Economic Botany, 13: 41-66, 1959.

El aceite, después de la extracción, se neutraliza con solución alcalina suave, se lava, se seca, se blanquea, se filtra y se deodoriza, se enfría a 12°C y se envasa en recipientes para su distribución comercial. En el comercio nacional el producto se conoce con el nombre de Manteca Vegetal "Nieve". La grasa de aceituno no requiere hidrogenación, ya que el producto final se mantiene firme hasta 27-28°C. por lo que no necesita refrigeración (4) (5).

Los residuos (torta) del proceso de extracción de aceite de aceituno, tienen un sabor marcadamente amargo y son tóxicos para humanos y animales. Estos contienen un alto porcentaje de proteína, aproximadamente 64% (60-65%), con base a su peso. se ha tratado, sin lograrlo, de ver la posibilidad de que este producto pudiera tornarse útil como forraje, para ganado, después de extraer los principios tóxicos y amargos y determinar, a la vez, si dichos elementos pudieran utilizarse comercialmente en otra forma (*) (**). Debido a la presencia de los elementos tóxicos, se ha tratado de usarla como abono orgánico, cuyos resultados no han sido satisfactorios ya que al aplicarla marchita a las plantas(***) .

Hasta el momento no se han desarrollado métodos industriales para la detoxificación de la torta de aceituno. Este factor continúa limitando el uso de este sub-producto que, sin duda, podría ser la base de una industria, la cual sería decisiva para el futuro cultivo del aceituno y de la alimentación en El Salvador.

(4) Armour, R.P. Investigaciones sobre Simarouba glauca Dc.(Aceituno) en El Salvador, Op.Cit.pgs.22-26

(*) Ibid.

(5) Armour, R.P. Economic Botany, 13:41-66, 1959.

(**) Ibid.

(***) De Sola, E. Comunicación Personal.

II.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

A. MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO

1.- Materiales

- Harina de torta de semilla de aceituno
- Agua destilada
- Eter de petróleo: Merck art.1775
- Metanol: Merck art.6009
- Etanol
- Cloroformo: Merck art.245
- Sílica Gel GF 254 Tipo 60: Merck art.7730
- Benceno: Merck art.1783
- Acetona: Merck art.14
- Butanol: Baker Analyzed'art.9054
- Acido acético: Merck art.90062
- Cloruro de cobalto: Merck art. 2539
- Acido sulfúrico: Mallinckrodt art. 2876
- Amoníaco: Merck art. 5432
- Nitrato de bismuto básico: Merck art.1878
- Yoduro de potasio: Merck art.5043
- Acido cloroplatínico: Baker Analyzed'Reagent art. 2898
- Celite Filter aid: Fisher Scientific Co.art.C 211
- Acido clorhídrico: Merck art. 319
- Norit A: Pfanstiehl Laboratories, Inc.
- Alcohol Isopropílico: Merck art. 963
- Sílica Gel con indicador de humedad(silicagel azul):Merck art. 1925.

- Acetato de Plomo Trihidratado: Merck art.7375
- Sulfato de sodio Anhidro: Merck 6649
- Acetonitrilo: Baker Analyzed'Reagent art. 9011
- Hipoclorito de sodio comercial (lejía)
- Patrón de Glaucarubina (*)
- Patrones de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂ (**)

2.- Animales de experimentación

- Chimbolos, peces del género Mollienesia.

3.- Equipo

- Material de vidrio
- Sistemas Soxlet para 1.000 mls. y 250 mls.
- Balanza analítica Metler
- Papel filtro corriente
- Papel filtro Whatman No.1, 41 y 42
- Calentador eléctrico múltiple (Multi-Hot Plate GCA/Preci
sión Scientific No.cat.65500)
- Aparato de baño de vapor Fisher
- Calentador eléctrico con agitación (Magnetic Stirrer Reichrt
275949)
- Evaporador U.S. Pat. 2.865.445 Buchler Instruments Fort Lee
N.Y.USA.

(*) Proporcionado por: Dra. J. Polonsky, del Institut de Chimie des -
Substances Naturelles, France.

(**) Proporcionado por: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria -
(C.E.N.T.A.) El Salvador.

- Cromatoplacas de 20 x 20 cms.
- Cámaras de vidrio
- Lámpara de luz ultravioleta UVSL-25 onda corta 254 nm.
y onda larga 366 nm.
- Frasco atomizador (Reagent Sprayers, Aerosol, Camg --
Uni-Spray)
- Aparato para hacer placas cromatográficas (6)
- Aparato para determinar puntos de fusión con capilares
(Melting Point Unit- Thomas Hoover)
- Kofler (Reichert)
- Pistola de vacío (Vacum Dryer, Corning 3690)
- Trompa de agua
- Bomba de vacío (Air Pump, pressure/Vacuum Gast Oilless
Diaphragm Tipe)
- Espectrofotómetro de infrarrojo, Perkin-Elmer
- Licuadora Eléctrica: Osterizer
- Micropipetas de 50 ul: Biomeca Tupe 2050
- Microjeringas de 10 ul y 100 ul: Hamilton Co. Reno Nev.
701- N- 80300 y 750- N- 80800
- Vibrador: Fisher Scientific, cat. No.12-812 Vortex Genie

(6) Stahl, E. Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook. 2th. ed. New York, Translated by M.R.F. Aghworth. Springer. 1969, - p. 55.

B.- METODOS Y PROCEDIMIENTOS

1.- Preparación de la muestra

La harina se hizo pasar por dos tamices: Primero uno de malla No.3.5 y luego otro de malla No.4

2.- Determinación del porcentaje de grasa en la harina de la torta de semilla de aceituno

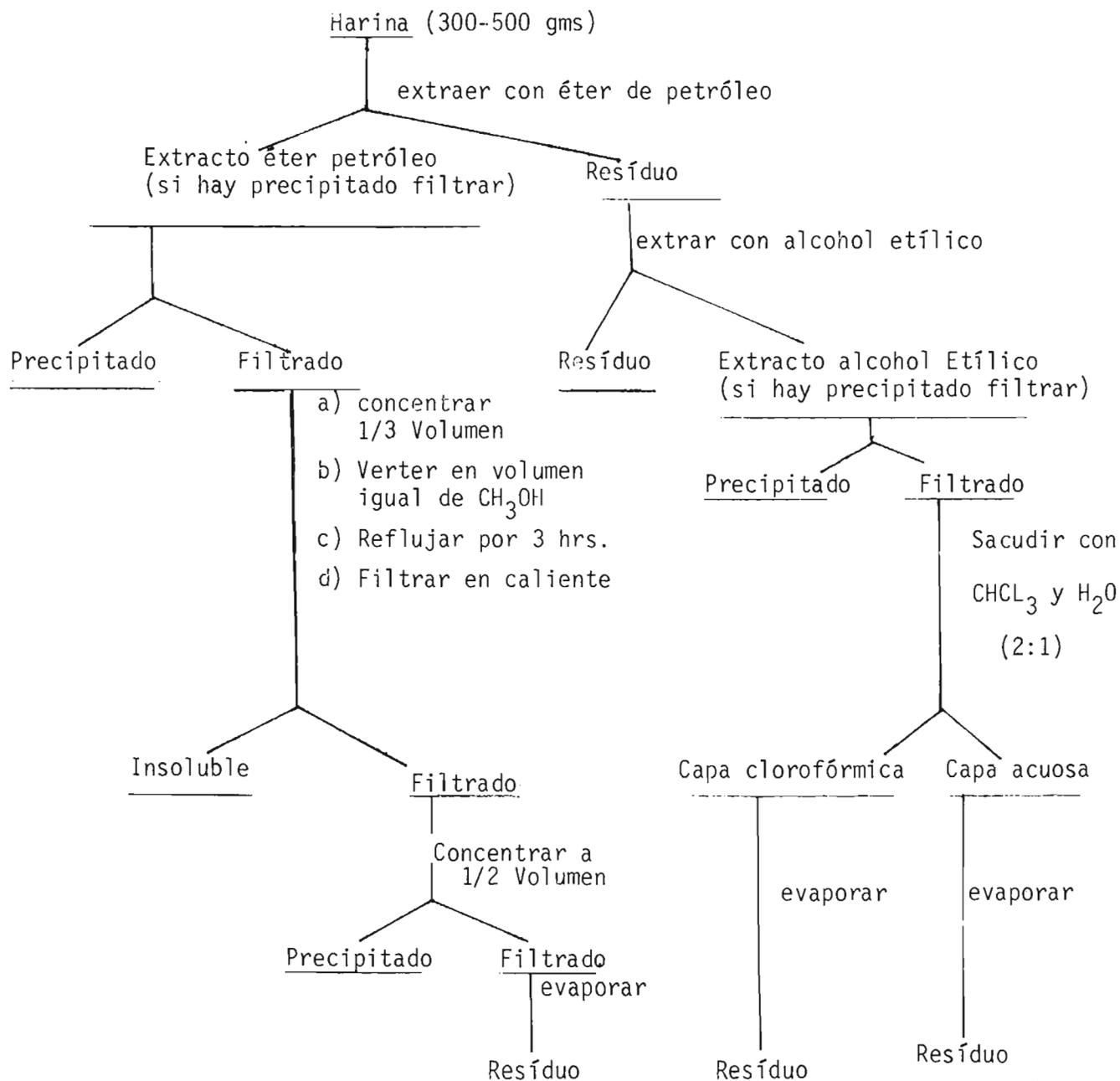
El Método seguido fue el especificado en el A.O.C.S.(7)

El resultado de esta determinación aparece en la pag.29.

(7) Official and Tentative Methods of the American Chemists' Society
(A.O.C.S.) 3th. ed. revised april 1954.

3.-Análisis fitoquímico preliminar

Según la marcha de la Fig.1, se efectuaron extracciones con solventes en orden de polaridad creciente para luego tratar de efectuar separaciones cromatográficas .

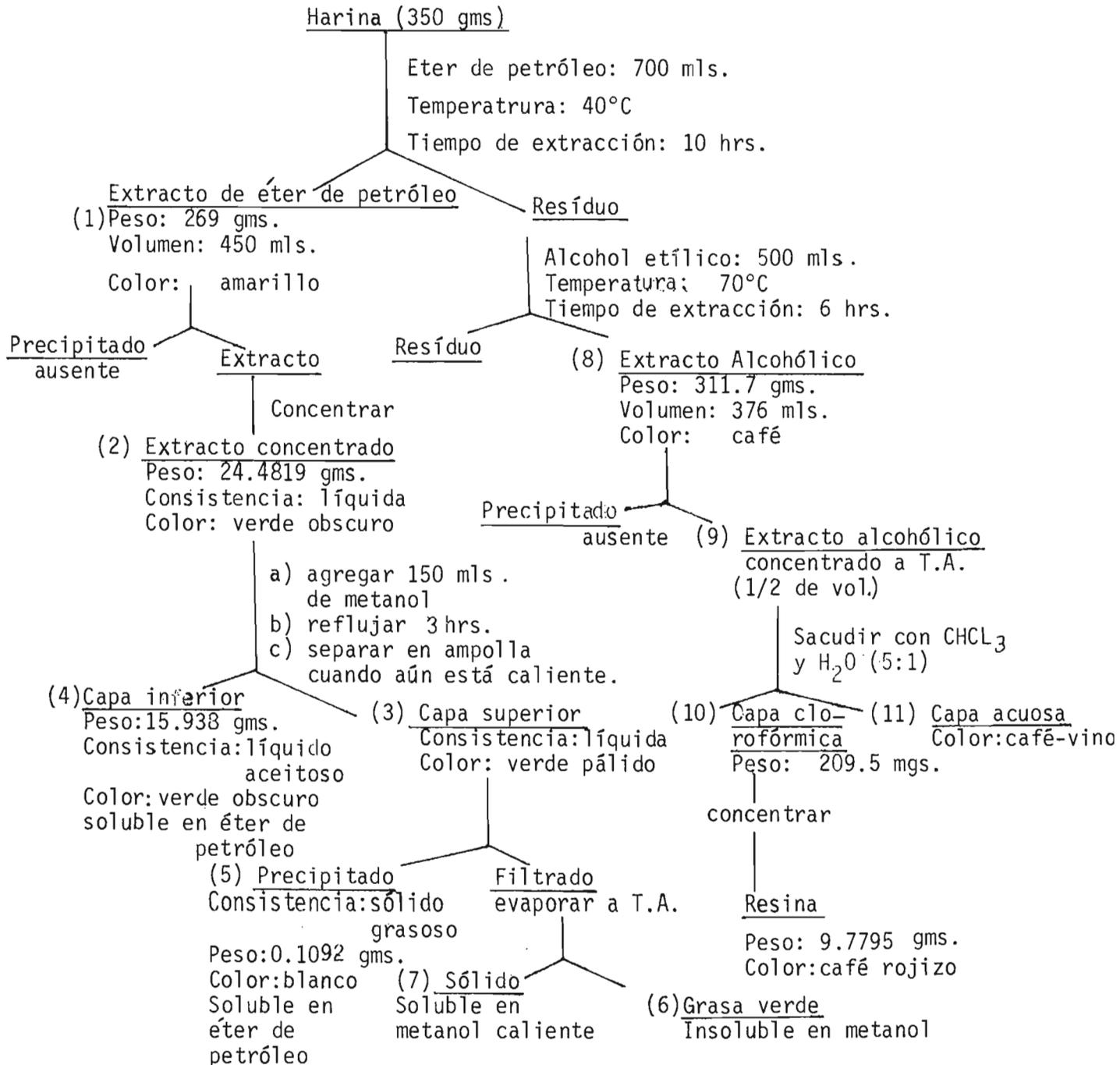


F I G U R A 1

Marcha de extracción con solventes en orden de polaridad creciente

a. Extractos obtenidos .

Inicialmente se trató de seguir la marcha de la fig.1 pero durante la experiencia se dieron algunas variaciones que se resumen en la marcha de la Fig.2.



F I G U R A 2

Marcha de extracción con solventes en orden de polaridad creciente (Modificada).

b. Cromatografía en capa fina de los extractos

1) Preparación de las placas de sílica gel.

Se empleó la técnica de cromatografía en capa fina con -
placas de sílica gel de 20 x 20 cms. y se usó tres
tipos de mezclas de solventes de polaridad ascendente.

2) Mezclas de solventes de polaridad ascendente.

I. Benceno - cloroformo 9:1

II. Benceno - acetona 2:1

III. Butanol - acético - agua 8:2:1

Las cámaras se preparaban con 50 mls. de cada mezcla, en
las que se colocaban 2 placas, cada vez para ser desarro-
lladas.

3) Reveladores .

Se usaron los siguientes reveladores:

a.- Luz ultravioleta, onda corta (OC) 254 nm. y onda larga -
(OL) 366 nm.

b.- Cloruro de cobalto (8)

c.- Vapores de amoníaco

d.- Reactivo de dragendorff (*)

e.- Disolución de yodoplatínico (**)

(8) Domínguez, X.A. Cromatografía en papel y en capa delgada, OEA.
1975 (Monografía No.16) p.63

(*) Ibid. p.59

(**) Ibid.

4) Método.

Las once fracciones obtenidas, en la marcha de la Fig.2, se desarrollaron con los tres tipos de mezclas de solventes y se les aplicaron los distintos reveladores indicados. Se observó el número y el color de las manchas en cada una de las once fracciones.

Los cromatogramas se revelaron rociando las placas con ayuda de frascos atomizadores adaptados a una bomba de presión.

Cuando fue necesario calentar las cromatoplasmas, para revelarlas, se hizo a 100-110° C.

Los Cuadros I, II y III y las Figs. 4-9, resumen los resultados.

4.- Métodos de extracción .

a. Se ensayó la extracción del principio amargo según el método por Ham, E.A. et al (10). (Extracción con agua). Se tomaron 250 gms. de harina de torta de aceituno, a la cual se le agregaron 2.000 mls. de agua destilada y se dejó en contacto durante 16 horas; a continuación se calentó a 70-75°C, durante 3 horas, en un calentador eléctrico con agitación (Magnetic Stirrer Hot Plate); luego se le agregaron 75 gms. de celite y, aún caliente, se fil--tró la mezcla; el residuo se lavó con 250 mls. de agua destilada caliente y fue agregado al filtrado. El fil--trado se refrigeró. El material sólido fue tratado, una segunda vez, con 2.000 mls. de agua destilada que conteña 0.9 mls. de ácido acético glacial, y se procedió en igual forma que en la primera extracción.

Los extractos, que eran de color amarillo naranja, se mezclaron, se refrigeraron toda la noche y se filtraron. Se concentraron en cápsula de porcelana en baño maría, hasta que se obtuvo un residuo café resinoso, al cual se le agregó metanol caliente, se calentó suavemente, se le --agregó carbón (Norit A) y se filtró sobre papel Whatman No.1. El filtrado se dejó cristalizar.

(10) HAM, E.A. et al "Structural studies on glaucarubin from Si
marouba glauca", J.Amer.Chem.Soc., 76:6066-6068, 1954.

Los cristales se separaron por filtración y se lavaron con metanol a temperatura ambiente. Se recrystalizaron en 100 mls. de metanol caliente; se separaron del licor madre, se secaron y se pesaron, obteniéndose 0.7996 gms. De los filtrados y líquidos de lavado se recuperaron más cristales, que fueron recrystalizados, secados y pesados (0.8808 gms.).

Se obtuvo un total de 1.6804 gms. (p.f. 266-268) que corresponde a un rendimiento de 0.67%. Los cristales fueron recrystalizados y secados en una pistola de vacío - utilizando vapores de alcohol etílico, hasta punto de fusión constante.

- b. Se ensayó la extracción de la sustancia tóxica, según método citado por Armour, R.P. (11) (Extracción con alcohol isopropílico al 65%).

Se tomaron 270 gms. de harina de torta de semilla de aceituno y fueron sometidos a un proceso de extracción en un soxlet, con 700 mls. de alcohol isopropílico al 65% durante 15 horas. El Material sólido se extrajo una segunda vez con 500 mls. de alcohol isopropílico al 65% durante 10 horas.

Ambos extractos se reunieron y se concentraron en baño maría, en una cápsula de porcelana hasta que se obtuvo

(11) Armour, R.P. Investigaciones sobre Simarouba glauca Dc. (Aceituno) en El Salvador, Op. Cit. p. 59

un residuo café oscuro resinoso, el cual se disolvió en acetona al 80% caliente y se le agregó carbón (Norit A). Se filtró y se dejó cristalizar toda la noche. Se separaron los cristales del licor madre, se secaron, y se re-cristalizaron, dos veces más, con acetona al 80% caliente; se secaron y se les determinó el punto de fusión(256-258°C).

Con los cristales aislados por los métodos a) y b) se efectuaron reacciones de coloración con H_2SO_4 concentrado, cromatografía en capa fina, cromatografía comparativa en capa fina con patrón de glaucarubina y pruebas de toxicidad.

Con objeto de conocer su estructura se les determinó la rotación óptica a diferentes longitudes de onda (Cuadros VI y VII) y se hicieron los espectros I R, RMN y de masa (Espectros No.1-6).

5.- Determinaciones químicas con los cristales extraídos, tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%.

a. Reacciones de coloración con H_2SO_4 concentrado.

Con los cristales extraídos, se efectuaron reacciones de coloración con ácido sulfúrico concentrado(12)(13). También se observó

(12) Casamada, S.M. Farmacognosia con farmacodinamia, Edit. Científico Médico, 1968, p. 402.

(13) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica, México, Limusa, 1973, p. 182.

el comportamiento de cristales patrón de glaucarubina(*) compuesto amargo de (Simarouba glauca) en presencia de H_2SO_4 concentrado, con objeto de comparar las coloraciones obtenidas. Los resultados aparecen en la pag.42.

b. Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina se realizó con el fin de investigar el comportamiento de los cristales extraídos, tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%, para lo cual se utilizaron los tres sistemas de solvente ya empleados en la cromatografía en capa fina de los extractos (pag.11.); esto se hizo para controlar la pureza de los cristales extraídos, al revelarlos con H_2SO_4 40%; y para conocer si estos cristales son capaces o no de absorber la luz ultravioleta, cuando es usada como revelador, lo mismo para conocer que tipo de mezcla de solventes era más adecuada para eluirlos.

1) Placas y cámaras cromatográficas:

Se prepararon en la misma condición especificada en pag. 11.

2) Mezcla de solventes:

I . Benceno - cloroformo 9:1

II . benceno - acetona 2:1

III . Butanol - acético- agua 8:2:1

(*)Cortesía Dra.J.Polonsky, del Institut de Chemie des substances naturelles, France.

3) Reveladores:

a.- Luz ultravioleta, onda corta (OC) 254 nm.y onda -
larga (OL) 366 nm .

b.- H_2SO_4 40% seguido de calentamiento para revelar
(14).

4) Los cristales se solubilizaron en etanol; algunas ve-
ces fue necesario usar baño maría.

5) Los resultados aparecen en la página 43 y el cuadro -
IV.

c. Cromatografía comparativa en capa fina con cristales pa-
trón de glaucarubina.

Esta experiencia se realizó con objeto de investigar si el
comportamiento de los cristales aislados era semejante al del
patrón de glaucarubina (sustancia amarga del grupo de los
simaroubalidanos), por cuanto se esperaba que, con los mé-
todos de extracción usados, se obtendrían este tipo de -
compuestos como los responsables del sabor amargo.

Se utilizó la mezcla solvente butanol-acético-agua 8:2:1
(que fué la única capaz de eluir a las manchas, por la ex-
periencia de la pag.16) y se reveló con H_2SO_4 40% segui-
do de calentamiento. Los cristales fueron disueltos en eta-
nol.

(14) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica, Op.Cit.
p.182.

- Se corrieron muestras de:

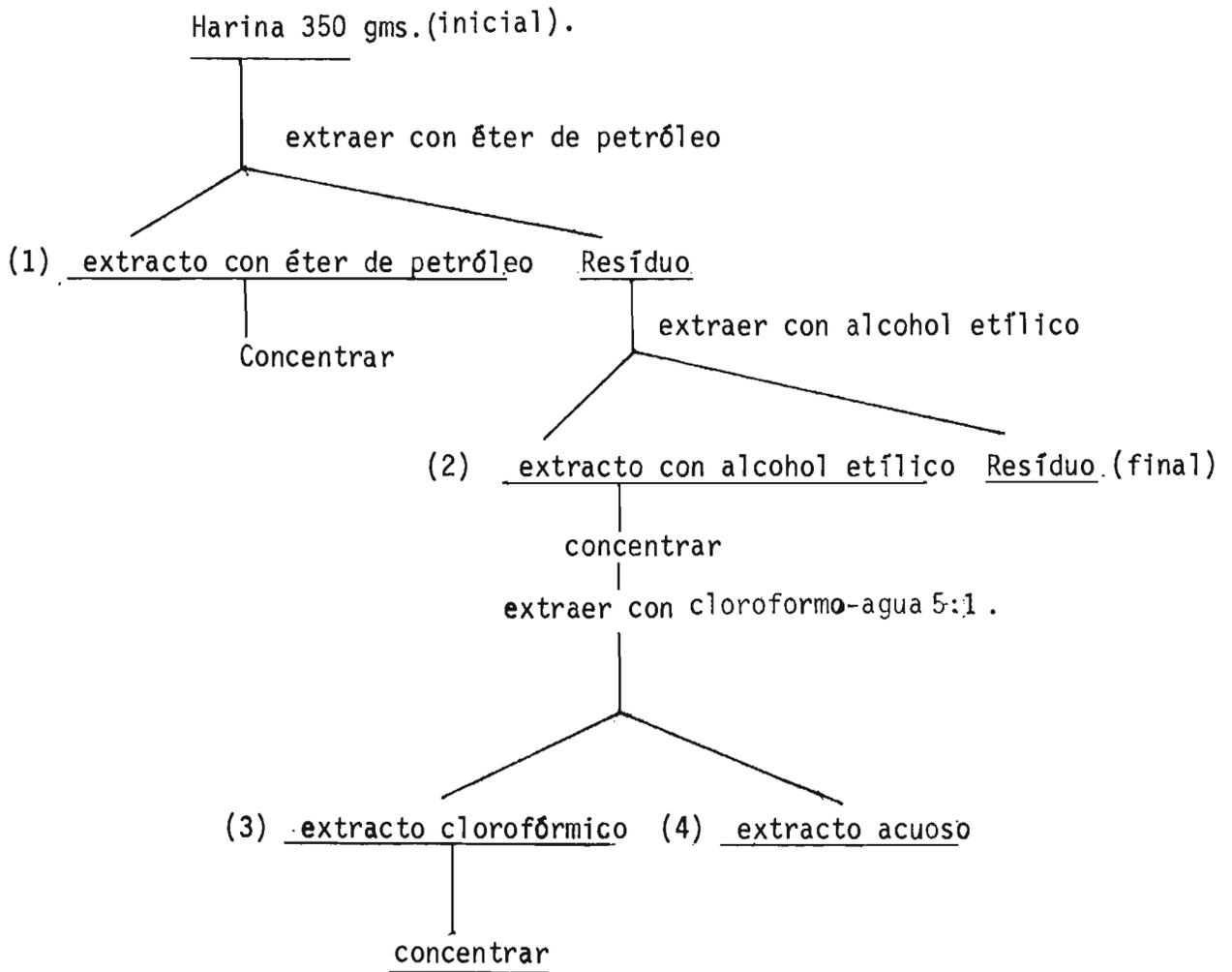
- 1) Cristales extraídos con agua .
- 2) Superposición de las aplicaciones de muestras de: -
cristales extraídos con agua y cristales patrón de
glaucarubina.
- 3) Patrón de glaucarubina .
- 4) Cristales extraídos con alcohol isopropílico al 65%.
- 5) Superposición de las aplicaciones de muestra de: cris
tales extraídos con alcohol isopropílico al 65% y cris
tales Patrón de glaucarubina .
- 6) Patrón de glaucarubina.

- Los resultados aparecen en el cuadro V.

6. Pruebas de toxicidad.

a.- Preparación de los extractos .

1) Se prepararon extractos a partir de la harina de la torta de semilla de aceituno, según la marcha de la Fig.3 .



F i g u r a 3

Marcha de prepración de los extractos para las pruebas de toxicidad

- 2) Se efectuaron pruebas de toxicidad con: la harina sin ningún tratamiento (harina inicial), el residuo (harina final), los extractos 1,2,3,4 (ver fig.3) y los cristales extraídos con agua y los extraídos con alcohol isopropílico al 65%.
- 3) Los extractos fueron concentrados en un rotavapor (U.S.P. - Buchler Instruments Fort Lee, N.Y. U.S.A.) y al final en baño maría, hasta que se eliminó totalmente el solvente para que no interfiriera en la prueba.
- 4) Las cantidades usadas en cada muestra fueron de 5 ppm., 10 ppm. y 500 ppm., que fueron calculadas en base a un volumen de 100 cc. de agua destilada.
- 5) Las muestras líquidas y las resinosas fueron pesadas sobre vidrio de reloj y luego, con ayuda de agua destilada, transferidas al depósito en que se efectuaría la prueba (beaker de 100 cc).
- 6) Una vez colocada la cantidad de muestra en los 100 cc. de agua destilada, se calentaron durante 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- 7) Los animales de experimentación fueron: chimbolos del género Mollienesia de la familia Poeciliidae (ver pag.22) .
- 8) Se usaron 3 peces por cada muestra, los cuáles fueron separados

del resto y no se les dio ningún alimento 24 horas antes de la prueba.

- 9) Para cada prueba se llevó control (Peces y agua destilada hervida y fría).
- 10) Todos los beakers en que se efectuaron las pruebas fueron - tapados con una gasa sostenida con un hule para evitar que los peces se salieran del depósito.
- 11) Los resultados corresponden a las lecturas efectuadas despues de 12, 24, 36 y 48 horas, por observación de la muerte de los especímenes.
- 12) El resumen de los resultados aparece en los cuadros VIII, IX y X .

- b. Descripción y método de recolección de los animales de experimentación para las pruebas de toxicidad (*).

Familia: Poeciliidae
Nombre científico: Mollienesia sp.
Nombre vulgar: chimbolos

Muestreo de los chimbolos:

Lugar: Corinto (Lago de Ilopango, San Salvador)
en las riberas del lago.

Fecha: 15 de mayo de 1977.

Hora: 3:15-5:30 p.m.

Vegetación: Algas abundantes

Método de recolección :

Se utilizó un lumpe, de las siguientes características:
largo 10.0 cms., ancho 7.0 cms., fondo 10.0 cms.,
largo de mango 25.0 cms., efectividad 80% y No. de malla
1.5 mm.

(*) Calderón, M. G. Comunicación personal, Prof. de Ictiología,
Departamento de Biología, Fac. de Ciencias y Humanidades, -
Universidad de El Salvador.

Los peces después de su recolección, fueron mantenidos en un depósito adecuado que contenía algas de la flora del lago y agua corriente de consumo, que había sido recolectada por lo menos, 2 días antes de ser utilizada, para eliminar el cloro. Se alimentaron con comida especial para peces.

Se tomaron 5 ejemplares, que correspondían al 5% de muestreo total, y fueron colocados en formalina al 10%; luego se les eliminó la humedad sobre el papel absorbente y se pesaron, en forma individual en una balanza analítica; asimismo se les determinó la longitud con una regla graduada en milímetros.

LONGITUD ESTANDARD, LONGITUD TOTAL Y PESO PROMEDIO DE
LOS PECES, CHIMBOLOS DEL GENERO Mollienesia.-

Espécimen	Longitud Standard(*) (cms.)	Longitud total (**)(cms.)	Peso (gms.)
No.1	11.0	14.0	0.03169
No.2	10.0	12.0	0.02190
No.3	11.0	14.0	0.03035
No.4	11.0	14.0	0.02606
No.5	10.0	12.0	0.02144
Promedio	10.6	13.2	0.02629

(*) Longitud standard= cabeza - pedúnculo caudal

(**) Longitud total = cabeza - final aleta caudal

7.-Determinación de aflatoxinas en la harina de la torta de semilla de aceituno.

Esta investigación se realizó con el propósito de conocer si las aflatoxinas están presentes en la harina de la torta de semilla de aceituno, ya que podrían contribuir ó ser la causa de la toxicidad de este subproducto.

Las aflatoxinas son MICOTOXINAS, elaboradas por algunos hongos del género Aspergillus, que pueden encontrarse contaminando algunos granos y cereales (de consumo humano y animal) y que se producen sobre los cereales, tanto en los campos de cultivo como cuando ya están almacenados. Las aflatoxinas más conocidas son la B₁, B₂, G₁ y G₂. En general se les conoce como sustancias cancerígenas (15). Se ha reportado una marcada actividad biológica que ocasiona daños renales y hepáticos (16)(17).

(15) Hesseitine, C.W. "Natural occurrence of mycotoxins in cereales". Mycopatología et Micología applicata 53:141-153. 1974.

(16) Sandoval, H.T., Carrera, J., Floreschapa, I. y Jardel, E. "Aislamiento de cepas de Aspergillus sp. productoras de aflatoxinas en alimentos de consumo humano en México", Inv. Salud Pública (México) 36:161-166, 1976.

(17) Hesseitine, C.W. Shotwell, O.L. Ellis, J.J. and Stubblefield, R. D. "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus". Bacteriological Reviews 30:795 - 805, 1966.

Las lesiones hepato-tóxicas que producen las aflatoxinas, son similares a las causadas en ratas, por la harina de torta de se milla de aceituno (18); por esta razón se consideró importante investigar la presencia de aflatoxinas en esta harina.

Para la determinación de las aflatoxinas se practicó el siguiente método, utilizado por el Ministerio de Salud de Costa Rica(19).

a. Método para la determinación de aflatoxinas.

1) Preparación de la muestra:

Se utilizó la harina de la torta de semilla de aceituno, disponible para todas las extracciones.

2) Extracción:

a. Se mezcló 50 gms. de harina con 125 mls. de acetona- - agua 85:15, en una licuadora, durante 3 minutos.

b. La mezcla se filtró en papel filtro Watman No.1 sobre un embudo Buchner.

c. Se transfirió 50 mls. del filtrado a una probeta de 100 mls. y se completó a 90 mls. con agua destilada.

(18) Betancourt, F.R. y Gómez, L.M. "Investigación sobre la toxicidad de la torta de semilla de aceituno silvestre (S.glauca) - en ratas". Trabajo patrocinado por H. de Sola e hijos, s.f. - (Trabajo mimeografiado).

(19) Acuña, D., Benavides, J. y Vega, N. "Analytical G.T. Method - for aflatoxins in corn samples and agricultural commodities", - Ministerio de Salud República de Costa Rica, August 1976.(Edi ción mimeografiada).

- d. La mezcla fue transferida a un beaker y se le adicionó 50 mls. de una solución de acetato de plomo acidificada (*) y 4 gms. de celite. Se agitó por 3 minutos hasta obtener una fase sobrenadante transparente. Se filtró sobre un embudo Buchner.
- e. Se tomó 120 mls. del filtrado y se transfirieron a un embudo separador de 500 mls. que contenía 60 mls. de -- agua, se le agregó 10 mls. de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 3 minutos y se dejó en reposo para -- que las fases se separaran.
- f. Se recolectó 6 mls. de la fase clorofórmica, en una probeta de 10 mls.; para esto se utilizó un embudo pequeño con un papel filtro Whatman No.1 que contenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro. La alícuota se transfirió a un vial 70 x 20 mm. con tapón de rosca.
- g. Se agitó suavemente el embudo separador durante 30 segs.; se dejó separar el cloroformo remanente para descartarlo. Se hizo una segunda extracción con 10 mls. de cloroformo; se recolectó nuevamente 6 mls., en iguales condiciones -- que la primera vez, y se les agregó al vial.

(*) La solución se preparó así: se disolvió 200 gms. de acetato de plomo neutro trihidratado, en agua caliente y se le añadió 3 - mls. de ácido acético glacial; luego se aforó a un lt.

h. Se evaporó, a sequedad, colocando el vial destapado - sobre baño maría .

3) Identificación de las aflatoxinas por cromatografía en capa fina.

- a. Se usó placas cromatográficas 20 x 20 cms.
- b. El extracto desecado, contenido en el vial, fue disuelto con 200 ul. de benceno-acetonitrilo (98:2). La mezcla -- fue agitada en un vibrador (Ficher Scientific cat. No.12-812 Voxter Genie) .
- c. Se aplicó en placas de sílica gel, con ayuda de una micro jeringa, 50 ul. y 100 ul. de la mezcla. Las aplicaciones - se hicieron con una separación que permitió intercalar -- las aplicaciones de los patrones de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en concentraciones de 5 ul. y 10 ul.
- d. Se utilizó, como mezcla eluyente, 40 mls. de acetona-cloro-- formo (1:9). El solvente se dejó correr hasta una altura - de 10 cms. sobre la línea de aplicación.
- e. Las placas se secaron a temperatura ambiente. Las cromato-- placas fueron observadas con luz ultravioleta de onda lar-- ga (365 nm). Se examinó si la muestra presentaba mancha - con igual R_f y fluorescencia que los patrones utilizados.

- f. Todo el material contaminado con aflatoxinas fue convenientemente colocado en hipoclorito de sodio comercial, previamente a su lavado.

III.- R E S U L T A D O S

A. PORCENTAJE DE GRASA PRESENTE EN LA HARINA DE LA TORTA DE SEMILLA DE ACEITUNO.

1.- Datos :

Peso de la muestra: 4.156 gms.

Peso del aceite: 0.3423 gms.

2.- Cálculo:

$$\% \text{ de aceite} = \frac{\text{Peso del aceite} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ de aceite} = \frac{0.3423 \times 100}{4.156}$$

$$\% \text{ de aceite} = 8.2$$

A la harina de la torta de semilla de aceituno se le encontró un 8.2% de grasa residual después de la extracción industrial, que sumado a su alto contenido proteico aumenta las cualidades alimenticias de ella.

B. ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

1.-Identificación de los extractos

La numeración de los extractos se hizo en base a su secuencia de obtención en la marcha de la fig.2; los cuáles se citan en los resúmenes, cuadros y figuras que representan los cromatogramas, con el número que los identifica en esta lista:

<u>NUMERO</u>	<u>NOMBRE</u>
1	Extracto con éter de petróleo
2	Extracto con éter de petróleo ,concentrado
3	Extracto metanólico
4	Capa insoluble en metanol
5	Sólido grasoso soluble en éter de petróleo frío (suspensión)
6	Sustancia grasosa verde
7	Sustancia grasosa verde soluble en metanol caliente
8	Extracto alcohólico
9	Extracto alcohólico, concentrado
10	Extracto clorofórmico
11	Extracto acuoso

2.-Resultados de la cromatografía en capa fina

Se utilizaron tres mezclas eluyentes:

- a. Una poco Polar (Benceno-cloroformo 9:1)
- b. Una de polaridad intermedia (Benceno-acetona 2:1)
- c. Una muy polar (Butanol-acético-agua 8:2:1)

Esto se hizo con el objeto de poder efectuar separaciones cromatográficas por diferencias de polaridad de los compuestos presentes en cada extracto.

El número de manchas fue observado a través del revelado con: Luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366nm); cloruro de cobalto (CoCl_2), vapores de amoníaco (NH_3) que luego se observaron con luz UV; reactivos de Dragendorff y yodoplatino.

A continuación se presentan los resultados de la cromatografía en capa fina de los extractos en cada mezcla eluyente y en el agente revelador respectivo.

a. En Benceno-cloroformo 9:1 (Cuadro I)

Con esta mezcla eluyente, de baja polaridad, se separaron - compuestos que se revelaron con luz UV de onda corta (254nm) y de onda larga (366 nm); de los extractos No.8, 9, 10 y 11 no se revelaron compuestos. Con CoCl_2 (Fig.4) se notó que -- los extractos No.8, 9 y 10 presentaron manchas de color --- azul-violeta lo que pudo indicar la presencia de glicósidos (20). Con vapores de amoníaco, seguido de observación con luz UV, no se reveló ninguna coloración especial, por lo cual se concluye que no habían compuestos tipo flavonoides (21). Con el reactivo de Dragendorff todos los extractos presentaron - manchas de color anaranjado pálido que persistieron por 24 - horas; en los extractos No.3, 7 y 11 la coloración anaranjada se observó en las manchas de aplicación, lo que demostró la presencia de alcaloides (*)(**). Con yodo platino (Fig.7) se observaron manchas rosa pálido en todos los extractos, en los extractos No.8 y 10 se observaron además manchas de color amarillo en los puntos de aplicación; estos resultados indicaron la presencia de alcaloides también(*)(**).

(20) Domínguez, X.A. Cromatografía en papel y en capa delgada, Op. Cit. p.63

(*) Ibid. p.59.

(21) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica, Op. Cit. pp. 84 y 85.

(**) Ibid. pp. 219 y 221.

b. En benceno-Acetona 2:1 (Cuadro II)

Con el eluyente de polaridad intermedia se separaron en todos los extractos, compuestos capaces de absorber luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm); los extractos No.9 y 10 presentaron mayor número de estos compuestos. Con CoCl_2 (Fig.5) los extractos No.8, 9 y 10 presentaron manchas color azul-violeta, lo que pudo indicar la presencia de glicósidos (22). Con vapores de amoníaco, seguido de observación con luz UV, no se reveló la presencia de ninguna coloración especial. Se concluyó que no estaban presentes compuestos tipo flavonoides (23). Con Dragendorff todos los extractos presentaron manchas anaranjadas que persistieron por 24 horas; todas las manchas, en el lugar de aplicación, se observaron de color anaranjado; los resultados demostraron la presencia de alcaloides (*) (**). Con yodo platino (Fig.8) se observaron manchas de color rosa pálido que demostraron, también, la presencia de alcaloides (*) (**).

(22) Domínguez, X.A. Cromatografía en papel y en capa delgada, Op. Cit.p.63

(*) Ibid. p. 59

(23) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica Op.Cit. pp. 84 y 85 .

(**) Ibid. pp. 219 y 221.

c. En Butanol-Acético-Agua 8:2:1 (Cuadro III)

Con esta mezcla eluyente muy polar se separaron, en todos los extractos, compuestos capaces de absorber luz UV a onda corta (254 nm) y a onda larga (366 nm); los compuestos separados en los extractos No.8, 9, 10 y 11 presentan manchas bien definidas y de coloraciones especiales (violeta, azul brillante y verde brillante); estos resultados permitieron concluir que con el eluyente Butanol-acético-agua 8:2:1, fue posible separar los extractos compuestos que pudieron diferenciarse por su absorción de luz U.V. Con CoCl_2 (Fig.6), se observó que los extractos No.10 y 11 presentaron compuestos diferentes; en los extractos No.8, 9, 10 y 11 se observaron manchas bien definidas y decoloraciones: azul-verdoso, gris piedra, violeta, café y rosado, lo que puede indicar la presencia de glicósidos (24). Con vapores de amoníaco (NH_3), seguido de observación con luz UV a onda corta (254 nm) y onda larga (366 nm) no se reveló ninguna coloración especial, por lo cual se concluye que no habían compuestos tipo flavonoides (25). Con Dragendorff todos los extractos presentaron manchas anaranjadas que persistieron por 24 horas; en el extracto No.11 se observó únicamente en la mancha de origen, la coloración anaranjada. Los resultados -

(24) Domínguez.X.A. Cromatografía en papel y en capa delgada, Op. Cit. p.63 .

(25) Domínguez,X.A. Métodos de investigación fitoquímica, Op.Cit pp.84 y 85.

evidenciaron la presencia de alcaloides (*) (**). Con yodo platinado (Fig.9), el extracto No. 10 presentó compuestos que no aparecieron en el extracto No.11; en todos los extractos se observaron manchas de color rosa pálido y los extractos No.9 y 11 presentaron manchas azul violeta, amarillo y violeta. Los resultados evidenciaron también, la presencia de alcaloides (*)(**).

(*) Ibid. p.59

(**) Ibid.pp. 219 y 221

C U A D R O I

Cromatografía en capa fina de los extractos

SOLVENTE I : BENCENO-CLOROFORMO 9:1						
EXTRACTO No.	NUMERO DE MANCHAS REVELADAS CON:					
	LUV		CoCl ₂	VAPORES DE NH ₃	DRAGENDORFF	YODOPLATINO
	OC	OL				
1	2	1	6	-	1	2
2	2	1	6	-	1	2
3	-	1	5	-	-	1
4	3	1	6	-	1	2
5	3	1	5	-	1	2
6	3	1	6	-	1	2
7	-	1	4	-	-	2
8	-	-	6	-	1	-
9	-	-	8	-	1	3
10	-	-	6	-	1	2
11	-	-	-	-	-	-

LUV= Luz ultravioleta; OC = Onda corta (254 nm); OL=Onda larga (366 nm).

C U A D R O II

Cromatografía en capa fina de los extractos

SOLVENTE II: BENCENO-ACETONA 2:1						
EXTRACTO No.	NUMERO DE MANCHAS REVELADAS CON:					
	LUV		CoCl ₂	VAPORES DE NH ₃	DRAGENDORFF	YODOPLATINO
	OC	OL				
1	1	1	5	-	1	1
2	1	1	5	-	-	1
3	1	1	5	-	1	1
4	1	1	2	-	1	1
5	1	1	3	-	1	1
6	1	1	5	-	1	1
7	-	-	6	-	1	1
8	2	2	5	-	1	-
9	6	4	10	-	2	7
10	7	4	8	-	2	3
11	2	-	1	-	-	-

LUV= Luz ultravioleta; OC= Onda corta(254nm); OL=Onda larga (366 nm).

C U A D R O III

Cromatografía en capa fina de los extractos

SOLVENTE III: BUTANOL-ACETICO-AGUA 8:2:1						
EXTRACTO No.	NUMERO DE MANCHAS REVELADAS CON:					
	LUV		CoCl ₂	VAPORES DE NH ₃	DRAGENDORFF	YODOPLATINO
	OC	OL				
1	1	1	1	-	1	1
2	1	1	1	-	1	1
3	1	1	1	-	1	1
4	1	1	1	-	1	1
5	1	1	2	-	1	1
6	1	1	2	-	1	1
7	1	1	2	-	1	1
8	8	4	9	-	4	9
9	8	2	6	-	ESTELA	9
10	7	3	8	-	4	4
11	6	4	6	-	-	7

LUV= Luz ultravioleta; OC=Onda corta (254 nm); OL=Onda larga (366 nm) .

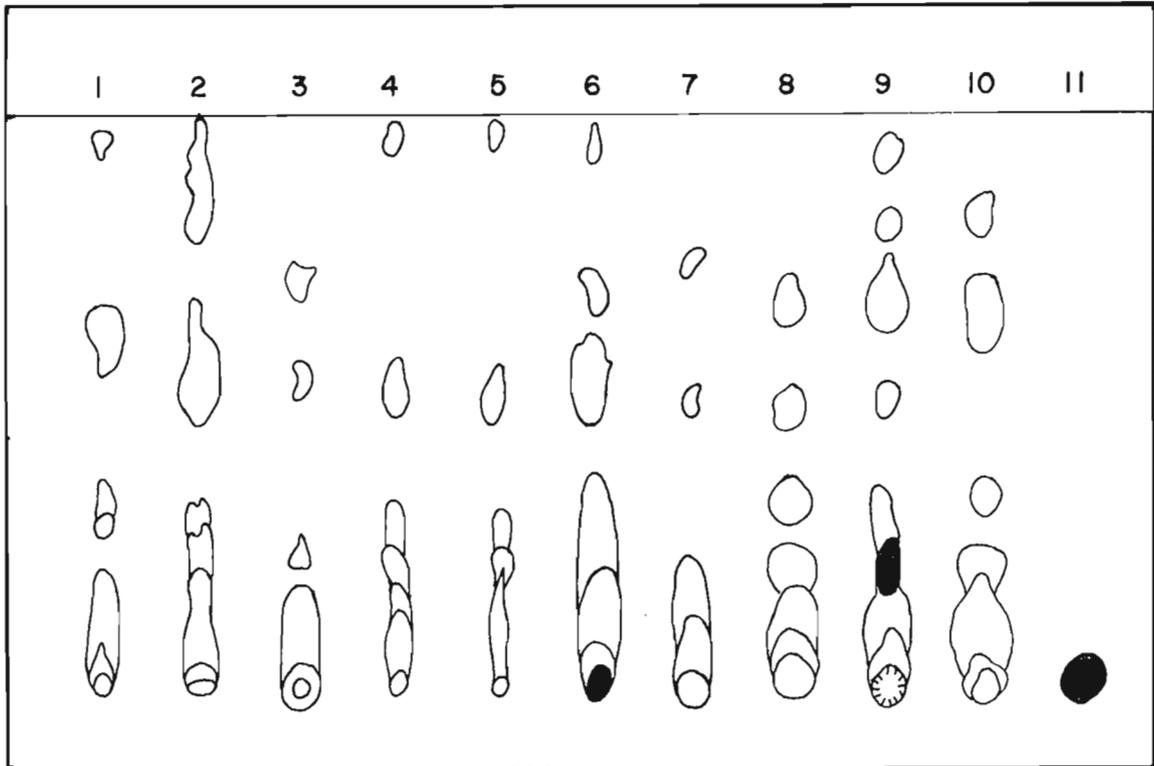


FIG. 4

Cromatograma Benceno - Cloroformo 9 : 1
Revelado con Cloruro de Cobalto.

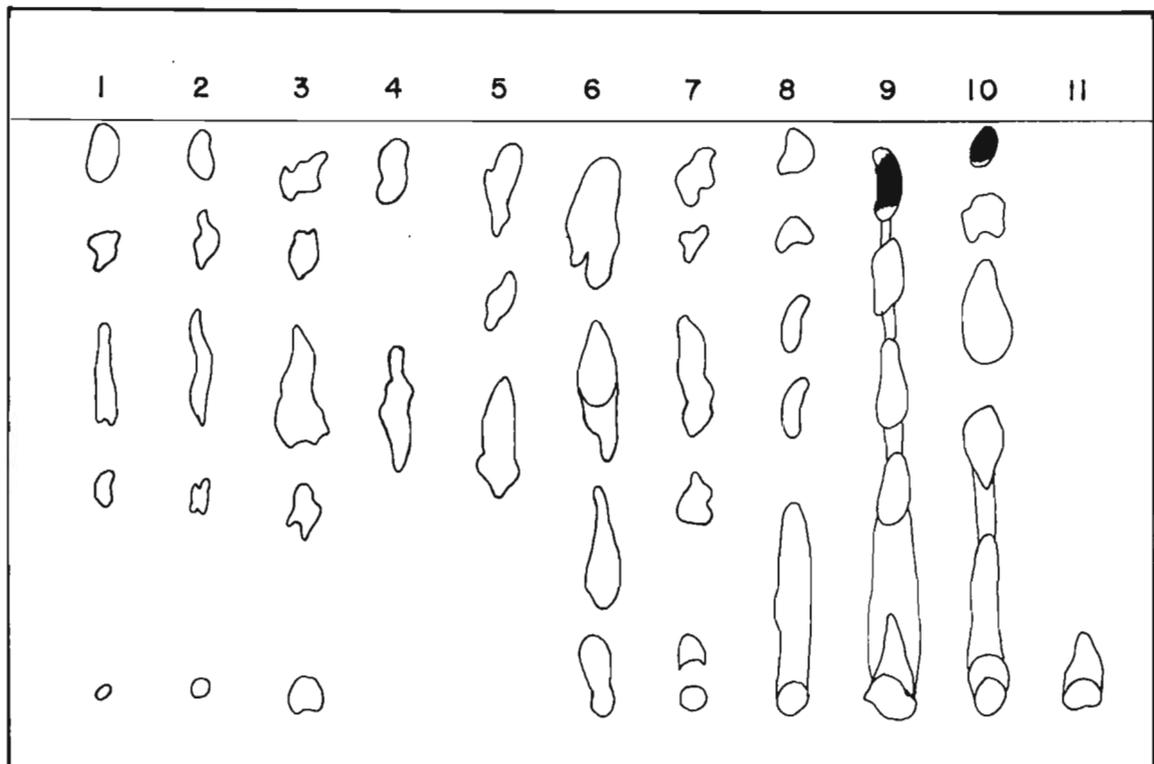


FIG. 5

Cromatograma Benceno - Acetona 2 : 1
Revelado con Cloruro de Cobalto.

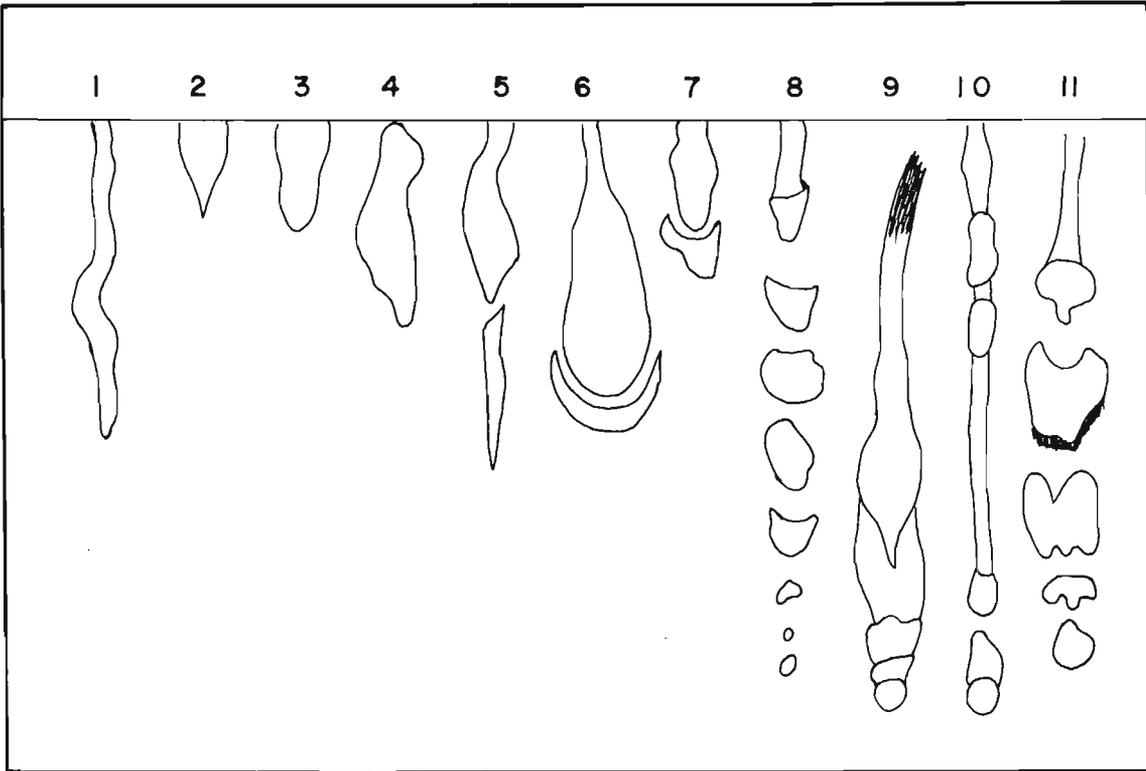


FIG. 6

Cromatograma Butanol - Acético - Agua 8 : 2 : 1
Revelado con Cloruro de Cobalto.

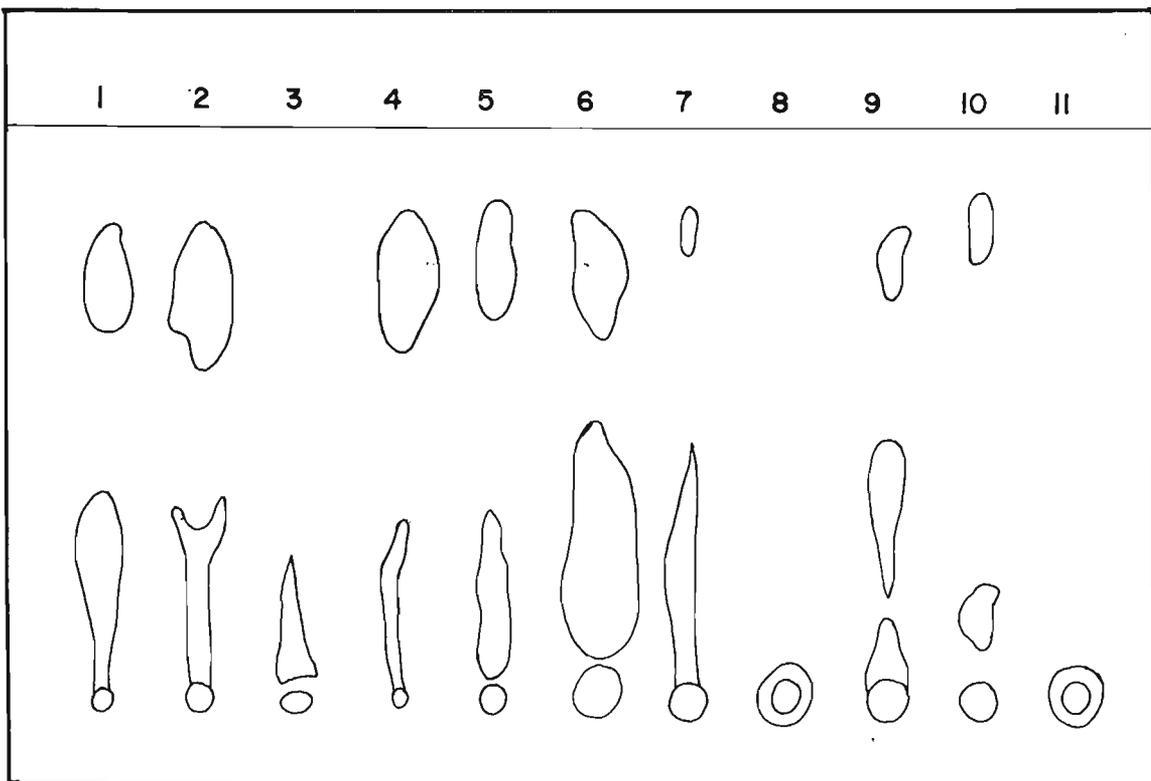
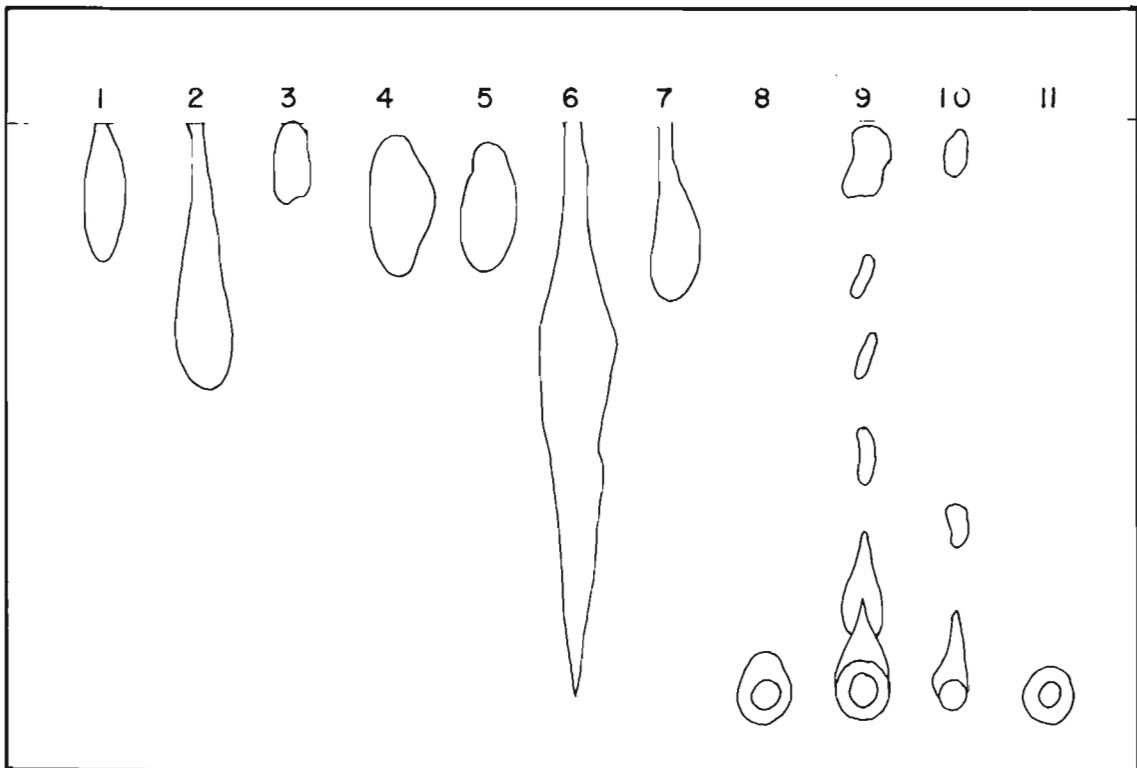
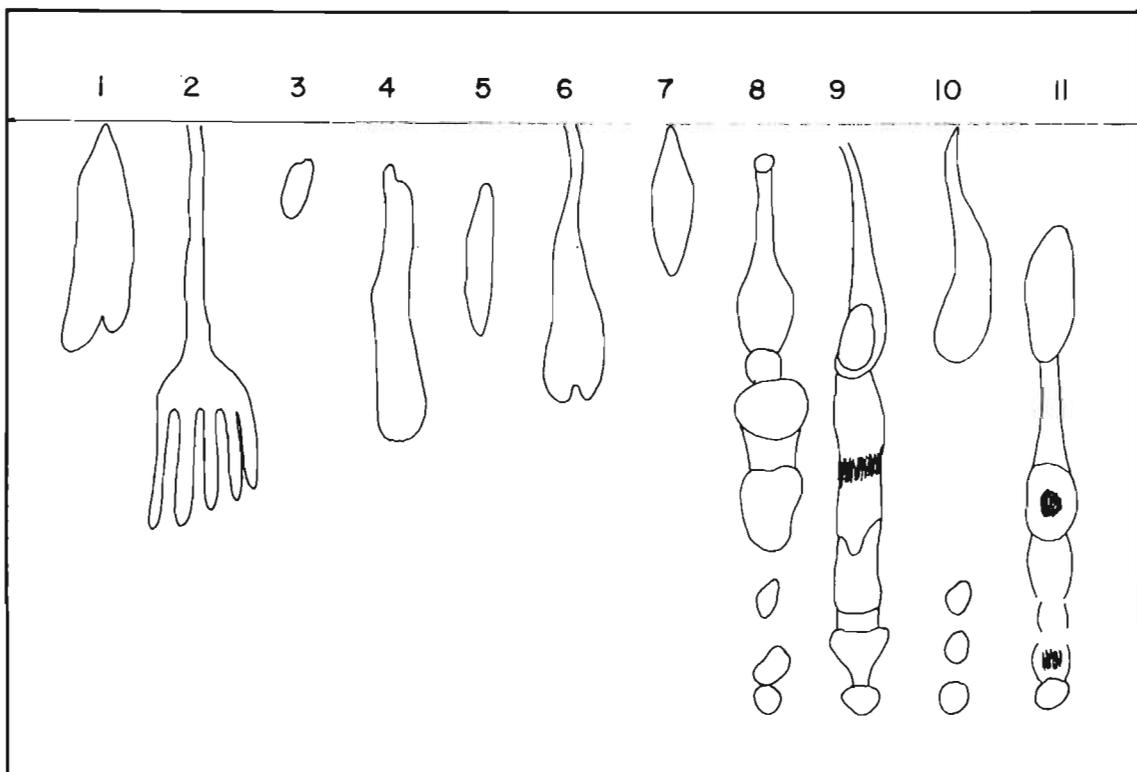


FIG. 7

Cromatograma Benceno - Cloroformo 9 : 1
Revelado con yodoplatinato.



Cromatograma Benceno - Acetona 2:1
Revelado con yodoplatinato.



Cromatograma Butanol - Acético - Agua 8:2:1
Revelado con yodoplatinato.

C. DETERMINACIONES QUIMICAS DE LOS CRISTALES OBTENIDOS TANTO
CON AGUA COMO CON ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%.

1.- Resultados de las reacciones de coloración con H₂SO₄ con-
centrado .

- a. En los cristales extraídos con H₂O al ponerlos en contacto con el ácido sulfúrico concentrado, se observó una coloración violeta, que tornó a café rojizo y luego llegó a amarillo.
- b. En los cristales extraídos con alcohol isopropílico al 65% al ponerlos en contacto con ácido sulfúrico concentrado, se observó una coloración violeta, que tornó a café rojizo y llegó a amarillo.
- c. En los cristales de glaucarubina al ponerlos en contacto con ácido sulfúrico concentrado se observó una coloración violeta que tornó a café rojizo y llegó a amarillo.

Estos resultados indicaron que los cristales extraídos - dieron la misma reacción que la glaucarubina en presencia de H₂SO₄ concentrado (26).

(26) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica, Op.Cit p. 182.

2.-Resultados de la cromatografía en capa fina

a. En benceno-cloroformo 9:1 (eluyente de baja polaridad).

Al revelar con: luz UV (Onda corta y Onda larga) no se observó nada y, con H_2SO_4 40% y calentamiento se observó que los compuestos no corrieron.

b. En benceno-acetona 2:1 (eluyente de polaridad intermedia).

Al revelar con luz UV no se observó nada; con H_2SO_4 40% y calentamiento se observó que los compuestos no corrieron.

c. En butanol-acético-agua 8:2:1 (eluyente de alta polaridad).

Al revelar con luz UV (onda corta y onda larga) no se observó nada; con H_2SO_4 40% y calentamiento se observaron 2 manchas de color café oscuro, que correspondían a los cristales extraídos con agua y a los extraídos con alcohol isopropílico al 65%, los cuáles presentaron el mismo Rf. (0.82)

(Cuadro IV).

d. Resultado de la cromatografía comparativa con el patrón de glaucarubina, usando como mezcla eluyente butanol-acético-agua 8:2:1.

Al revelar con luz UV (onda corta y onda larga) no se observó nada; con H_2SO_4 40% y calentamiento, se observó para cada muestra, manchas únicas de color gris-negro y de igual Rf al

patrón de glaucarubina (0.71 para los extraídos con H_2O y 0.72 para los extraídos con alcohol isopropílico al 65%); las determinaciones fueron hechas en dos cromatoplasas diferentes (Cuadro V).

En resumen los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%, sólo corrieron al usar un sistema eluyente muy polar (Butanol-acético-agua 8:2:1), y no fueron revelados con luz UV; al revelarse con H_2SO_4 40% se obtuvo igual Rf (0.82). Cuando fueron comparados a cristales patrón de glaucarubina, usando como eluyente: Butanol-acético-agua 8:2:1 y revelando con H_2SO_4 40% más calor, mostraron manchas de iguales Rf que el patrón de glaucarubina (0.71 para los cristales extraídos con agua y 0.72 para los extraídos con alcohol isopropílico al 65%).

C U A D R O IV

Cromatografía en capa fina de los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65% .

SOLVENTE I: BENCENO - CLOROFORMO 9:1				
MUESTRA: CRISTALES EXTRAIDOS CON	L U V		REVELADOR H ₂ SO ₄ 40% + CALOR	
	OC	OL		
AGUA	-	-	-	
ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%	-	-	-	
SOLVENTE II: BENCENO- ACETONA 2:1				
MUESTRA: CRISTALES EXTRAIDOS CON	L U V		H ₂ SO ₄ 40% + CALOR	
	OC	OL		
AGUA	-	-	-	
ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%	-	-	-	
SOLVENTE III: BUTANOL-ACETICO-AGUA 8:2:1				
MUESTRA: CRISTALES EXTRAIDOS CON	L U V		H ₂ SO ₄ 40% + CALOR	Rf
	OC	OL		
AGUA	-	-	1	0.82
ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%	-	-	1	0.82

LUV= Luz ultravioleta; OC= Onda corta (254 nm); OL= Onda larga (366 nm).
 Los cristales extraídos no absorben Luz UV y revelan una sola mancha en un solvente de alta polaridad(Butanol-acético-agua 8:2:1), con igual Rf(0.82).

C U A D R O V

Cromatografía comparativa en capa fina de los cristales extraídos con agua, con alcohol isopropílico al 65% y el patrón de glaucarubina .

SOLVENTE : BUTANOL- ACETICO - AGUA 8:2:1		REVELADOR H ₂ SO ₄ 40% +CALOR
CROMATOGRAMA No.	M U E S T R A	Rf
1	- Cristales extraídos/agua	0.71
	- Mezcla de cristales extraídos/agua y patrón de glaucarubina	0.71
	- Patrón de glaucarubina	0.71
2	- Cristales extraídos/alcohol isopropílico al 65%	0.72
	- Mezcla de cristales extraídos/alcohol isopropílico al 65% y patrón de glaucarubina	0.72
	- Patrón de glaucarubina	0.72

Los cristales extraídos y el patrón de glaucarubina, cuando se usó un solvente de alta polaridad(Butanol-acético-agua 8:2:1) y revelando con H₂SO₄ 40% + calor,mostraron igual Rf.

3.- Rotación específica a diferentes longitudes de onda

A los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%, se les determinó la rotación específica en un polarímetro Perkin Elmer 141. Esta determinación se hizo de la manera siguiente: se tomaron 20 mgs. de la muestra y fueron aforados a 2 ml. con piridina, para obtener una concentración de 0.010 gm/ml; esta disolución presentó una temperatura de 26°C.

Los cálculos de rotación específica fueron hechos según la siguiente fórmula:

$$\text{Rotación específica} = \frac{L}{l \times c}$$

de donde: L= Lectura del aparato

l= longitud de la trayectoria en dm.(1 dm)

c= concentración del soluto(gm/ml)

Las lecturas y resultados de los cálculos de rotación específica aparecen en los Cuadros VI y VII.

De los resultados obtenidos pudo observarse que tanto los cristales obtenidos con agua, como los obtenidos con alcohol isopropílico 65% presentaron una rotación específica positiva (dextrorrotatoria) y analizando la rotación óptica como una función de la longitud de onda (Dispersión Rotatoria Óptica), presenta una escala de dispersión normal, en la que la rotación específica solo cambia gradualmente con la longitud de onda (Gráfica 1), -

no observándose datos de rotación específica que evidencien algún tipo de dispersión anómala que sugiera algún pico de absorción (27).

(27) Skoog, D.S. and West, D.M. Análisis Instrumental, Trad. por Vicente Agut Armer, México, Interamericana, 1975, p. 335.

C U A D R O VI

Rotación específica a diferentes longitudes de onda de los cristales extraídos con agua.

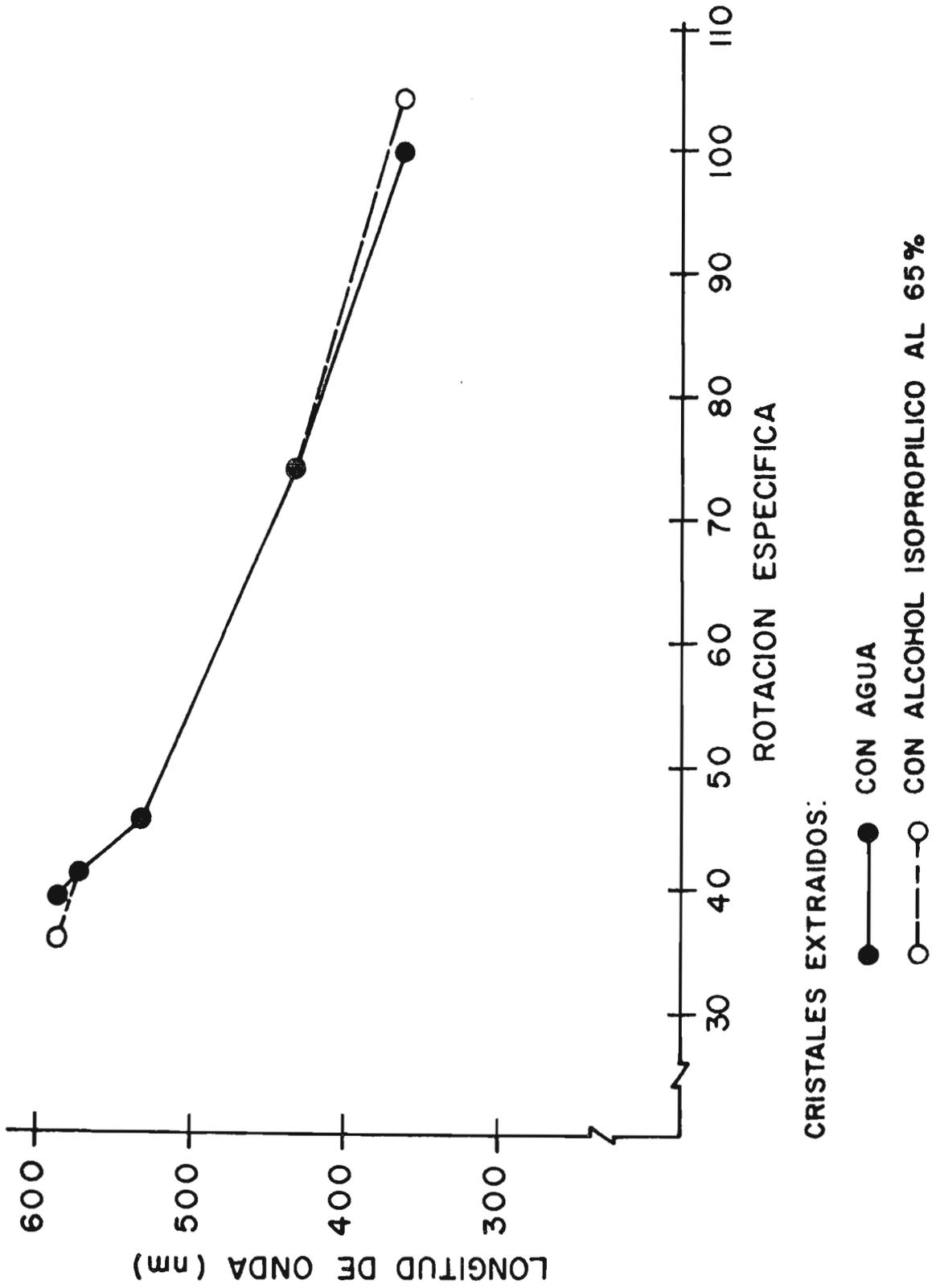
CRISTALES EXTRAIDOS CON AGUA		
LONGITUD DE ONDA	LECTURA DEL APARATO	ROTACION ESPECIFICA
589 nm	0.388	+ 38.8
578 nm	0.411	+ 41.1
546 nm	0.464	+ 46.4
436 nm	0.740	+ 74.0
365 nm	0.998	+ 99.8
316 nm	No da lectura	-

C U A D R O VII

Rotación específica a diferentes longitudes de onda de los cristales extraídos con alcohol isopropílico al 65%.

CRISTALES EXTRAIDOS CON ALCOHOL ISOPROPILICO AL 65%		
LONGITUD DE ONDA	LECTURA DEL APARATO	ROTACION ESPECIFICA
589 nm	0.366	+ 36.6
578 nm	0.414	+ 41.4
546 nm	0.455	+ 45.5
436 nm	0.741	+ 74.1
365 nm	1.047	+104.7
316 nm	no da lectura	-

GRAFICO 1



4.- Lectura de interpretación de los espectros IR, RMN y EM

a. Espectros infrarrojo

- 1) Datos espectrales en el infrarrojo de los cristales - extraídos con agua (Espectro No.1)(*).

En el espectro No.1 se leen las siguientes bandas de absorción: 1740 cm^{-1} grupo carbonilo (C=O) del éster; 1710 cm^{-1} grupo (C=O) lactona; 1610 cm^{-1} grupo (C=C); 1500 cm^{-1} furano; 1210 cm^{-1} grupo (C-O); 1125 cm^{-1} grupo (C=O); 1040 cm^{-1} grupo (C-OH); 870 cm^{-1} furano.

- 2) Datos espectrales al infrarrojo de los cristales extraídos con alcohol isopropílico al 65% (Espectro No.2)(*).

En el espectro No.2 se leen las siguientes bandas de absorción; 1740 cm^{-1} grupo carbonilo (C=O) del éster; -- 1710 cm^{-1} grupo (C=O) lactona; 1610 cm^{-1} grupo (C=C); 1475 cm^{-1} furano; 1210 cm^{-1} grupo (C-O); 1125 cm^{-1} - grupo (C-O); 1040 cm^{-1} grupo (C-OH); 870 cm^{-1} furano.

Los espectros No.1 y 2, presentan bandas de absorción - que indican los siguientes grupos químicos comunes: grupo C=O de éster, grupo de C=O de lactona, grupo C=C, - grupo C-O, grupo C-OH y un sistema de furano. Lo que demuestra que los cristales extraídos con agua y los extraídos con alcohol isopropílico al 65% presentan Espectros IR iguales.

(*) Realizado en el Departamento de Química del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. México.

- 3) Datos espectrales al infrarrojo de los cristales purificados (Espectro No.3) (*) (**).

En el espectro No.3 se leen las siguientes bandas de absorción: 3500, 3380 y 3220 cm^{-1} bandas correspondientes a diferentes tipos de (OH^-); 1765 cm^{-1} banda correspondiente a un grupo (C=O) éster; 1737 cm^{-1} banda correspondiente a un grupo (C=O) de una lactona en un ciclo de seis miembros; 1675 cm^{-1} banda correspondiente a la vibración de un enlace (C=C); 1510 cm^{-1} banda correspondiente a un sistema de furano; 1230 y 1150 cm^{-1} bandas correspondientes a grupos (C-O); 1055 cm^{-1} banda correspondiente a un grupo (C-OH); 885 cm^{-1} bandas correspondientes a un sistema de furano. El espectro infrarrojo de los cristales purificados (Espectro No.3) presenta bandas de absorción que demuestran los mismos grupos químicos encontrados en los Espectros No.1 y 2 y son los siguientes: grupo C=O de éster, grupo C=O de lactona; grupo C=C , grupo C-O , grupo C-OH y un sistema de furano.

(*) Realizado en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de - Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Madrid, España.

(**) Antes de la Determinación de este Espectro IR y los siguientes RMN y EM se procedió a purificar los cristales por Cromatografía en placa preparativa; se usó como soporte sílica gel y como eluyente, cloroformo-metanol (95:5). El producto se recristalizó en metanol (p.f. 280-282°C). Para este producto purificado se reportaron el espectro infrarrojo en Nujol (Espectro No.3), el Espectro RMN de 60 en dimetil sulfóxido (Espectro No.4) y los Espectros de masa (Espectro No. 5 y 6).

b. Espectro de resonancia magnética nuclear

Datos espectrales de resonancia magnética nuclear de los cristales purificados (Espectro No.4) (*).

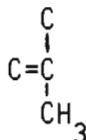
El espectro de resonancia magnética nuclear (Espectro No.4) no aportó muchos datos, las únicas señales de importancia fueron:

1- 1.1 ppm doblete correspondiente a 3 protones $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

(es decir un CH₃ sobre un CH-)

1.25; 1.4 ppm singlete correspondiente a grupos metilos situados sobre carbonos terciarios

1.75 ppm singlete ancho, correspondiente a un CH₃ sobre un doble enlace



(*) Determinados en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Madrid, España.

c. Espectros de masa

El espectro de masa (Espectro No.5) mostró una mezcla de productos, no pudiendo apreciarse alguno de ellos en una mayor proporción, por lo cual se procedió a hacer un espectro de masa de los cristales del líquido de lavado, obteniéndose el Espectro No.6.

Datos del espectro de masas (Espectro No.6) (*)

Al espectro de masa No.6 pueden asignársele las lecturas siguientes (para picos relacionados con la estructura de la glaucarubina):

M^+/e

496: pico molecular de glaucarubina

478: $M^+ - 18$ (pérdida de agua del anterior)

463: 478- metilo

396: $M^+ - 100:100 = -\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \underset{\text{OH}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ corresponde al compuesto de nominado glaucarubol procedente de la ruptura de la cadena lateral (éster) de la glaucarubina.

378: glaucarubol -18 (pérdida de agua)

363: 378 - 15 (pérdida de metilo)

El espectro de masa (Espectro No.6) demuestra que el sólido presentó aún una mezcla de productos: la glaucarubina, el glaucarubol, la glaucarubinona (M^+/e 494) y la ailantinona (M^+/e 478).

(*) Determinado en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Madrid, España.

Otro pico relacionado con fragmentaciones de las moléculas - anteriores fue:

M^+ e 247 ($C_{14}H_{16}O_6$, que contiene a los ciclos A, B y el sistema furano).

5. Análisis de los espectros

Al analizar las estructuras de los espectros IR, RMN y EM (Espectros No. 1-6) y comparando los datos obtenidos con los reportados en diversos trabajos revisados (28) (29) - (30) (31) (32) (33) (34) (35), pudieron confirmarse los grupos funcionales:

-
- (28) Domínguez, X.A. Métodos de investigación fitoquímica, Op. Cit. p. 183
- (29) Polonsky, J. et Gaudemer, A., "Etude des principes amers des Simarubacees 111. Sur la structure de la glaucarubina", Bull. Soc. Chim. France (1961) p. 1432-1436
- (30) Polonsky, J., Founquey, C. et Gaudemers, A. "Etude des principes amers des simarubacées. Presence d'un benzenique dans - le glaucanol, produit de déshydratation du glaucarubol". Bull. Soc. Chim, France, (1962) P. 1255-1258.
- (31) Polonsky, J., Founquey, C. et Gaudemer, M. "Etude de la Glaucarubine. I. Structure et Stéochimie du glaucanol". Bull. Soc. Chim. France (1964) p. 1817-1826.
- (32) Polonsky, J. Fouquey, C. et Gaudemer, M. "Etude de la glaucarubine. II Structure du glaucarubol et de la glaucarubine". Bull. Soc. Chim. France (1964) p. 1827-1835.
- (33) Gaudemer, A. et Polonsky, J. "Structure de la Glaucarubinona - nouveau principe amer isole de Simaruba glauca". J. Phytochemistry, 4: 149-153, 1965.
- (34) Fourrey, J.L. Das, B.C. et Polonsky, J. "Etude des spectres de masse des simarubacées". Org. Mass Spectrom, 1: 819-833. 1968.
- (35) Polonsky, J. "Principes amers des simarubacées". Planta Med. Suppl. pp. 107-116, 1966.
-

- grupo carbonilo C= O de éster
- grupo carbonilo C= O de una lactona de seis miembros
- grupo C= C
- un sistema furano
- grupo C- O
- grupo C= O
- grupo C- OH

- $\begin{array}{c} \text{C} - \text{CH}_3 \\ | \\ \text{H} \\ \text{R} \\ | \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ | \\ \text{R} \end{array}$

- $\begin{array}{c} \text{C} = \text{C} - \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C} \end{array}$

Todos estos grupos funcionales son reportados para los compuestos amargos del tipo de los simaroubalidanos (36) (37) (38) .

Se concluye que los espectros de masa (Espectros No.5 y 6) demostraron una mezcla de este tipo de sustancias, que fueron difíciles de separar por procesos de purificación (recristalización y cromatografía en capa fina). Esta dificultad de separarlas debido a sus semejanzas estructurales, se reporta en la literatura (39).

(36) Domínguez, X.A., Métodos de investigación fitoquímica, Op.cit p. 183

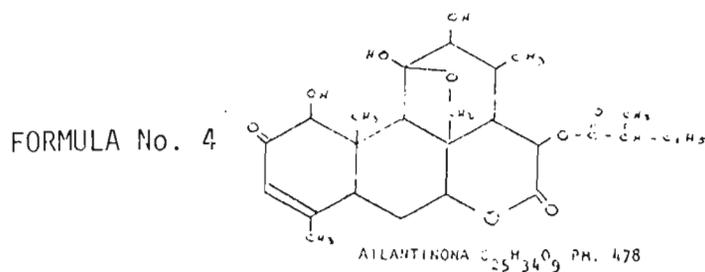
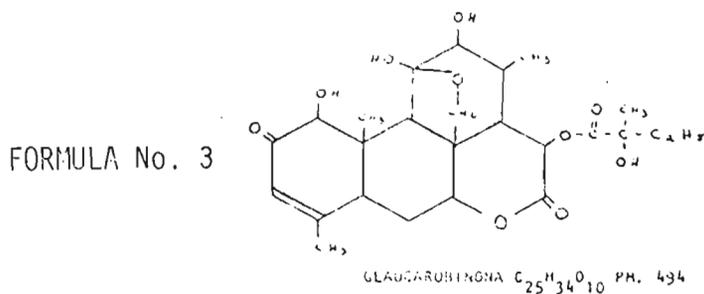
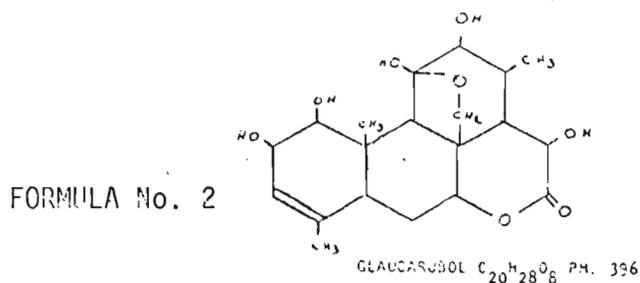
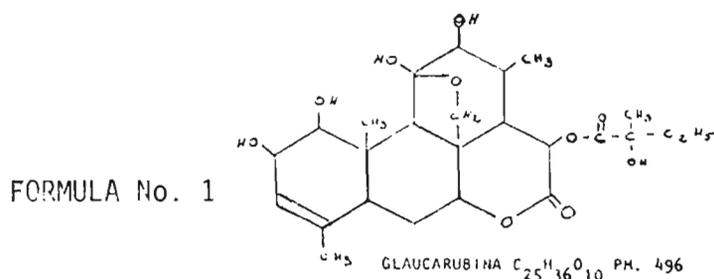
(37) Polonsky, J. "Principes amers des simarubacées". Planta Med.- Suppl. pp. 107-116, 1966.

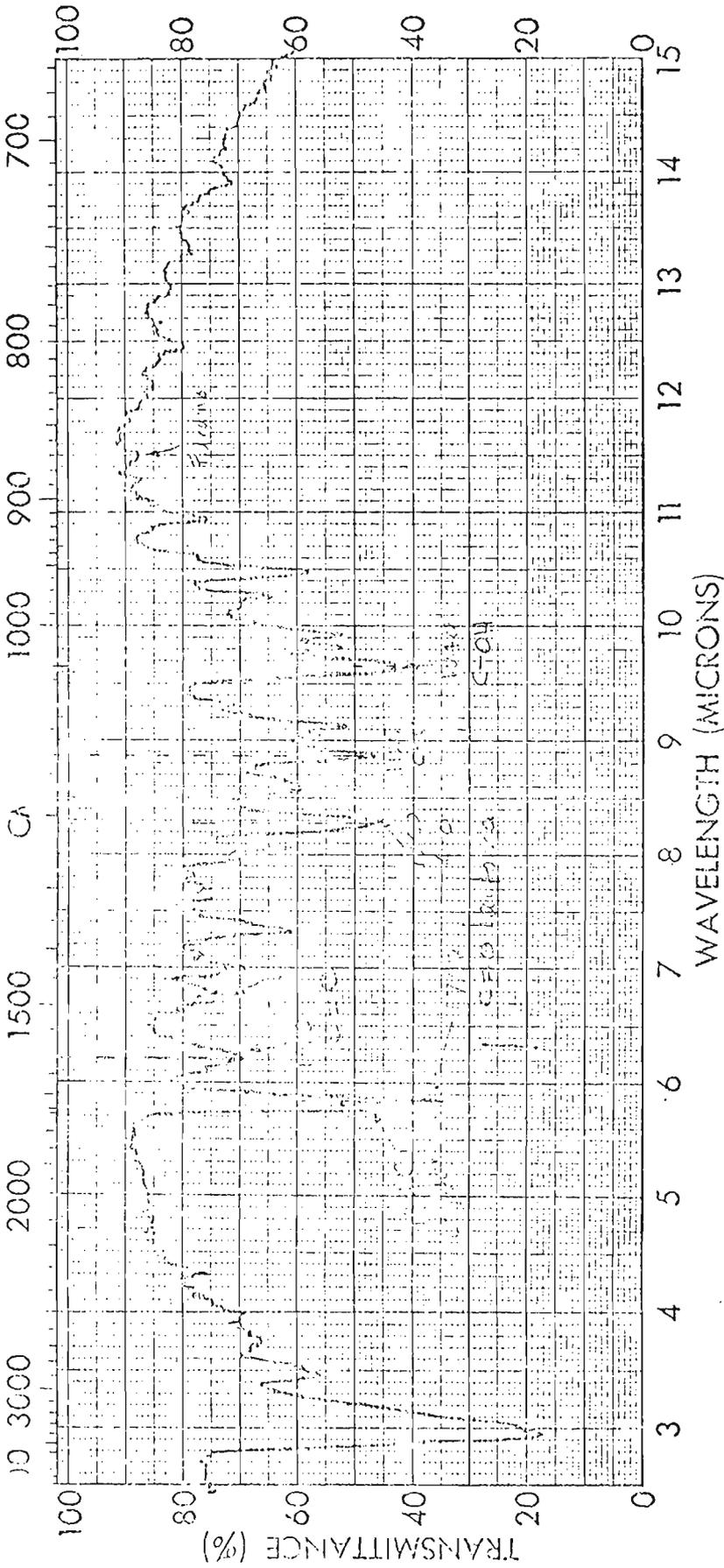
(38) Fourrey, J.L. Das. B.C. et Polonsky, J. Org. Mass Spectrom , 1:819-833, 1968

(39) Polonsky, J. Planta Med. Suppl, pp. 107- 116, 1966.

El espectro de masa (Espectro No.6) presenta una mejor resolución de sus picos y pueden asignarse picos relacionados con la glaucarubina y con el glaucarubol (producto de la hidrólisis de la glaucarubina). Como también pueden observarse picos relacionados con la glaucarubinona y la ailantinona.

Concluyendo que del análisis de los espectros No.1, 2, 3, 4, 5 y 6 se identificaron los principios amargos del grupo de los simaroubalidanos: Glaucarubina y glaucarubol; encontrándose también glaucarubinona y ailantinona. Presentando estos compuestos las fórmulas estructurales siguientes: Fórmula No.1,2, 3 y 4.



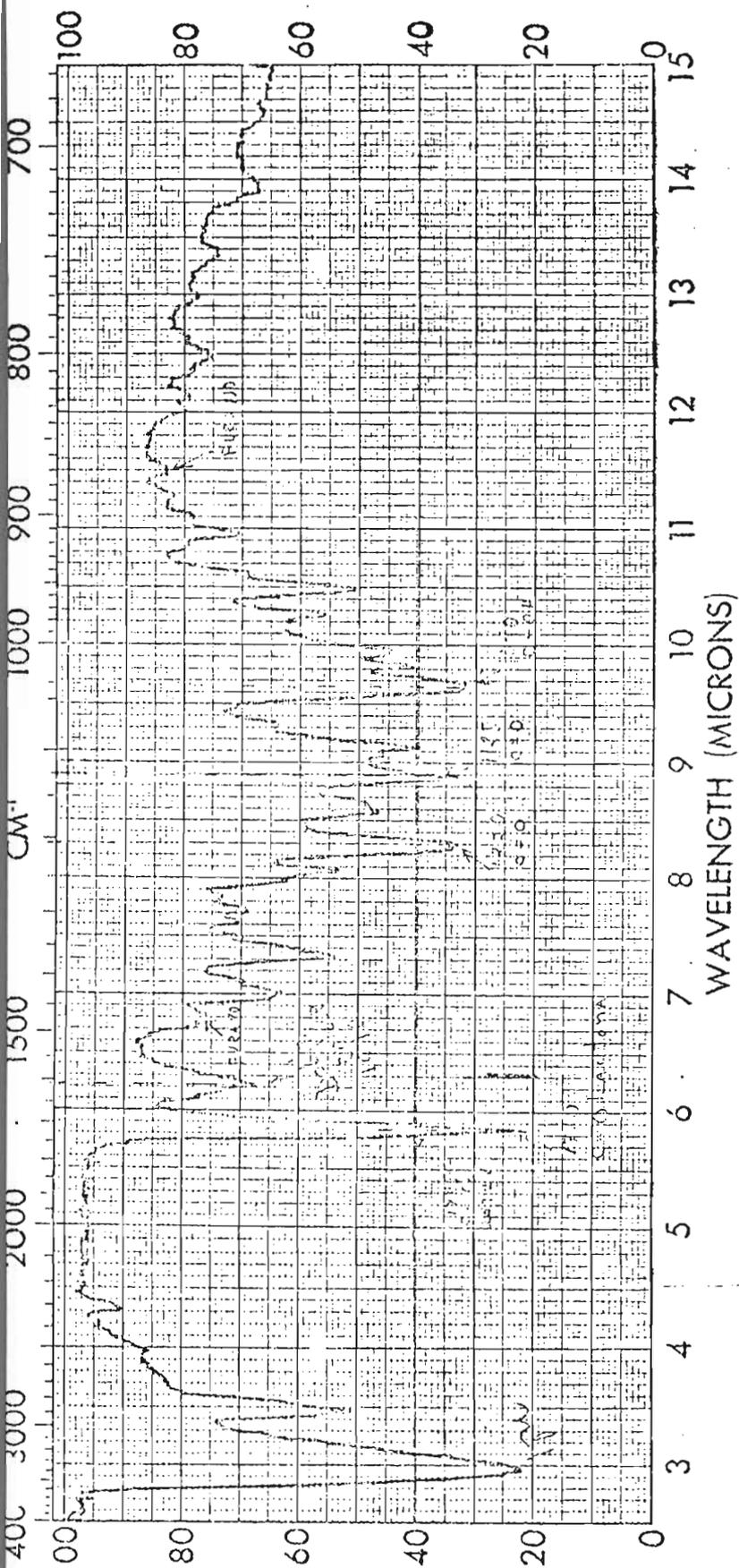


SPECTRUM NO. 5329
 SAMPLE Glaucosarin

SPECTRUM NO. <u>5329</u>	ORIGIN _____	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>Glaucosarin</u>	1. _____	1. <u>Mixture Glaucosarin</u>	<u>H₂O</u>
<u>epitaxial H₂O</u>	PURITY _____	2. _____	
	PHASE <u>slow</u>	DATE <u>27 10 77</u>	
	THICKNESS _____	OPERATOR <u>EDJ</u>	<u>Dr. Entlaub</u>

THE PERKIN ELMER CORPORATION, NORVAIK CONN

PART NO. 137-1281 77

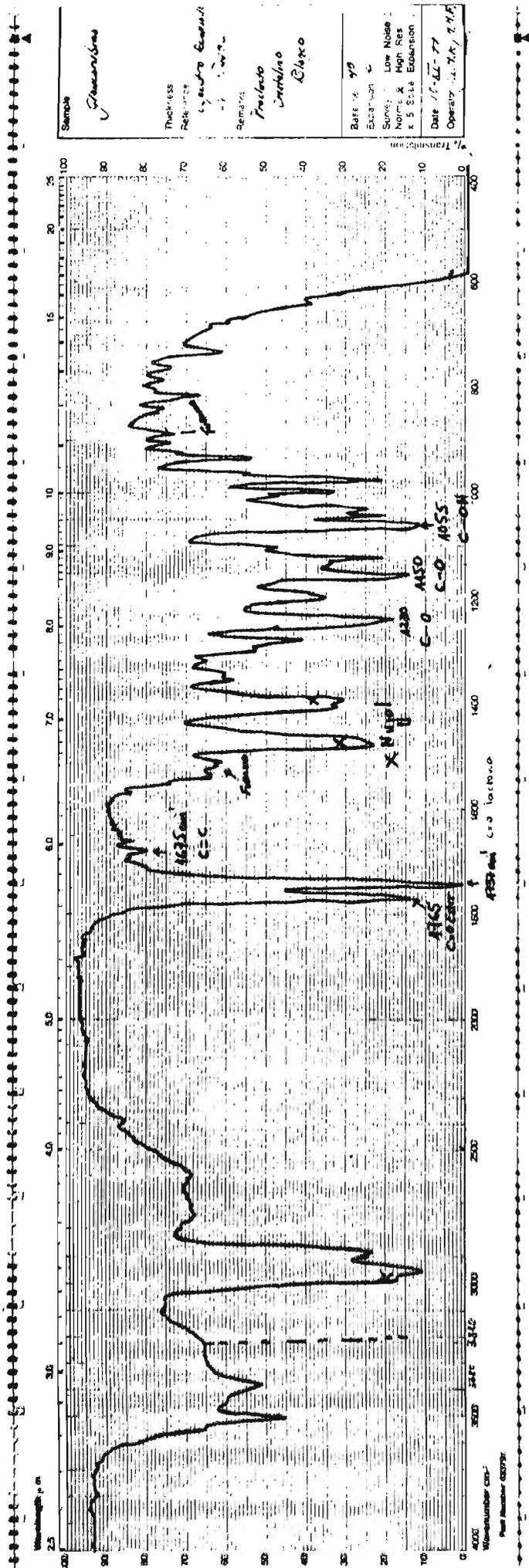


SPECTRUM NO. 6331
 SAMPLE Glucosaminidase

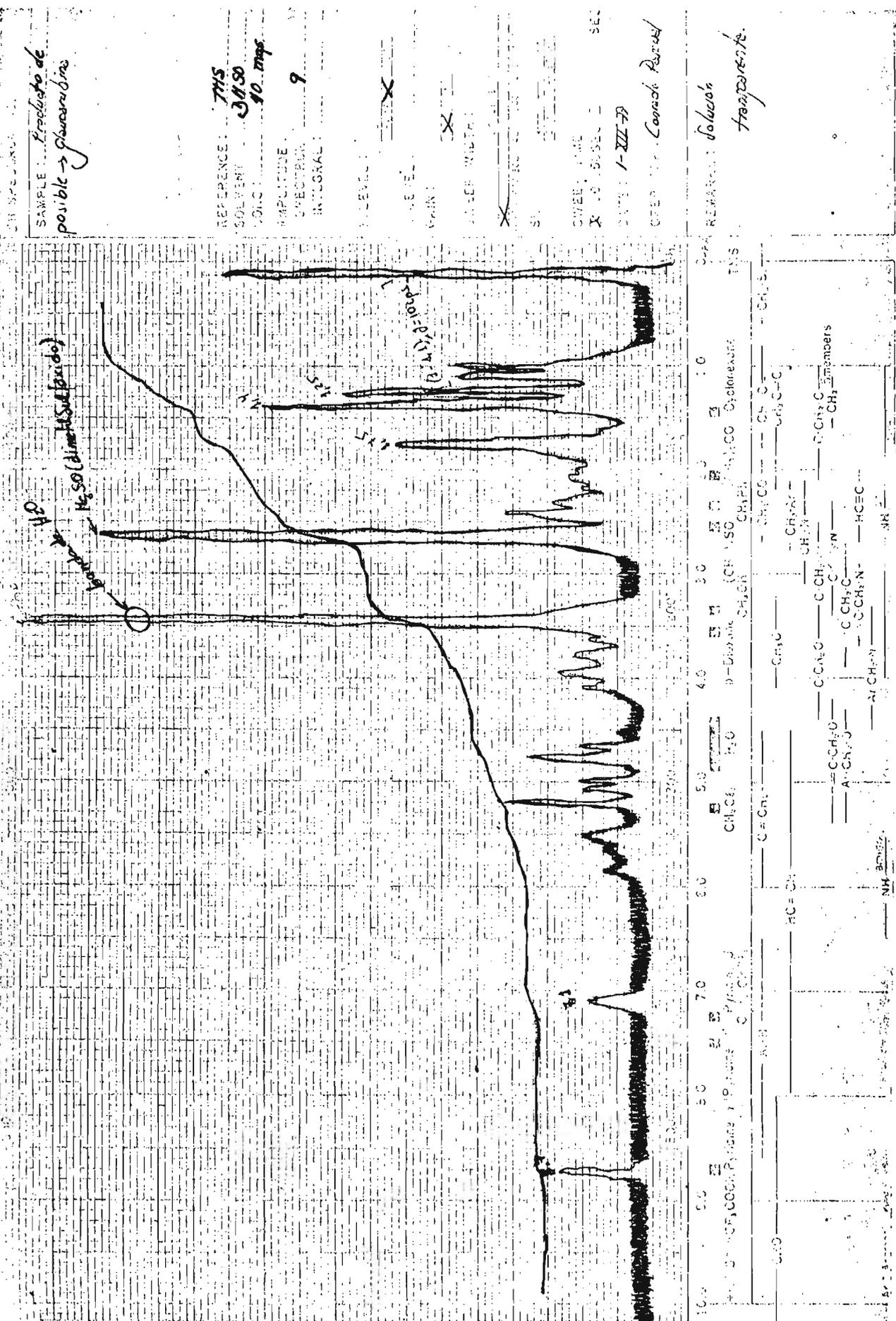
SPECTRUM NO. <u>6331</u>		ORIGIN _____		LEGEND _____		REMARKS _____	
SAMPLE <u>Glucosaminidase</u>		PURITY _____		1. _____		1. <u>infrared insoluble</u> 2. <u>infrared insoluble</u> 3. <u>infrared insoluble</u>	
<u>Extruded fabric support</u>		PHASE <u>SKW</u>		DATE <u>27 10 77</u>		<u>Dr. Salim Chetty</u>	
THICKNESS _____		OPERATOR <u>EDS</u>					

THE PERKIN-ELMER CORPORATION, NORWALK, CONN.

PART NO. 137-1281-2A ©



E S P E C T R O N o . 3



SAMPLE: *Producto de posible → guanaridina*

REFERENCE: *TMS*
 SOLVENT: *DMSO*
 CONC: *10 mg/ml*
 AMPLITUDE: *9*
 SPECTRUM: *9*
 INTEGRAL:

LEVEL: *X*

SCALE: *X*

INSTRUMENT: *X*

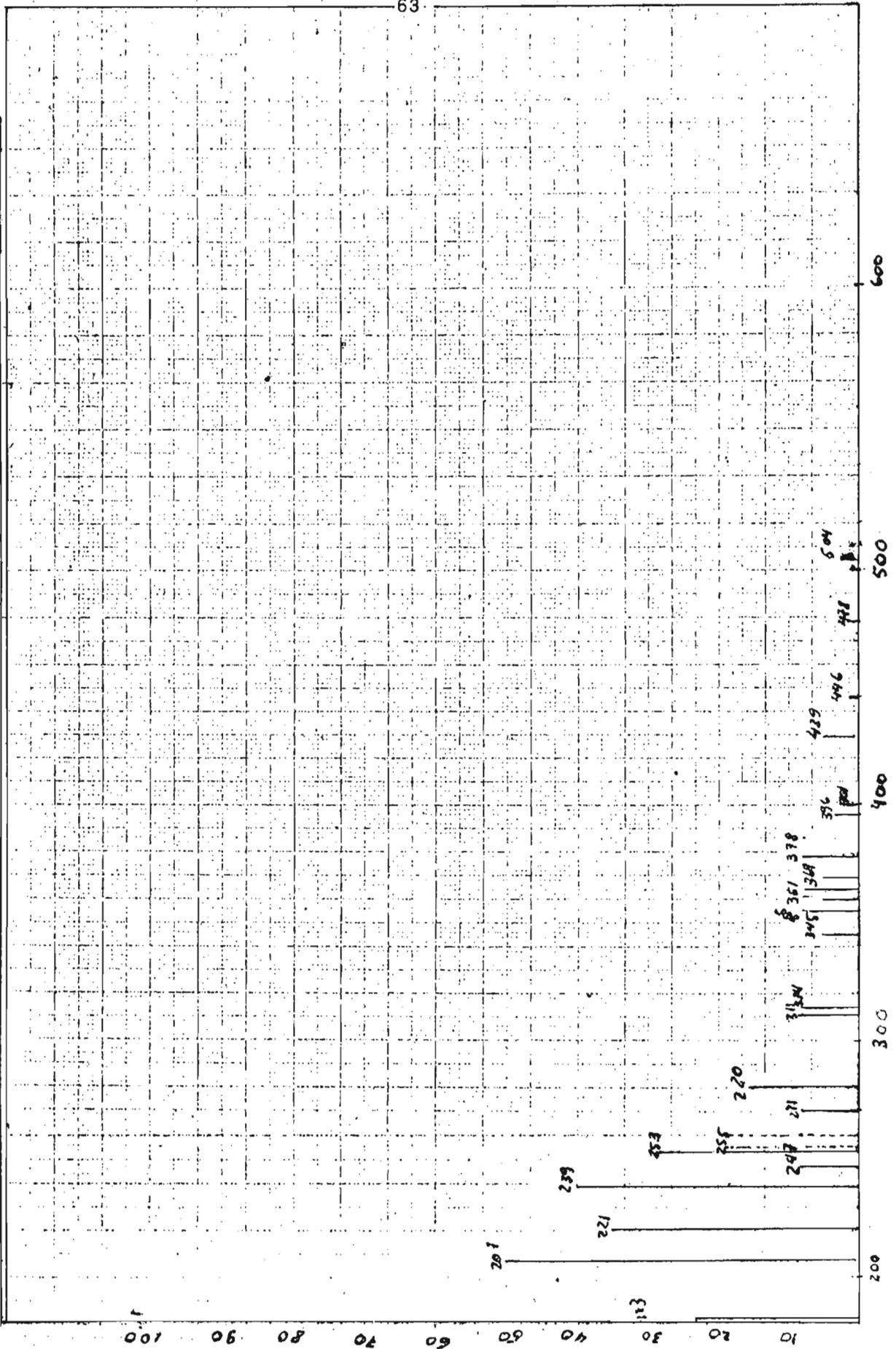
SWEEP: *1-100 SEC*

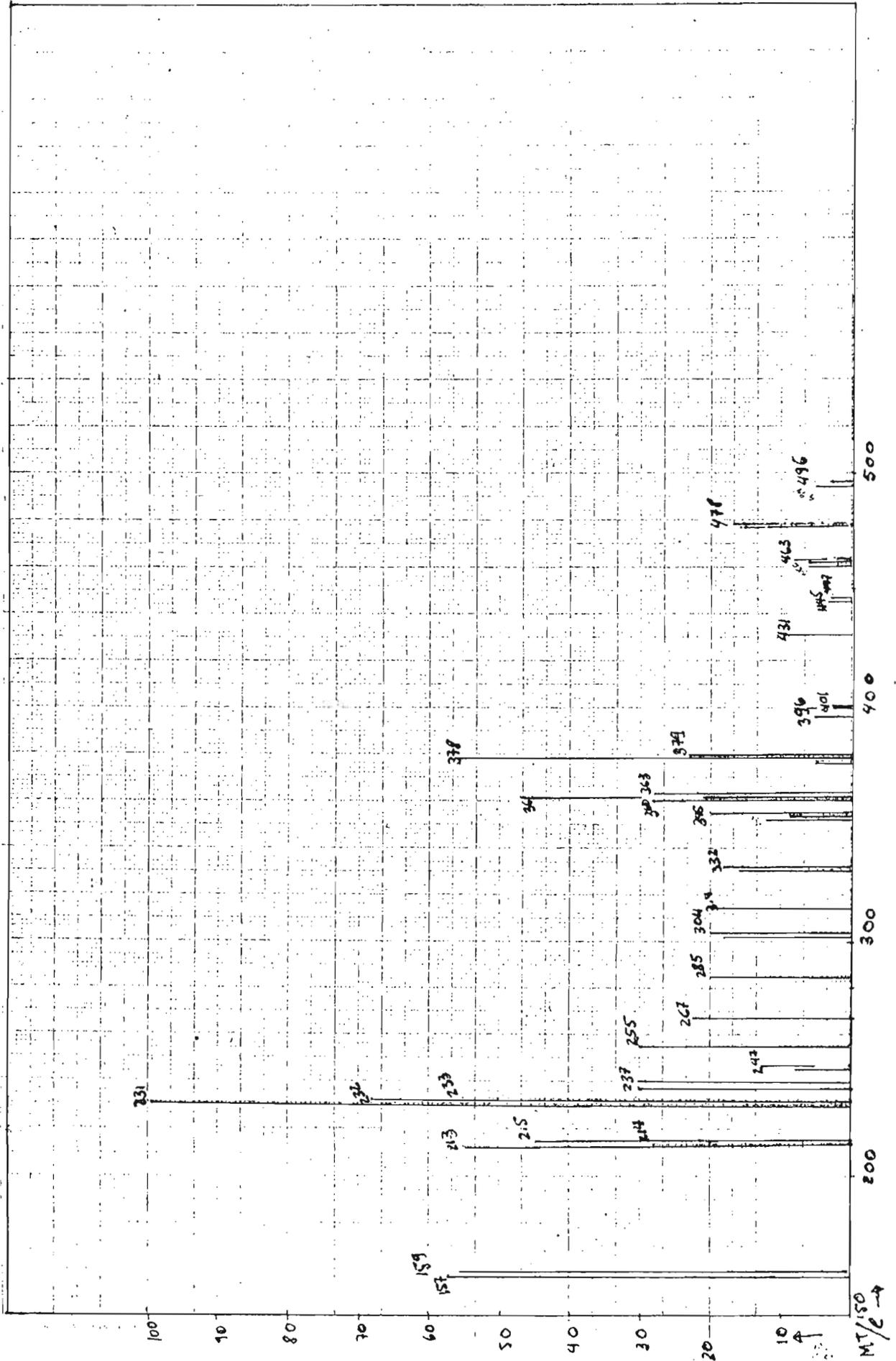
DATE: *1-11-59*

OPER: *Conrad Ruesch*

REMARKS: *Solubilidad frías.*

Chemical Shift (ppm)	Assignment
16.0	C=O
6.0 - 7.0	HC=CH
8.0 - 10.0	NH
5.0	C=C
4.0	C=C=C
3.0	C=C=C=C
2.0	C=C=C=C=C
1.0	C=C=C=C=C=C
0.0	C=C=C=C=C=C=C





D. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD .

1.- Resultados con los extractos

Cuando se probó la toxicidad, tanto de la harina inicial, como de la harina residual, en peces del género Mollienesia (chimbolos), los resultados (Cuadro VIII) mostraron que la harina final continuó presentando toxicidad, pues todos los peces habían muerto.

Al probar la toxicidad de los extractos con éter de petróleo, etanol, cloroformo y agua, los resultados (Cuadro IX) demostraron evidencias de toxicidad para los extractos en éter de petróleo, etanol y cloroformo. El extracto acuoso no mostró acción tóxica. Para el extracto clorofórmico, en una concentración de 500 ppm., la acción tóxica se observó a partir de la cuarta hora de iniciada la prueba, cuando murió el primer pez; tres horas más tarde habían muerto los demás.

2.- Resultados de los cristales obtenidos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65% .

Al investigar la toxicidad de los amargos presentes en los cristales extraídos, tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65%, en peces del género Mollienesia (chimbolos), se encontró que las concentraciones de 5 y 10 ppm, no mostraron acción tóxica. En una concentración de 500 ppm, si se observó acción letal a las 48 horas de iniciada la prueba (Cuadro X).

C U A D R O VIII

Pruebas de toxicidad en peces del género *Mollinnesia* con harina antes del proceso de extracción (inicial) y harina despues del proceso de extracción (final).

Concentración 5 ppm								
MUESTRA	12 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS	
	No. VIVOS	No. MUERTOS						
HARINA INICIAL	3	0	3	0	2	1	1	2
HARINA FINAL	3	0	3	0	2	1	1	2
Concentración 10 ppm								
HARINA INICIAL	3	0	2	1	2	1	0	3
HARINA FINAL	3	0	2	1	2	1	0	3
Concentración 500 ppm								
HARINA INICIAL	3	0	2	1	2	1	0	3
HARINA FINAL	3	0	3	0	2	1	0	3
CONTROL	3	0	3	0	3	0	3	0

La toxicidad aún se encontró presente después de someter la harina a un proceso extractivo.

C U A D R O IX

Pruebas de toxicidad en peces del género *Mollinnesia* con los extractos en: (1) Eter de petróleo, (2) Etanol, (3) Cloroformo y (4) Agua (Ver Fig. 3).

CONCENTRACIONES 5 ppm								
EXTRACTO	12 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS	
	No. VIVOS	No. MUERTOS						
1	3	0	3	0	3	0	2	1
2	3	0	3	0	3	0	2	1
3	3	0	3	0	2	1	2	1
4	3	0	3	0	3	0	3	0
CONTROL	3	0	3	0	3	0	3	0
CONCENTRACION 10 ppm								
1	3	0	2	1	2	1	2	1
2	3	0	2	1	2	1	2	1
3	2	1	1	2	0	3	3	0
4	3	0	3	0	3	0	3	0
CONTROL	3	0	3	0	3	0	2	1
CONCENTRACION 500 ppm								
	4 HORAS		7 HORAS		14 HORAS		24 HORAS	
1	3	0	3	0	3	0	3	0
2	3	0	3	0	2	1	0	3
3	1	2	0	3	0	3	0	3
4	3	0	3	0	3	0	3	0
CONTROL	3	0	3	0	3	0	3	0

En el extracto clorofórmico se evidenció marcada acción tóxica.

C U A D R O X

Pruebas de toxicidad en peces del género *Mollinnesia* con los cristales (1) Extraídos con agua y (2) Extraídos con alcohol isopropílico al 65%.

CONCENTRACION 5 ppm								
MUESTRA	12 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS	
CRISTALES	No. VIVOS	No. MUERTOS						
1	3	-	3	-	3	-	3	-
2	3	-	3	-	3	-	3	-
CONCENTRACION 10 ppm								
1	3	-	3	-	3	-	3	-
2	3	-	3	-	3	-	3	-
CONCENTRACION 500 ppm								
1	3	-	3	-	3	-	-	3
2	3	-	3	-	3	-	2	1
CONTROL	3	-	3	-	3	-	3	0

Los cristales extraídos tanto con agua como con alcohol isopropílico al 65% no muestran acción tóxica.

E. RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE AFLATOXINAS

Se investigó la presencia de aflatoxinas, por cromatografía en capa fina, en la harina de torta de semilla de aceituno, con resultados negativos.

Se usó patrones de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ con Rf:0.16, - 0.58, 0.52 y 0.42 respectivamente; la fluorescencia fue azul para B₁ y B₂ y, celeste verde para G₁ y G₂.

IV. D I S C U S I O N

El estudio de la torta de semilla de aceituno (Simarouba glauca), fue orientando a la investigación de sustancias tóxicas y amargas; básicamente se dividió en pruebas químicas y biológicas que fueron practicadas, tanto con los extractos obtenidos con solventes de polaridad creciente, como con los cristales extraídos: a) con agua y b) con alcohol isopropílico al 65%.

Al analizar los resultados de la cromatografía en capa fina de los extractos (Tablas I-III y Figs.4-9), se observó que el clorofórmico contenía compuestos que no se encontraron en el extracto acuoso; asimismo, que durante las pruebas de toxicidad, el extracto clorofórmico mostró mayor acción tóxica en los peces del género Mollinnesia; por el contrario, el extracto acuoso no presentó toxicidad. De acuerdo con estos resultados se puede decir que el ó los tóxicos son, probablemente, solubles en cloroformo. También se observó que la harina residual, después del proceso extractivo continuó siendo tóxica para los peces, lo cual demostró que no se eliminó el tóxico en su totalidad (Cuadro VIII). Estos resultados deben de ser considerados para futuras investigaciones del extracto clorofórmico, con objeto de llegar a aislar algún compuesto tóxico de él.

Las sustancias amargas se aislaron de acuerdo con el método propuesto por Ham, E.A. et al (J.Amer.Chem. Soc.76:6066-6068, 1954) utilizando agua y, para aislar los compuestos tóxicos se practi-

có el método a base de alcohol isopropílico al 65%, citado por Armour, R.P. (Investigaciones sobre S.glauca Dc.Aceituno, en - El Salvador). Cuando se identificaron los cristales aislados, con ámbos métodos, se encontró que todos resultaron ser una - mezcla de compuestos amargos del grupo de los simaroubalidanos, muy difícil de purificar debido a sus semejanzas estructurales. La dificultad para separarlos también es reportada por Polonsky, J.(Planta Med.Suppl. pp.107-116, 1966).

La gran similitudestructural de los compuestos aislados(Ver -- Fórmulas 1-4) explican el hecho de que, en cromatografía en capa fina, los compuestos presentes se eluyan juntos como si fuera una sola sustancia (Ver Cuadro IV), cuando se usa como eluyente una mezcla muy polar (butanol-acético-agua 8:2:1) y como revelador H_2SO_4 40%.

Los amargos identificados con los espectros IR,RMN y EM fueron: glaucarubina, glaucarubol, glaucarubinona y ailantinona. Esto - pone de manifiesto las características fitoquímicas de las simaroubaceas, pues ya se han reportado la existencia de estas sustancias en los diferentes órganos de las distintas especies de esta familia, como lo resumen los trabajos reportados por:Dominguez, X.A., Fourrey, J.L., Gaudemer, A. Ham,E.A. y Polonsky, J.

Al comparar las respuestas negativas de las pruebas de toxicidad de los cristales de amargosen los peces del género Mollienesia, concuerdan con los resultados negativos obtenidos con los extractos acuosos, lo que hace suponer que este último contenía sustancias similares.

Se descartó la sospecha de que las aflatoxinas fueran la causa - de la toxicidad de la harina de semilla de aceituno, por cuanto las investigaciones que se hicieron para demostrar su presencia fueron negativas.

V. C O N C L U S I O N E S

Después del estudio de la torta de semilla de aceituno (Simarouba glauca Dc.) se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- La harina residual es tóxica .
- 2.- El extracto clorofórmico es tóxico. Por lo tanto, las sustancias tóxicas son solubles en él.
- 3.- El extracto acuoso no es tóxico.
- 4.- Los amargos: glaucarubina, glaucarubol, glaucarubinona y aiantinona, presentes en los cristales extraídos, no son tóxicos.
- 5.- El método empleado para aislar las sustancias tóxicas (alcohol isopropílico al 65%) no dio resultados positivos.
- 6.- La harina no contiene aflatoxinas.

VI. B I B L I O G R A F I A

- ACUÑA, D. BENAVIDES, J. y VEGA, N. Analytical method for aflatoxins in corn samples and other agricultural commodities" 5th International Symposium on animal plant and microbial toxins. Ministerio de Salud Costa Rica Agosto 1976, 8p (mimeografiado).
- ALBORNOS, M.A.R. "Guía farmacognósica de drogas vegetales y de plantas con interés económico de actualidad" Revista de - Facultad de Farmacia de Venezuela, 4 (II): 644-645, 1963
- ARMOUR, R.P. "Investigaciones sobre Simarouba glauca Dc. (aceituno) en El Salvador", San Salvador, H. de Sola é Hijos, 1958
- _____. "Investigation on Simarouba glauca Dc in El Salvador". Economic botany, 13:41-65, 1959.
- BETANCOURT, F.R. y Gómez, L.M. "Investigación sobre la toxicidad de la torta de semilla de aceituno silvestre (S. glauca) en ratas". Trabajo patrocinado por H. de Sola é Hijos, s.f. (Mecanografiado)
- CASAMADA, S.M. Farmacognosia con Farmacodinamia, Barcelona Científico Médica, 1968, 1148 p., cap.37 y pp. 401-402
- CLAUS, E.P. y TYLER, V.E. Farmacognosia, 5 ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1968, 533 p., cap. 4 y pp. 487-488
- CUCKLER, A.C. "Evaluation of Simaroubidin in experimental canine amoebiasis", Federation Proc., 9:266, 1950 (Abstract)

- CUCKLER, A.C. and SMITH, C.C. "Efficacy and toxicity of Simaroubidin in experimental amoebiasis". Federation Proc., 8:284, 1949 (Abstract).
- _____ et al. "Chemotherapeutic and pharmacological studies on glaucarubin, a specific amebacide". Arch, Int., Pharmacodyn., 114:307-321, 1958.
- CUTTING, W.C. The actions and uses of drugs handbook of Pharmacology. 4th Edit. New York, Appleton Century Crofts, 1969, p. 104.
- DEL POZO, E.C. and ALCARAZ, M. "Clinical trial of glaucarubin in treatment of amebiasis". Am. Jour. Med., 20:412-417, 1956.
- DOMINGUEZ, X.A. "Métodos de investigación fitoquímica". México, Limusa, 1973, 281 p.
- _____ "Cromatografía en papel y en capa delgada". OEA, 1975 (Monografía No.16).
- FOURREY, J.L., DAS, B.C. et POLONSKY, J. "Etude des spectres de masse des constituants amers des simaroubacées". Org. Mass Spectrom, 1:819-833, 1968.
- GAUDEMER, A. et POLONSKY, J. "Structure de la glaucaribinone nouveau principe amer isole de Simarouba glauca". J. Phytochemistry, 4:149-153, 1965.
- GHOSH, P.C. et al. "Antitumoral planta. IV Constituents of Simarouba versicolor". Lloydia, 40:364-369, 1977.

- HAM, E.A. et al. "Structural studies on glaucarubin from Simarouba glauca". J.Amer. Chem.Soc., 76:6066-6068, 1954
- HEGNAUER, R. Chemotaxonomie des pflanzen. Birk Hauser. Basilea. 1973. Tomo 6 pp. 393-399.
- HESSELTINE, C.W. "Natural occurrence of mycotoxins in cereals". Mycopatologia et micologia applicata, 53:141-153, 1974.
- _____ et al "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus". Bacteriological reviews, 30:795-805, 1966.
- KARTA, G. et al "Crystal and molecular structure of glaucarubin". Nature 202: 389-390, 1964.
- MORON, J., POLONSKY, J. et MERRIEN, A. "Incorporation spécifique de la L-(^{14}C) isoleucine dans le groupement hydroxy-2 - - methyl-2 butyroyle de la glaucarubinone". European J.Biochem., 3: 488-491, 1968
- _____ "sur la biosynthèse des quassnoïdes de Simarouba glauca (Simaroubaceae). Phytochemistry. 10:585-592, 1971
- OFFICIAL AND TENTATIVE METHODS OF THE AMERICAN CHEMISTS' SOCIETY. (A.O.C.S.). 3th. Edition, Revised April 1954.
- PHILLIPS, B.P. "Measurement of direct amebicidal potential by a micromethod for the screening of drugs in vitro". Am.Jour - Trop. Med., 31:561-565, 1951.
- POLONSKY, J. "Principes amers des simaroubacées". Planta Med. - - Suppl. pp. 107-116, 1966.

- POLONSKY, J., GAUDEMER, A. "Etude des principes amers des simaroubacées. III.- Sur la structure de la glaucarubine". Bull. Soc. Chim. France, pp. 1432-1436, 1961.
- POLONSKY, J., GAUDEMER, A. et FOUNQUEY C. "Etude des principes amers des Simaroubacées. Présence dun benzenique dans le glaucanol, produit de déshydratation du glaucarubol". Bull. Soc. Chim. France, pp. 1255-1258, 1962
- _____ "Etude de la glaucarubine I.- Structure et stéréochimie du glaucanol". Bull. Soc. France, pp. 1818-1826, 1964.
- _____ "Etude de la glaucarubine. II.- Structure du glaucarubol et de la glaucarubine", Bull. Soc. Chim. France, pp. 1827-1835. 1964
- SANDOVAL, H.T. et al, "Aislamiento de cepas de Aspergillus sp. productoras de aflatoxinas en alimentos de consumo humano en México" . Rev. Inv. Salud Pública (México), 36:161-166, 1976 .
- SILVERSTEIN, R.M. and BASSLER. G.C. Spectrometric identification of organic compounds. 2th. ed. New York, Wiley 1963. p.255 .
- SKOOG, D.S. and West, D.M. Análisis instrumental. Trad. por Vicente Agut Armer. México, Interamericana, 1975, pp. 718 .
- STHAL, E. Thin layer chromatography. A laboratory Handbook. Translated by M.R.F. Ashworth. 2th. ed. New York. Springer. 1969. 1041 p.

- STANDLEY, P.C. and STEYERMARK. J.A. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. Volumen 24, Part V. 1946, p.502
- THE MERCK INDEX OF CHEMICALS AND DRUGS. 6th.edition, Merck & Co. Inc., 1952, p. 865.