

F664e
1976
F.c.c.QQ.

INVENTARIO: 10105

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

*Extracción, Purificación,
Identificación y Determinación
Cuantitativa del Alfa Tocoferol
en Algas Macroscópicas de la Flora
Salvadoreña Especie Chara Ceylánica*

TESIS

PRESENTADO POR

Zonia Elizabeth Folgar Portillo

PARA OPTAR AL TITULO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

junio de 1976



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR: DR. CARLOS ALFARO CASTILLO

SECRETARIO: DR. MANUEL ATILIO HASBUN

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO: DR. AMILCAR AVENDAÑO Y ORTIZ

SECRETARIO DRA. MARIA GLADYS DE MENA GUERRERO

JURADO DE TESIS

DRA. WANDA DE ROSALES

DR. AMILCAR AVENDAÑO Y ORTIZ

DR. ROMEO AMILCAR ROVELO BATRES

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

CON TODO CARIÑO Y AGRADECIMIENTO

Zonia

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

A TODAS LAS PERSONAS QUE EN UNA
U OTRA FORMA SE INTERESARON POR
MI TRABAJO Y AYUDARON A QUE ESTE
SE REALIZARA.

gracias

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO	PAG.
I.	Introducción 1
II.	Generalidades de las Algas 3
1.	Definición 3
2.	Caracteres y Clasificación 3
3.	Familia Caráceas 4
4.	Chara Ceylánica 4
5.	Importancia de las Algas 6
III.	Antecedentes de la Vitamina E 10
1.	Antioxidantes 14
2.	Fuentes Naturales 15
3.	Propiedades Físicas y Químicas 16
IV.	Materiales y Métodos 18
1.	Determinación de la presencia del alfa tocoferol en las muestras de Algas 18
a.	Método de Extracción o de Threalfall 18
i.	Procedimiento 19
b.	Método de Saponificación 19
i.	Procedimiento 20
c.	Cromatografía en Capa Fina 21
i.	Constante R 21
ii.	Reactivos 23
iii.	Procedimiento 24
2.	Cuantificación del alfa tocoferol 27
a.	Método de Emmerie y Engel 27
i.	Procedimiento 28
b.	Análisis Fotométrico de la Vitamina E por el método de M. Furter y R. E. Meyer 29
i.	Procedimiento 30

c. Determinación Colorimétrica con Acido Sul- fúrico	31
i. Procedimiento	31
d. Método de Meenen	32
i. Procedimiento	32
e. Método de Comprobación	33
i. Procedimiento	34
V. Cálculos y Resultados	35
Conclusiones	57
Resumen	59
Bibliografía citada	61
Bibliografía consultada	63
Apéndice	66
Espectros Infrarrojos de Vitamina E	1 - 6

INDICE DE CUADROS

N°		Pág.
1.	Características de la Chara ceylanica	6
2.	Productos que contienen tocoferol	15
3.	Datos de la Curva de calibración del Método de Emmerie y Engel, con el espectrofotómetro Coleman 295	37
4.	Datos de la sustancia problema obtenidos por el Método de Emmerie y Engel (Espectro fotómetro Coleman 295)	37
5.	Datos Generales con el Método Emmerie y Engel	38
6.	Datos de la Curva de Calibración del Método Emmerie y Engel, con el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124	39
7.	Datos de Alfa tocoferol obtenidos con el Método de Emmerie y Engel con el espectrofotómetro de Perkin-Elmer 124	42
8.	Resultados Generales con el método de Emmerie y Engel	43
9.	Datos de la Curva de Calibración con el método de M. Furter y R. E. Meyer, y el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124	44
10.	Datos de la sustancia problema con el método M. Furter y R. E. Meyer y el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124	45
11.	Datos Generales con el método de M. Furter y R. E. Meyer	46
12.	Datos de la Curva de Calibración con el método del Acido Sulfúrico y el espectrofotómetro Coleman 295	47
13.	Datos del alfa tocoferol obtenidos con el método de Acido Sulfúrico y el espectrofotómetro Coleman 295	48
14.	Resultados Generales con el método de Acido Sulfúrico..	49
15.	Datos de la curva de calibración con el método de Comprobación con el comparador de áreas	50
16.	Datos de la sustancia problema con el método de Comprobación y el comparador de áreas	51

17.	Resultados Generales con el método de Comprobación	52
18.	Valores de R_f y hR_f con diferentes disolventes	54
19.	Valores de R_x con diferentes disolventes	55
20.	Comparación de Resultados obtenidos con los métodos aplicados.....	56

INDICE DE ILUSTRACIONES

N°	Pág.
1. Planta Chara ceylanica	8
2. Organos Sexuales de la Chara ceylanica	9
3. Comparador de Areas (Multi-purpose Template)	26
4. Curva de calibración del alfa tocoferol con el espectrofotómetro Coleman 295 (Método de Emmerie y Engel)	36
5. Curva de calibración del alfa tocoferol con el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124 (Método de Emmerie y Engel)	41
6. Curva de calibración del alfa tocoferol con el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124 (Método de M. Furter y R. E. Meyer)	44
7. Curva de calibración del alfa tocoferol con el espectrofotómetro Coleman 295 (Método del Acido Sulfúrico)	47
8. Curva de calibración del alfa tocoferol con el comparador de áreas	50

I N T R O D U C C I O N

En las últimas décadas se han intensificado los estudios fitoquímicos con el deseo de encontrar nuevas fuentes de alimento o de materia prima para la industria farmacéutica.

Han sido objeto de estudio, tanto las plantas superiores como las algas, por constituir estas últimas un potencial alimenticio que aún no ha sido suficientemente estudiado.

En vista de que en El Salvador, desde hace algunos años, está tomando incremento este tipo de estudios, en particular, de las plantas superiores (fanerógamas), se ha querido con este trabajo, iniciar la investigación fitoquímica en las algas de agua dulce, para lo cual fue escogida la especie Chara ceylanica en condiciones naturales.

La presente investigación, de tipo experimental, tuvo como objetivo la búsqueda de alfa tocoferol (vitamina E) en la planta mencionada anteriormente, para contribuir a la utilización de este vegetal como fuente de alimento, como materia prima y como un rubro más en la economía del país.

Sabiendo que las algas son fuente de carbohidratos, vitaminas, proteínas, lípidos y otros, se consideró oportuno determinar la presencia de vitamina E tanto por métodos químicos cualitativos como cuantitativos, con la finalidad de extraer, purificar, identificar y señalar el alfa tocoferol.

Es importante hacer notar que las experimentaciones no se hicieron en atmósfera de nitrógeno porque éste es caro y no habían condiciones económicas para su utilización; sin embargo, los resultados obtenidos fueron positivos.

Se considera necesaria la realización de nuevas investigaciones sobre

las algas, tendientes a determinar la presencia de vitaminas, lípidos, carbohidratos, proteínas y demás productos necesarios en la alimentación diaria del hombre y así ver las utilidades de las mismas, y poder decir si son importantes o no, como materia prima que contribuya al aumento en la fabricación de alimentos para combatir la desnutrición en El Salvador, naturalmente, empleando algas de la flora salvadoreña.

CAPITULO II

GENERALIDADES DE LAS ALGAS

1. Definición. El término "alga" es aplicable a las plantas inferiores autótroficas.

Estas son, en su mayor parte, acuáticas y de estructura relativamente simple; aunque algunas algas marinas son grandes y complejas. Casi todas las plantas que flotan libres en el océano y muchas de las que habitan aguas dulces, son algas; pero otras son vegetales terrestres que regresaron a su hábitat acuático.

También se encuentran en la tierra, sobre todo, en lugares húmedos. Estas son organismos pequeños y simples. Solo algunas algas marinas superiores tienen tejidos comparables a los de muchas plantas terrestres.

Al cuerpo de estos vegetales se le llama Talo; no tienen raíces, tallos ni hojas, en el verdadero sentido de las palabras.

2. Caracteres y Clasificación. Estas plantas son talofitas autotróficas porque son capaces de elaborar sus propios alimentos a partir de materiales inorgánicos, como bióxido de carbono, agua y substancias minerales.

Entre éstas hay tipos antiguos y primitivos de la vida vegetal. Existen desde las microscópicas hasta las grandes algas marinas, que en algunos casos, sobrepasan en longitud a los árboles de mayor altura. En cuanto a la masa y peso seco, constituyen una fracción de éstos.

Las plantas marinas flotantes son, por lo general, formas unicelulares y se designan como fitoplancton del mar; el plancton es el nombre colectivo para todos los animales y vegetales que flotan libres en el agua; es muy importante

como fuente alimenticia, y constituye un primer eslabón en la cadena alimenticia de los animales grandes, en especial los peces.

Muchas de las algas que crecen en la línea litoral o en las partes poco profundas del mar forman el fitobenton (benton es el nombre colectivo para designar a las plantas y animales acuáticos fijos).

Con respecto a su clasificación, estas plantas están separadas en varios grupos, determinados por los caracteres fisiológicos de las células vegetativas y por el comportamiento de las reproductoras, por el color, tamaño y otros caracteres comunes a estos vegetales. Se dividen en Clorofitas, Euglenofitas, Pirofitas, Crisofitas, Feofitas, Cianofitas y Rodofitas.

En el presente trabajo sólo se hará referencia a las Clorofitas o algas verdes porque son las que tienen relación con la investigación realizada.

3. Familia Caráceas. Están distribuidas en varias zonas del globo terrestre y son plantas verdes de agua dulce o salobre, macroscópicas y autótrofas.

Fijan su talo al substrato por medio de rizoides. El eje principal alcanza más de un metro de longitud y está dividido en nudos y entrenudos de donde derivan las "ramas" secundarias.

Son plantas frágiles debido a que tienen membranas calcificadas (algunas) y se encuentran en estanques, represas, lagos, canales, y en las corrientes de curso lento.

4. Chara ceylanica. (ver Fig. 1) Es una especie de la familia Caráceas, incluida dentro de las Clorofitas, porque sus caracteres y formas de reproducción son primitivos.

Es macroscópica y se caracteriza por tener cloroplastos con clorofila a, clorofila b y pigmentos carotenoides amarillos.

Su reproducción es sexual y vegetativa; la primera por oogamia y la segunda, por medio de pequeños bulbos ricos en reservas alimenticias (almidón) que se originan en los rizoides, de donde se desprenden.

Los órganos sexuales masculino y femenino están juntos, situados en las axilas de las "ramas" terciarias, el femenino sobre el masculino (ver Fig. 2). El órgano femenino es ovoide y está rodeado de cinco células espiraladas que en su extremo forman una corona. El masculino, en cambio, es rojizo y globuloso; tiene filamentos cargados de células dispuestas en una sola hilera donde cada una es un anteridio, en el que se forma un espermatozoide biflagelado.

Esta planta fue encontrada y recolectada en el Lago de Coatepeque; y según el profesor Jorge Adalberto Lagos¹, es donde más abunda este vegetal, aunque existe en otros lagos de El Salvador.

Con respecto a la *Chara ceylanica*, Melvin C. Palmer² proporciona las características que aparecen en el Cuadro N° 1:

-
1. LAGOS, Jorge Adalberto, Profesor de Botánica Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Entrevista realizada en Ciudad Universitaria, 9 de febrero de 1976
 2. PALMER, Melvin C., Algas, 1a. edición, Editorial Interamericana S.A., México, 1962, pp. 55

CUADRO N° 1

ASPECTO	CARACTERISTICA DE LA CHARA CEYLANICA
Color	Verde o verde amarillo
Localización del pigmento	En los cromatóforos
Almidón	Presente
Cubierta Viscosa	Casi siempre falta
Pared Celular	Semirrígida, lisa o con espinas
Núcleos	Presente
Flagelos	Ausente
Mancha Ocular	Ausente

5. Importancia de las Algas. Las algas son una fuente de investigación por su importancia en diferentes áreas de la economía mundial.

Constituyen la materia prima para la fabricación de alginato sódico, agar, yodo, tierra de diatomeas; así como varios productos alimenticios¹ que se conocen con diversos nombres como amanori, kombu, kan-ten, carrageen, dulce y limu, son parte importante en el régimen alimenticio de Hawaii, Japón, China, Filipinas, Irlanda y otros países, siendo las más utilizadas las algas marinas.

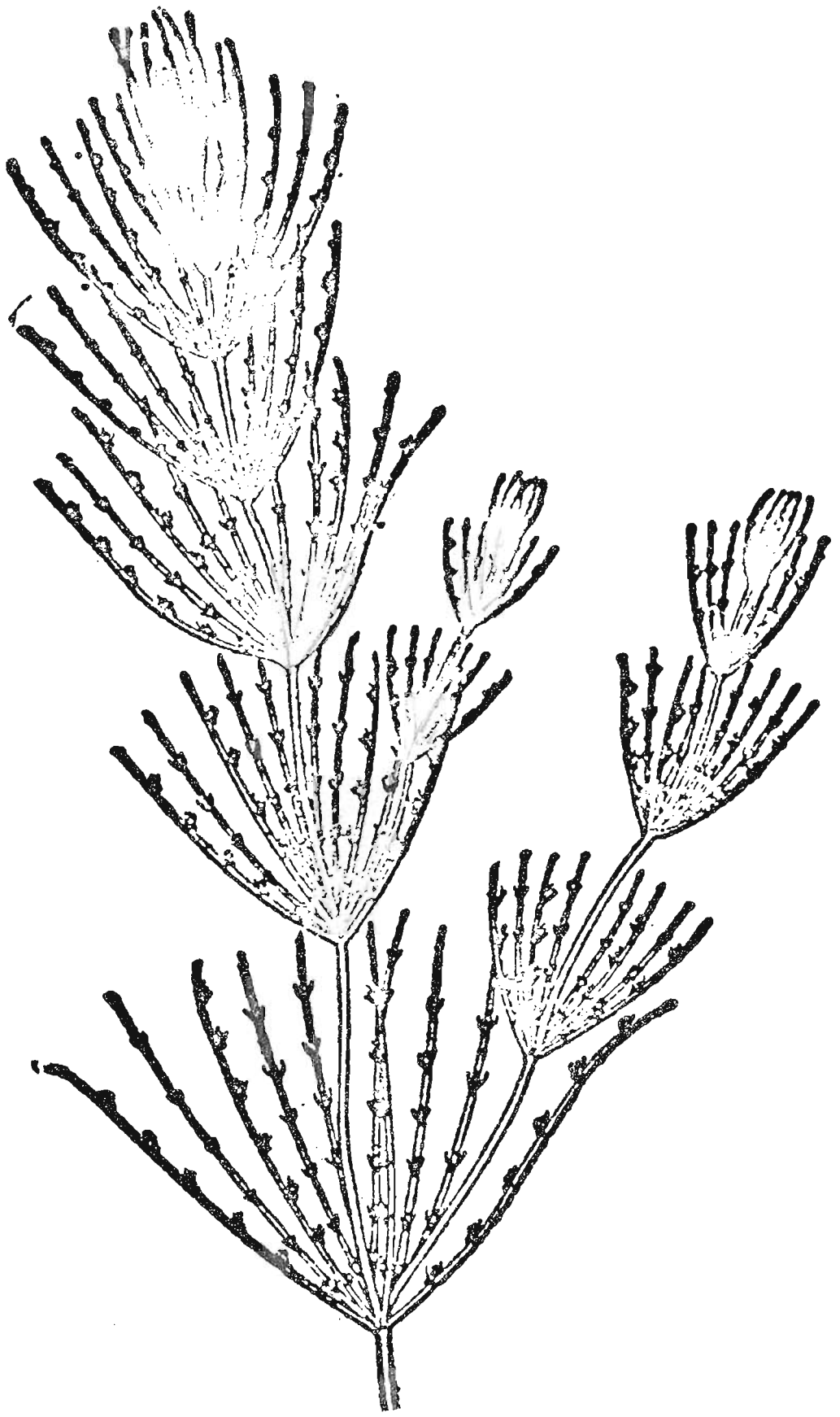
Las algas tienen la capacidad de generar colores, olores y sabores; así como modificar el pH, e influir en algunas características del agua (color, turbiedad, radioactividad).

Además, son ricas en proteínas, grasas e hidratos de carbono, por lo que en un futuro próximo servirán para la elaboración de vitaminas, hormonas

1. PALMER, Mervin C., Algas, 1a. edición, Editorial Interamericana S.A., Méxi

y antibióticos.

En la actualidad no hay una utilización sistematizada de estas plantas por el poco estudio y la escasez de métodos prácticos para su cultivo y aprovechamiento.



CAPITULO III

ANTECEDENTES DE LA VITAMINA E

Esta vitamina conocida internacionalmente como Tocoferol¹ se le conoce como Factor X, Esterilamina, Factor Antiestéril y otros.

Con respecto al término "Vitamina E", la Enciclopedia de Tecnología Química² dice que "el nombre 'vitamina E' fue usado originalmente para describir un producto, parcialmente caracterizado, de los aceites vegetales, que era esencial para conservar la fertilidad de las ratas".

Las investigaciones tendientes al descubrimiento de esta vitamina, se iniciaron el año de 1920, por parte de los científicos Matill y Conklin; quienes la encontraron liposoluble, allá por 1922. Luego, las investigaciones acerca de su distribución natural, aislamiento e identificación, se debieron a Evans, Burr y Emerson; así como a los anteriormente citados.

Y según la Enciclopedia Medicamenta³, los estudios con respecto al alfa tocoferol se realizaron según el siguiente proceso:

"1920-22. Matill y Conklin observan trastornos en la reproducción de las ratas sometidas a dietas lácteas especiales, y Evans y Bishop, que la falta de reproducción en las ratas es debida a una carencia vitamínica.
1927-30. Evans y Burr reconocen la vitamina E en el insaponificable, y estos mismos autores y Goettesch y Pappenheimer describen una distrofia muscular específica en ratas, conejos y cobayas sometidas a una dieta ca-

-
1. TOCOFEROL, palabra derivada del griego, significa que favorece la procreación
 2. KIRK, Raymond E. y Othmer, Donald F., Enciclopedia de Tecnología Química, t. xvi, Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana, México, 1966, p. 198
 3. FONT, Querr, Pío, Enciclopedia Medicamenta, t. i, Editorial Labor, S.A., Barcelona (España), 1962, p. 60

rente de esta vitamina.

1936. Evans, Emerson (O. H.) y Emerson (G. A.) aislan la vitamina E en forma de ésteres cristalizados (tocoferoles alfa, beta y gamma).

1937-38. Fernholz elucida la estructura química del alfa tocoferol, Karrer y colaboradores logran su síntesis¹

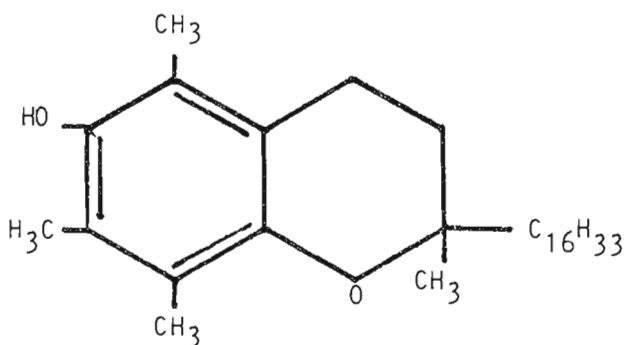
En cuanto a su composición química, se han tomado los datos de la Enciclopedia Medicamenta¹, en la que aparece planteada la forma siguiente:

Nombre Común: Alfa Tocoferol

Nombre Químico: 5, 7, 8, trimetiltocol

Fórmula Molecular: $(C_{29}H_{50}O_2)$

Fórmula Estructural:



La fórmula anterior es conocida como Vitamina E₁

En cuanto al resto de los tocoferoles, éstos tienen las siguientes características, que los difieren entre sí y permiten una mayor identificación.

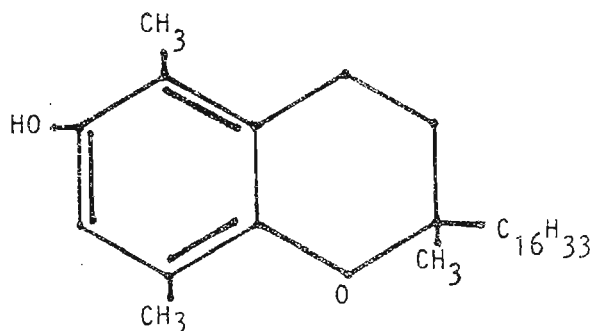
1. FONT, Querr, Pío, Enciclopedia Medicamenta, t. i., Editorial Labor, S.A., Barcelona (España), 1962, pp. 60-61.

Nombre Común: Beta Tocoferol

Nombre Químico: 5, 8, dimetiltocol

Fórmula Molecular: $(C_{28}H_{48}O_2)$

Fórmula Estructural:



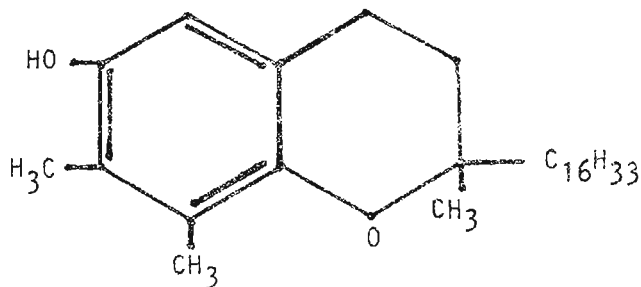
También es conocido como Cromotocoferol, Neotocoferol, p-xilotocoferol o Vitamina E₂.

Nombre Común: Gamma Tocoferol

Nombre Químico: 7, 8, dimetiltocol

Fórmula Molecular: $(C_{28}H_{48}O_2)$

Fórmula Estructural:



El Gamma Tocoferol es conocido como α-xilotocoferol y como Vitamina E₃

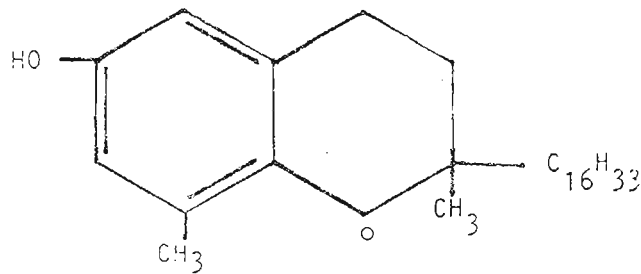
Posteriormente se aisló el Delta Tocoferol que sólo tiene un grupo metilo en el anillo bencénico.

Nombre Común: Delta Tocoferol

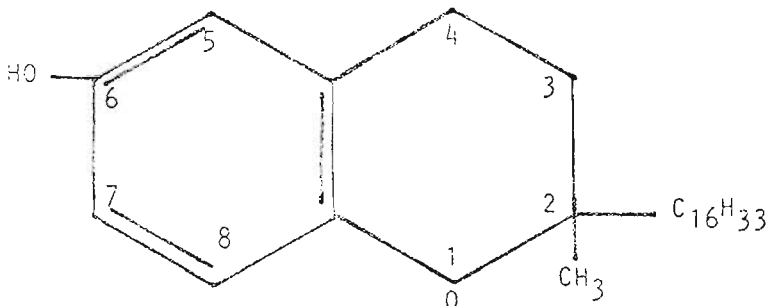
Nombre Químico: 8, metiltocol

Fórmula Molecular: $(C_{27}H_{46}O_2)$

Fórmula Estructural:



Los tocoferoles hasta ahora conocidos corresponden siempre al esquema fundamental del cromano o anillo fundamental de los tocoferoles, cuya estructura es la siguiente:



El cromano posee una agrupación atómica heterocíclica constituida por un núcleo bencénico y un anillo de seis eslabones, uno de los cuales es un átomo de oxígeno directamente unido a dos átomos de carbono, como en los ésteres fenólicos.

El cromano tiene tres derivados principales: alfa, beta y gamma tocoferoles (vitaminas de la serie E), que se encuentran en la fracción insaponificable.

Sin embargo, en la actualidad han sido aislados siete tocoferoles, muy difundidos en las plantas verdes, especialmente en los cereales.

Estas sustancias poseen una misma cadena lateral larga y ramificada, la más activa de ellas es el alfa tocoferol, que contiene tres grupos metilo unidos al grupo crománico en posiciones 5, 7, 8. El gamma tocoferol es el que sigue en actividad biológica porque contiene dos grupos metilo en posiciones 7 y 8; luego sigue el beta tocoferol que es el menos activo de los tres.

El alfa tocoferol natural es dextrógiro, y las tres sustancias son de fácil oxidación; por lo que conviene protegerlas del aire y de la luz. Son estables en medio alcalino, y no se destruyen con la cocción.

1. Antioxidantes. Estos derivados del cromano se añaden a las grasas y aceites para conservarlos. En la mayoría de los países son pocos los productos permitidos que se agregan a los alimentos. Para el análisis de los antioxidantes se extraen las grasas (lipoides), por ejemplo, con alcohol acuoso, y a continuación hay separación de los extractos por medio de la cromatografía. Esta puede ser en capa fina o en papel; la primera es la mejor, y se trabaja con silicagel G, óxido de aluminio, poliamida o carbonato de zinc/óxido de aluminio, las más empleadas son las capas de silicagel.

Los tocoferoles son antioxidantes naturales, y el gamma es el más eficaz; difieren por el número y la posición de los grupos metilo en el anillo aromático. Tienen acción biológica diferente, considerándose el alfa como el más activo.

La acción metabólica en el hombre aún no es conocida. Ejercen la función

de proteger de la oxidación a las otras vitaminas liposolubles y a los ácidos grasos no saturados.

2. Fuentes Naturales. Se encuentran como vitaminas en algunas grasas vegetales (ver Cuadro N° 2)¹. Los animales son incapaces de efectuar su síntesis. Su distribución o reparto en la naturaleza es semejante a la de los carotenoides. Las grasas incoloras y los aceites oxidables como los secantes, tienen esta vitamina que se destruye al oxidarse.

CUADRO N° 2

P R O D U C T O	TOCOFEROL (mg/100 ml)	
	TOTAL	ALFA
Aceite de semilla de algodón	90	56
Aceite de nueces	22	11
Aceite de soja	140	10
Frutas	0.24-0.74	0.23-0.72
Maíz	1.7	0.84
Harina de avena	2.1	1.9
Mantequilla	2.4	---
Margarina	54	28
Hígado de buey	1.4	1.4
Huevos (unidad)	1.0	0.6

Una de las fuentes naturales más importantes de vitamina E es el aceite de semilla de trigo; también se encuentra en la semilla de algodón, cacahuete, lactucario, trébol, lechuga, alfalfa y otros.

Los tocoferoles se pueden encontrar libres, esterificados o acompañados de otras sustancias de composición desconocida.

Todavía no se ha podido demostrar que sean elementos esenciales de la dieta humana; pero sí, que son indispensables en las ratas y ratones para su normal reproducción.

3. Propiedades Físicas y Químicas.¹ La propiedad física de más interés comercial del alfa tocoferol es la solubilidad en las grasas.

Esta vitamina es un líquido oleoso, muy estable en estado puro, ligeramente amarillo; el índice de refracción es de 1.504 - 1.507. Es insoluble en agua, fácilmente soluble en alcohol, solventes orgánicos y aceites vegetales. Forma ésteres, tales como: alofanatos, d-alofanatos, p-nitrofeniluretanato.

También posee propiedades reductoras, por lo que es sensible a la oxidación y muestra un espectro de absorción en solución alcohólica, característico al ultravioleta, con un máximo de 292 m μ y un mínimo de 255 m μ .

En ausencia de oxígeno, resisten temperaturas de 200 grados centígrados. Los álcalis los destruyen muy despacio.

Son estables al calor en ausencia de oxígeno, en ácidos fuertes, en la luz visible, e inestables frente a los rayos ultravioleta, los álcalis y la oxidación.

Los ésteres son más estables que los libres, se usan para estabilizar los preparados de la vitamina A.

Con respecto al funcionamiento de la vitamina E en los animales, se dice

1. HOFFMAN, F., Compendio de vitaminas, La Roche & Cía, S.A., Basilea (Suiza) 1972, pp. 69

que los síntomas carenciales varían según la especie, la edad y el sexo del animal de experimentación. La incertidumbre en cuanto a la finalidad de esta vitamina en el hombre, se hace cada vez mayor porque otros compuestos pueden reemplazarla en algunas de sus funciones.

Según las Tablas Científicas¹ a la vitamina E se le atribuyen los siguientes efectos: neutralizar los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono, piridina, sulfito sódico, ésteres cresólicos y algunas sulfamidas.

Además, tiene acción reguladora sobre el aprovechamiento de los carbohidratos musculares; protege la degeneración de las grasas y la necrosis del hígado y páncreas.

Con relación a sus caracteres terapéuticos, es muy poco lo que podría decirse porque son contradictorios los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados. Se ha empleado con resultados variables en la angina de pecho, anemias rebeldes al tratamiento usual y en animales se han ensayado efectos relacionados con la esterilidad de las ratas, distrofia muscular y diabetes en presencia de aloxana; in vitro origina características en la sangre de ratas y esta reacción forma la base de un método de bioensayo para la vitamina, sin embargo, observaciones clínicas recientes han llevado a la "Junta de Alimentos y Nutrición" de los Estados Unidos a la conclusión de que la vitamina E es probablemente esencial en la alimentación del hombre.

1. DIEM, Konrad, (redacción), Tablas Científicas, Documenta Geigy, 6a. edición. Editorial J. R. Geigy S. A., Basilea (Suiza), 1965, pp. 462-463

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

En esta investigación se aplicaron métodos químicos cualitativos y cuantitativos; pero no se han hecho exactamente como lo plantea la bibliografía consultada sino que de acuerdo con las condiciones que se han presentado.

Con relación al material utilizado, éste es de vidrio como probetas, balones, pipetas, erlenmeyer, beaker y demás material de laboratorio. En cuanto al equipo empleado se encuentra: Espectrofotómetros, lámpara de luz ultravioleta, estufa y equipo de TLC¹, además, diferentes reactivos y otros materiales.

El presente capítulo está dividido en dos partes:

1. Determinación de la presencia de alfa tocoferol en las muestras de algas
2. Cuantificación de dicha vitamina.

En la primera se consideran los siguientes aspectos: la extracción, saponificación, purificación e identificación de la vitamina E, en ésta última se usa el DL-alfa tocoferol para bioquímica, que será la sustancia patrón (referencia).

En esta parte se utilizaron tres métodos:

- a. Método de Extracción o de Threalfall². Con disolventes orgánicos se extrae

1. TLC, son las siglas en inglés de la cromatografía en capa fina. Su nombre en dicho idioma es Thin-Layer Chromatography.

2. PIGRETTI, Marta M., "Influencias de las condiciones de cultivo sobre la biosíntesis del alfa tocoferol en Euglena gracilis, Revista Latinoamericana, Microbiología 15, Caracas (Venezuela), 1973, pp. 99-106

la parte lipóide¹ de la muestra. Este es apropiado para extraer lípidos; por eso se seleccionó para esta investigación; además, porque dentro del campo de los lipóides se tienen hidrocarburos y derivados liposolubles² y dentro de éstos, los derivados del cromano (tocoferoles).

i. Procedimiento. En un balón se colocaron 300 gramos de muestra, y se extrajo la fracción lipóide; para ello se agregó etanol hirviente y tres veces etanol-éter de petróleo (1:3 v/v). Cada extracción se hizo a reflujo durante 24 horas, y los extractos obtenidos se colocaron en un frasco ámbar; después se lavaron con éter de petróleo. Se descartó la capa etanólica, y sólo se analiza la etérea porque en ella se encuentran los tocoferoles.

Las capas etéreas se destilaron al vacío para concentrar el extracto y recuperar el solvente. Luego, el residuo obtenido se pasó cuantitativamente a un frasco ámbar y antes de taparlo se le pasó una corriente de nitrógeno para preservarlo de alguna descomposición.

b. Método de Saponificación.³ Los ésteres de tocoferilo con hidróxido potásico etanólico liberan alfa tocoferol y sustancias reductoras como la vitamina A, carotenoides, algunos esteroides y otros tocoferoles de escasa actividad vitamínica E.

-
1. LIPÓIDE, denominación genérica que se le da a un conjunto heterogéneo de sustancias que tienen como propiedad común ser solubles en los llamados disolventes de las grasas, como el éter, benceno, acetona, tetracloruro de carbono y otros.
 2. DERIVADOS liposolubles, son sustancias que se encuentran en la fracción insaponificable de los lipóides naturales.
 3. STRAHOCKER, R. Henning, Análisis de vitaminas, Métodos comprobados, Editorial Paz Montalvo, Madrid (España), 1967, pp. 355.

Con este proceso se elimina parte de las impurezas interferentes que obstaculizan la determinación de la vitamina E.

i. Procedimiento. El residuo que quedó después de evaporar los extractos etéreos, se trasladó cuantitativamente a un balón, empleando 20 mililitros de etanol; luego se añadieron 3 mililitros de una solución recién preparada, de hidróxido potásico (5 gramos de hidróxido potásico, en lentejas, en 10 mililitros de agua destilada), y un poco de hidroquinona. La mezcla se calienta sobre baño de vapor y a reflujo, durante media hora; en este período el alcohol debe hervir.

Una vez frío se transfirió, en forma cuantitativa, a una ampolla de separación y se hicieron extracciones con 3 porciones de 50 mililitros de éter de petróleo. Con movimiento suave los extractos etéreos se lavaron con 50 mililitros de agua, luego se agitaron fuertemente con una solución recién preparada de 1.5 gramos de hidróxido potásico en 50 mililitros de etanol al 30 por ciento. La capa etanólico-acuosa se eliminó y la etérea se lavó varias veces con agua; moviendo suavemente el matraz en los primeros lavados, y más fuerte en los últimos hasta que no hubo reacción alcalina en los líquidos del lavado. Posteriormente, se seca la capa etérea sobre sulfato sódico anhidro y con cuidado se evaporó al vacío.

Después se le hizo al residuo, un espectro infrarrojo¹ y se comparó con el patrón; el resultado fue positivo: presencia de vitamina E, contaminada con otras sustancias desconocidas.

1. ESPECTRO infrarrojo, con el espectrofotómetro Perkim-Elmer 710-A, y pastilla de cloruro de sodio.

c. Cromatografía en Capa Fina¹. Para identificar el alfa tocoferol se utilizó la Cromatografía en Capa Fina, con el objeto de eliminar la vitamina A, carotenoides, y otras sustancias presentes en la fracción insaponificable.

Este método es apropiado para efectuar buenas separaciones y purificar sus ancias.

Entre las ventajas de este proceso se tienen: el uso de pocos aparatos, pequeñas cantidades de muestra y poco tiempo.

Se basa en la separación de sustancias aplicables a capas finas de adsorbente, y con ayuda de diversos disolventes (principalmente orgánicos), la muestra se aplica en forma de punto o banda.

Al terminar el proceso se nota la separación de las sustancias presentes. Los tocoferoles se ven con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) o con reveladores, que se rocían para facilitar la identificación; ésta se hace por comparación de sus R_f . tanto del patrón como del problema.

Este procedimiento permite la separación, identificación cualitativa y análisis cuantitativo de los tocoferoles.

i. Constantes R^2 . El movimiento relativo de algunas sustancias respecto al disolvente, en un sistema cromatográfico dado, es constante y característico de la sustancia. Factores como: grueso de la capa, saturación de la cámara, humedad del aire, efectos de separación de mezclas, solventes y otros, los cuales son difíciles de reproducir, pueden ejercer una notable influencia en la separación y purificación cromatográfica.

. CROMATOGRAFIA en capa fina, llamada también Cromatografía en Capa Delgada o en Columna Abierta.

1. ABBOTT, David y Andrews, R. S., Introducción a la Cromatografía, 2a. Edición en Español, Editorial Alhambra, S.A., Madrid (España), 1970, pp. 8, 37-38, 59.

Uno de los más importantes aspectos de la cromatografía es que, en un sistema cromatográfico dado, el movimiento relativo de un compuesto con respecto al frente del disolvente es una propiedad característica y reproducible. En el caso de las cromatografías de papel y capa fina se expresa el movimiento de un compuesto como un valor de R_f , R_x y hR_f

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

En algunos casos, el frente de disolvente sale fuera del papel, y por eso es más conveniente expresar el movimiento de alguna sustancia por comparación con el movimiento de otra (que es similar químicamente). En este caso es mejor expresar los valores de R_x que los de R_f

$$R_x = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por la sustancia standar } x}$$

En los cuadros N° 18 y 19 se dan los R_f , R_x , hR_f . Los datos se tomaron con diferentes disolventes.

Para encontrar el hR_f sólo se multiplica el valor de $R_f \times 100$:

$$hR_f = R_f \times 100$$

Los diferentes datos tanto de R_f como R_x y hR_f fueron tomados con el comparador de áreas o multi-purpose template (ver Fig. N° 3).

Por medio de los R_f se identifica también el alfa-tocoferol.

Los disolventes usados en cromatografía se miden en una probeta y se agitan enérgicamente antes de su uso.

Los valores de R_f fueron comparados con la tabla N° 46 del libro de

Thin-Layer Chromatography.¹

ii. Reactivos. Para esta etapa se utilizaron los siguientes:

Reactivo de ácido fosfomolibdico (2.5 gramos de ácido fosfomolibdico se disuelven en etanol hasta 25 mililitros).

Reactivo de cloruro férrico (0.1 gramo de cloruro férrico cristalizado se disuelven en etanol hasta 100 mililitros).

Reactivo de 2-2' biperidilo (0.25 gramos de 2-2' biperidilo se disuelven en 100 mililitros de etanol).

iii. Procedimiento. Para separar e identificar el alfa-tocoferol de otras sustancias interferentes en el insaponificable, se usan placas de vidrio (5 x 20 cm) y diferentes espesores (0.5 y 0.25 mm) de silicagel² GF₂₅₄ tipo 60 luego se aplica varias veces en forma de punto; después de cada aplicación se seca para concentrar la sustancia en el punto de origen, esto es importante para una mejor separación. Las aplicaciones se hacen con micropipetas, jeringas o aplicador automático, a una distancia de 1.5 centímetros del borde inferior de la plaquita.

Se hace lo mismo con la sustancia patrón; las placas, se colocan dentro de una cámara cromatográfica saturada de ciclohexano cloroformo (1:1).

Cuando el frente del disolvente alcanza la altura conveniente (2 cms. antes de llegar al solvente del borde superior), se sacan las placas de la

1. STHAL, Egon, Thin-Layer Chromatography, 2a. Edición, Editorial Springer Verlag, Berlín (Alemania), 1969, pp. 285

2. SILICAGEL GF₂₅₄ tipo 60, adsorbente empleado que contiene yeso ^{como} aglutinante, una sustancia luminosa inorgánica no eluible que excitada con la luz ultravioleta de onda corta (254 nm) presenta fluorescencia intensa y tipo 60 porque es de poro mediano cuyo diámetro es de 60 Å.

cámara, luego, se procede a señalar la altura del disolvente y se realiza inmediatamente, la primera prueba de identificación al detectar el alfa tocoferol con la lámpara de luz ultravioleta de onda corta. Se señalan las manchas con una lesna (punzón) y se comparan los Rf. tanto del patrón como del problema.

Otra identificación es con cloruro férrico y 2-2' biperidilo; primero se rocía la placa con la solución de biperidilo y a continuación con cloruro férrico. Una mancha de color rosado aparece inmediatamente junto con la del patrón; luego aparecen las de otras sustancias o de otros tocoferoles.

También se identifican con ácido fosfomolibdico, primero aparecen las manchas azules del alfa tocoferol y luego, las restantes. Si la cromatoplaque se expone a los vapores de amoníaco durante 3 minutos después de pulverizar, el fondo verde desaparece y las manchas azules se destacan con mayor nitidez; pero si se calientan las cromatoplaques, una vez rociadas, se hacen visibles también, como manchas azules, otras sustancias reductoras presentes (esteroides, carotenoides, constituyentes de grasas), así se establece el grado de pureza que tiene la fracción insaponificable.

La identificación más segura es la que consiste en hacer un espectro infrarrojo y compararlo con la sustancia patrón.

Para purificar el alfa tocoferol se usa TLC en bandas. En esta investigación se usaron cromatoplaques 20 x 20 centímetros y al finalizar el desarrollo cromatográfico se examinó la placa a la luz ultravioleta cuando todavía estaba húmeda. Después se señalaron las manchas con la punta de un punzón y se recogió el polvo de las áreas enmarcadas, con una microespátula. Luego se colocó en un balón pequeño que contenía 5 mililitros de etanol, se lavó bien

la silica (para extraerle todo el tocoferol) y se filtró, después se evaporó con vacío para concentrar la sustancia.

A ésta se le hizo un espectro infrarrojo para compararlo con el espectro patrón, con el fin de identificar el alfa tocoferol. La prueba fue positiva pero con impurezas; para quitárselas se utilizó tres veces más el TLC. Posteriormente se hicieron nuevos espectros infrarrojos para obtener mejores resultados.

De esta forma se aisló y purificó el alfa tocoferol y se procedió a la cuantificación del mismo.

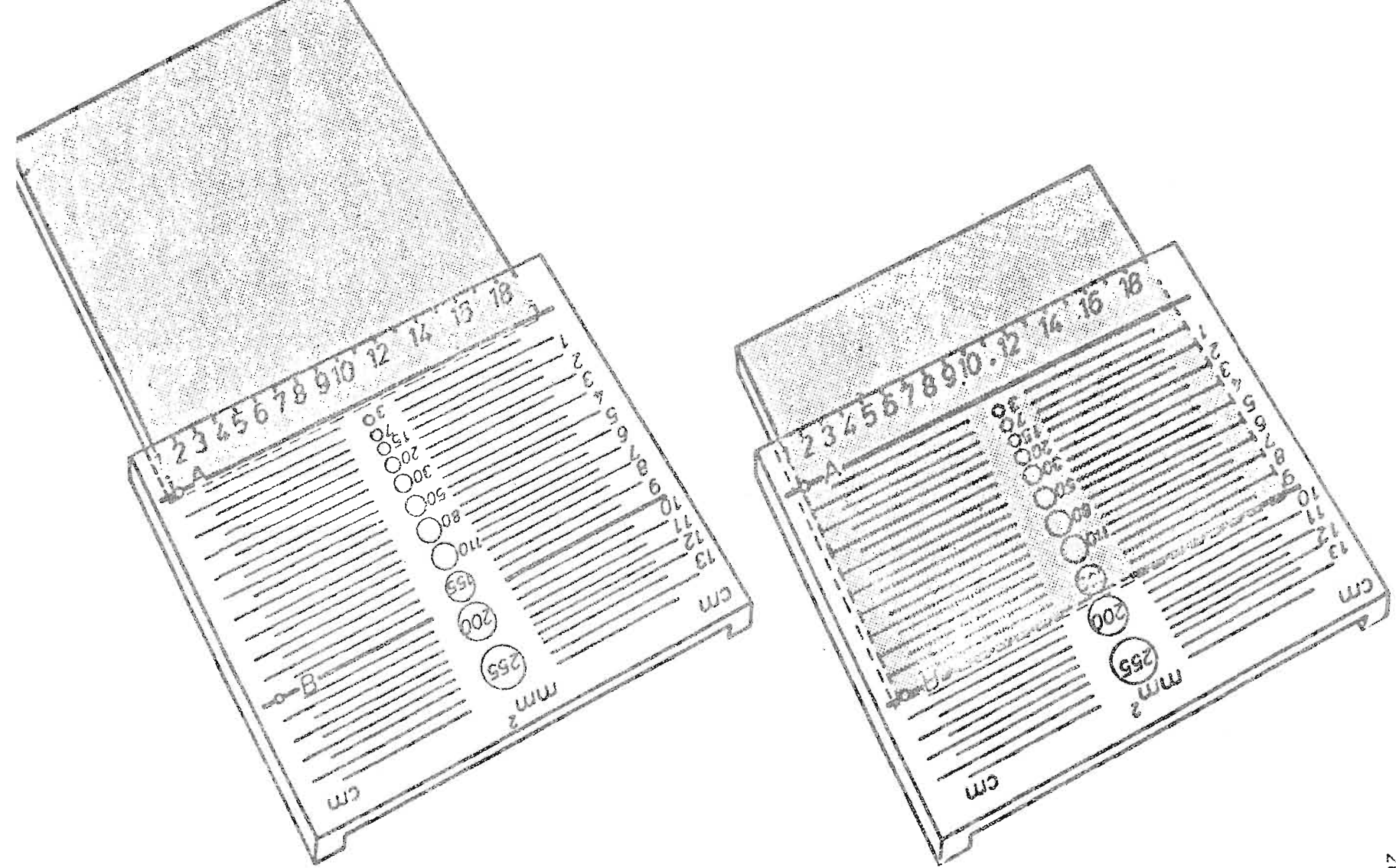


Fig. 3. Comparador de áreas (Multi-purpose Template) para las constantes R y método de comprobación.

Cuantificación del Alfa-Tocoferol.

En esta parte se determina la cantidad de alfa tocoferol presente en muestra, por medio de métodos cuantitativos.

Estos análisis se basan en la facilidad de oxidación del alfa tocoferol libre, dado que éste es sensible a la luz y al oxígeno atmosférico; rápida y cuidadosamente debe procederse a la hidrólisis de los ésteres de tocoferilo como en todas las operaciones analíticas necesarias para su determinación.

Para la cuantificación se pesa una muestra de 500 gramos, y se aplican los métodos de extracción, saponificación y TLC (cuatro veces), descritos anteriormente. Luego, el extracto puro obtenido se lleva a volumen de 10 mililitros con etanol; siendo esta dilución la solución madre. Se comienza de inmediato con los siguientes métodos cuantitativos:

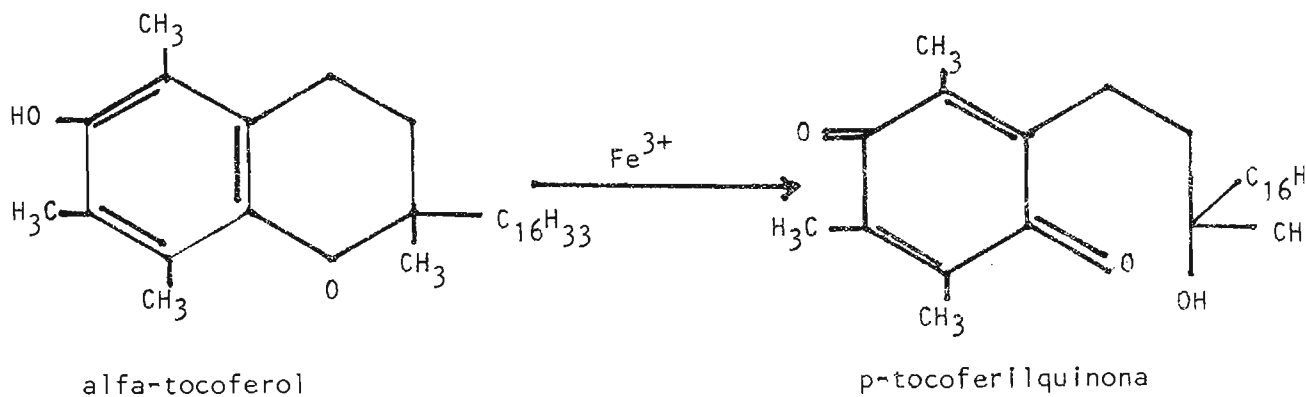
Método de Emmerie y Engel¹

Se basa en la reducción de los iones férrico a ferroso, que forman un complejo color rojo con el bipyridilo. Se emplea para determinar pequeñas cantidades de tocoferol, tanto en preparaciones farmacéuticas como en alimentos, frutas, líquidos biológicos, cereales y otros.

En la mayoría de los casos su especificidad depende del empleo previo de los procesos de aislamiento y purificación adecuados.

El alfa tocoferol que se libera por saponificación se convierte por oxidación con cloruro férrico, en un derivado p-quinónico (p-tocoferil quinona).

¹ STROEHECKER, R. Henning, H. M., Análisis de vitaminas, métodos comprobados, Edición, Editorial Paz Montalvo, Madrid (España), 1967, pp.350-358



i. Procedimiento. Primero se hizo la curva de calibración y, para preparar las diferentes soluciones, se usó la sustancia patrón. Se pesaron 100 miligramos de DL-alfa tocoferol, se disolvieron en una cantidad de 10 mililitros de etanol; luego se trasladaron cuantitativamente a un balón ámbar de 100 mililitros y se aforaron con el mismo disolvente. Después se tomaron de esta solución 5 mililitros y se diluyeron en otro balón similar con etanol, hasta la señal de aforo.

Luego de esta dilución se tomaron en matraces aforados de 10 mililitros los siguientes volúmenes:

- 0.5 ml. (25 ug.)
- 1.0 ml. (50 ug.)
- 1.5 ml. (75 ug.)
- 2.0 ml. (100 ug.)
- 2.5 ml. (125 ug.)
- 3.0 ml. (150 ug.)

Posteriormente se añadieron a cada frasco 0.25 mililitros de la solución de bipyridilo y 0.25 mililitros de la solución de cloruro férrico para diluirlo hasta la señal de aforo, con etanol.

Dos minutos después de la adición de la solución de cloruro férrico, se

midió la extinción de cada solución en una cubeta de 1 centímetro y a una longitud de onda de 520 nm., llevando un blanco de reactivo.

Los valores obtenidos se representan frente al número de microgramos de alfa tocoferol en 10 ml. de la solución final.

Para el problema de esta investigación se tomó, de la solución madre, una alícuota de 1 mililitro que se transfirió cuantitativamente a un balón de 25 mililitros y se aforó con el mismo disolvente (Solución N° 2).

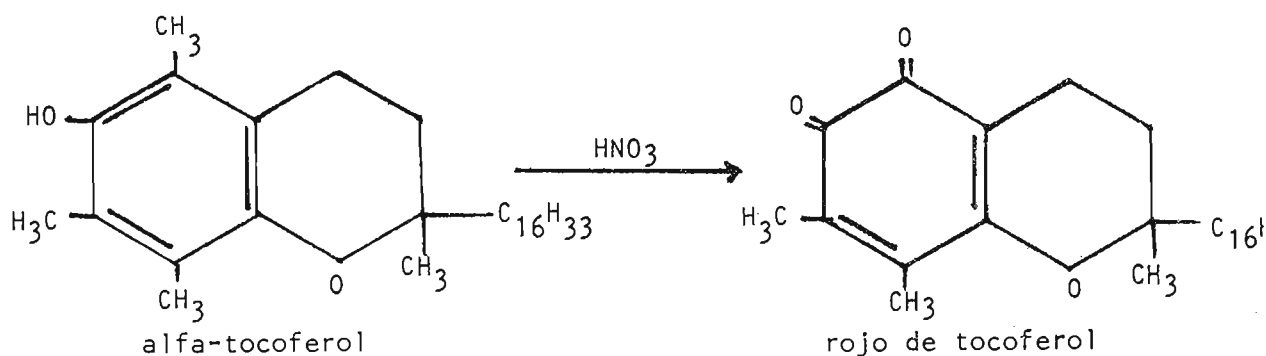
De esta última se tomaron alícuotas de 0.5, 1.0, y 1.5 ml.; se les hizo igual procedimiento y la absorbancia obtenida se graficó en la curva de calibración para conocer cuántos microgramos hay en dichos volúmenes de muestra.

La cantidad total del tocoferol de la muestra se obtuvo a partir del dato anterior, teniendo en cuenta el peso original y el factor de dilución.

Este método se hizo con dos tipos de espectrofotómetros (Coleman 295 y Perkin Elmer 124).

b. Análisis fotométrico de la vitamina E por el método de M. Furter y R.E. Meyer¹

Consiste en la oxidación, por medio del ácido nítrico, del tocoferol libre y purificado, originándose un producto de reacción coloreada (rojo de tocoferol).



1. STROEHECKER, R. Henning, H. M., Análisis de vitaminas, métodos comprobados, Edición, Editorial Paz Montalvo, Madrid (España), 1967, pp.

i. Procedimiento. De la solución madre se tomaron 2 mililitros y se transfirieron cuantitativamente a un balón de 25 mililitros y se aforaron con etanol; luego se tomaron los siguientes volúmenes: 5.0, 6.0 y 7.0 mililitros, se colocaron en diferentes erlenmeyer y se les añadió etanol para tener volúmenes de 10 mililitros en cada uno, simultáneamente, se les añadió un mililitro de ácido nítrico, y por rotación se agitaron de inmediato, se calentaron hasta ebullición y luego, 10 minutos más, sobre baño de vapor. Después se enfriaron con agua corriente y se transfirieron cuantitativamente a balones volumétricos de 25 mililitros, para diluirlos con etanol hasta la señal de aforo.

Se hizo la curva de calibración, para ello se pesaron exactamente en un beaker pequeño (50 ml.) 100 miligramos de alfa tocoferol (patrón) y se disolvieron con un poco de etanol, después se traslada cuantitativamente a un balón volumétrico ámbar y se aforó a 100 mililitros con el mismo disolvente. De aquí se tomó una alícuota de 25 mililitros y se llevó a otro balón volumétrico de 100 mililitros aforándose con el mismo disolvente (concentración de 250 ug/cc).

De esta solución se tomaron los siguientes volúmenes:

1.0 ml. (250 ug.)

2.0 ml. (500 ug.)

3.0 ml. (750 ug.)

4.0 ml. (1000 ug.)

5.0 ml. (1250 ug.)

6.0 ml. (1500 ug.)

Y se les hizo, al mismo tiempo, el proceso anterior.

La extinción se midió frente a un blanco (agua), en cubetas de un centí-

metro, y a una longitud de onda de 470 nm. El contenido de alfa tocoferol se calcula a partir de la curva de calibración.

c. Determinación colorimétrica con ácido sulfúrico¹

El alfa tocoferol da un color amarillo en ácido sulfúrico al 90% v/v. La reacción coloreada obedece a la Ley de Beer, y es la base para determinar rápidamente el contenido de vitamina E en extractos, preparaciones farmacéuticas y otros.

Es probable que una sal de ozonio se forme durante la reacción. Este método es tan sensible como el de Emmerie y Engel.

i. Procedimiento. Se preparó una curva de calibración en la que se usó DL-alfa tocoferol. Se pesaron en un beaker de 50 mililitros, 100 miligramos de sustancia patrón, se disolvieron en una pequeña cantidad de ácido sulfúrico al 9% v/v y se trasladaron cuantitativamente a un balón ámbar de 100 mililitros con el mismo disolvente. De ésta última dilución se tomaron en baloncillos de 10 mililitros, los siguientes volúmenes:

0.5 ml. (25 ug.)

1.0 ml. (50 ug.)

1.5 ml. (75 ug.)

2.0 ml. (100 ug.)

2.5 ml. (125 ug.)

3.0 ml. (150 ug.)

Y se aforaron con ácido sulfúrico al 90% v/v. Se llevó un blanco que es una solución de ácido sulfúrico al 75% v/v. y se midió la extinción en

1. HASHMI, Manzur-Ul-Haque, Assay of Vitamins in pharmaceutical preparations. John Wiley y Sons, Londres, 1973, pp. 362.

cubetas de un centímetro y a una longitud de onda de 520 nm.

Para la sustancia problema se siguió el mismo tratamiento. Se tomaron de la Solución N° 2 (ver página 29), los volúmenes siguientes: 0.5, 1.0 y 1.5 mililitros.

Las extinciones obtenidas se graficaron en la curva de calibración y así se supo cuántos microgramos de alfa tocoferol hay en las alícuotas tomadas de la solución N° 2. La concentración total se encuentra al tener en cuenta el factor de dilución y el peso de la muestra inicial.

d. Método de Meenen¹.

Consiste en la titulación de la cantidad de iodo liberado en medio ácido y se usa una solución de almidón como indicador. La presencia de todo da un color azul característico.

La sensibilidad del indicador es aumentada por el ácido, y disminuye en presencia de sustancias orgánicas y calor.

El ion férrico oxida al ioduro y se libera iodo que se titula directamente con hiposulfato de sodio 0.01N.

i. Procedimiento. Se tomó una muestra de 5 mililitros de la solución madre para evaporarlos al vacío y el residuo se disolvió en 50 mililitros de éter de petróleo. Se añadieron 10 mililitros de una solución de 0.4% de cloruro férrico en alcohol etílico.

Después de ser agitada durante unos 10 minutos, se trató con un exceso de hidróxido de sodio al 10% en solución alcohólica; se formó un precipitado de

1. SAN MARTIN, Casamada, Ramón, Farmacognosia con Farmacodinamia, Editorial Científico-Médico, Madrid (España), 1968, pp. 991.

hidróxido de hierro, se filtró y se lavó con éter de petróleo y agua hasta eliminación de los jabones; luego se disolvió en ácido sulfúrico caliente al 20% y se le adicionó solución de yoduro potásico.

Después de 3 minutos, el yodo liberado se tituló con hiposulfato de sodio 0.01 N en presencia de una solución de almidón, como indicador, ésta se prepara así: se hace una pasta con 2 gramos de almidón y 10 miligramos de ioduro mercúrico, se tritura con 30 mililitros de agua; lista la pasta, se añade poco a poco a un litro de agua hirviente y se deja de hervir hasta que se obtiene una solución clara. Luego se enfría y se envasa.

e. Método de Comprobación¹

Es una valoración casi cuantitativa que se obtiene al aplicar cantidades conocidas (patrón) y desconocidas (muestra) en placas cromatográficas.

Se comparan las manchas y de acuerdo con el área, espesor y volumen aplicado se halla la concentración. Se tiene muy en cuenta el factor de dilución y el peso inicial de la muestra.

Este es un método de TLC, en el que se hacen aplicaciones en forma de punto; listo el cromatograma se señalan inmediatamente las manchas y para poderlas identificar se usa la lámpara de luz ultravioleta de onda corta.

El proceso se lleva a cabo por medio de una curva de calibración usando un espesor de 0.5 mm y cromatoplasmas de 20 x 20 centímetros.

1. RANDERATH, Kurt, Cromatografía de Capa Fina, Enciclopedia de la Química Industrial, t. 8, Ediciones URMÓ S.A., Reimpresión Febrero 1970, España, pp. 184

i. Procedimiento. Se pesaron 100 miligramos de sustancia patrón y se disolvieron en una pequeña cantidad de etanol para luego transferirlo cuantitativamente a un balón ámbar de 100 mililitros y se aforó con el mismo disolvente.

Después se tomaron los siguientes valores:

0.5 ml. (25 ug.)

1.0 ml. (50 ug.)

1.5 ml. (75 ug.)

1.6 ml. (80 ug.)

1.7 ml. (85 ug.)

1.9 ml. (95 ug.)

2.0 ml. (100 ug.)

Y se aplicaron en forma de punto en las cromatoplasas

De la solución N° 2 se tomaron volúmenes de 1 mililitro para aplicarlos entre las soluciones patrones.

CAPITULO V

CALCULOS Y RESULTADOS

En este capítulo se plantean los cálculos y resultados obtenidos al utilizar como muestra 300 gramos en la identificación y 500, en el análisis cuantitativo. Para los resultados se toma en cuenta el factor de dilución y el peso de la muestra. Se expresan en miligramos (mg.) y en porcentaje (%).

Además se agregan cuadros que contienen los datos de las curvas de calibración y los del alfa tocoferol; así como los cálculos respectivos y un cuadro final donde se comparan los diferentes resultados.

Con relación a los métodos fotométricos, se grafica la concentración (microgramos) en el eje de las abcisas contra absorbancia en el eje de las ordenadas; mientras que en el de comprobación, el gráfico varía en el eje de las "Y" porque se usan áreas en milímetros cuadrados.

Para encontrar la concentración del problema se interpolan las extinciones obtenidas en la curva de calibración.

Los Rf. se toman en diferentes disolventes y la muestra se aplica disuelta en etanol.

También se reporta un método volumétrico, como información; aun cuando el resultado está incluido dentro del rango de los otros métodos no se le dio importancia debido a que sólo se hizo una valoración.

En el cuadro N° 3 están las medidas realizadas en el espectrofotómetro Coleman 295, al utilizar como sustancia patrón DL-alfa tocoferol:

METODO DE EMMERIE Y ENGEL

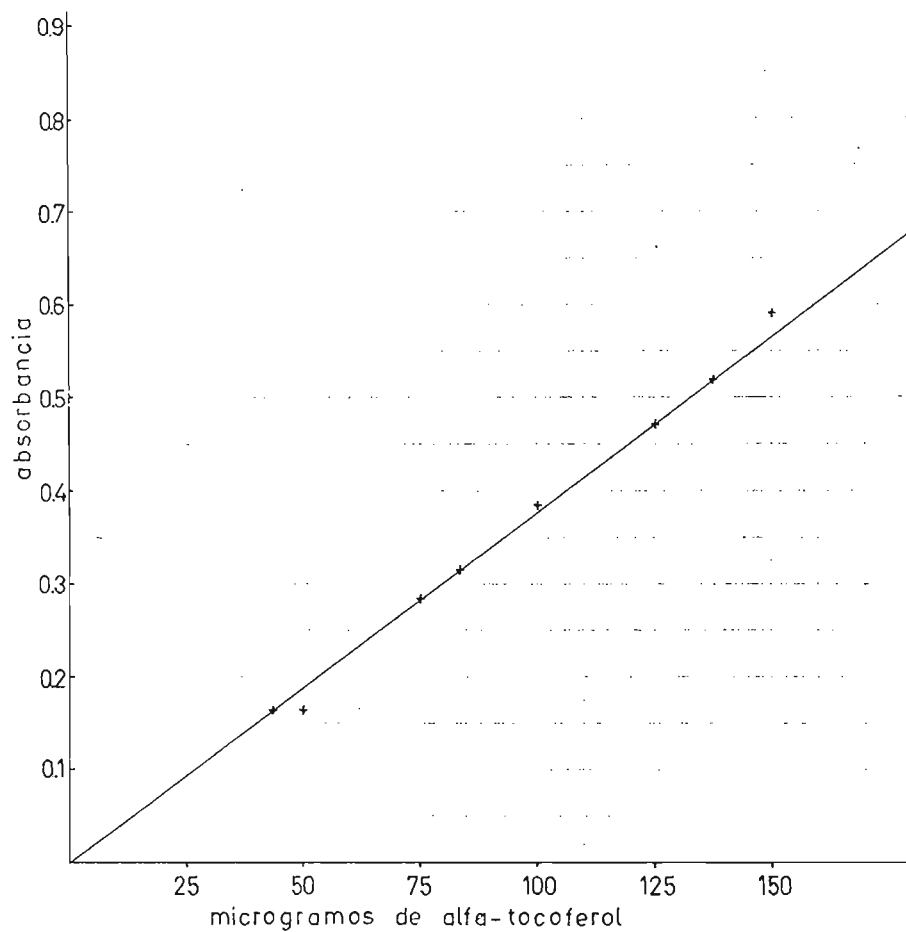


GRAFICO No.1. curva de calibración del alfa tocoferol con el espectrofotómetro coleman 295

CUADRO N° 3

METODO DE EMMERIE Y ENGEL		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	25 ug.	0.090
1.0 ml.	50 ug.	0.165
1.5 ml.	75 ug.	0.285
2.0 ml.	100 ug.	0.385
2.5 ml.	125 ug.	0.473
3.0 ml.	150 ug.	0.592

Aparecen en el cuadro N° 4, los datos de la sustancia problema al emplear la curva de calibración correspondiente (ver gráfico N° 1) y utilizar el mismo espectrofotómetro:

CUADRO N° 4

METODO DE EMMERIE Y ENGEL		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	43.4 ug.	0.165
1.0 ml.	83.3 ug.	0.315
1.5 ml.	137.3 ug.	0.520

METODO DE EMMERIE Y ENGEL					
VOLUMEN	C O N C E N T R A C I O N				
	Alícuota	Solución N° 2 (25 ml.)	Solución Madre (10 ml.)	M u e s t r a Miligramos Porcentaje	
0.5 ml.	43.4 ug.	2170 ug.	21700 ug.	21.7	0.0043 %
1.0 ml.	83.3 ug.	2082.5 ug.	20825 ug.	20.825	0.0041 %
1.5 ml.	137.3 ug.	2288.3 ug.	22883 ug.	22.883	0.0045 %

Cuadro N° 5 Resultados obtenidos con el método de Emmerie y Engel; se partió de una muestra de 500 gramos de algas Chara ceylanica.

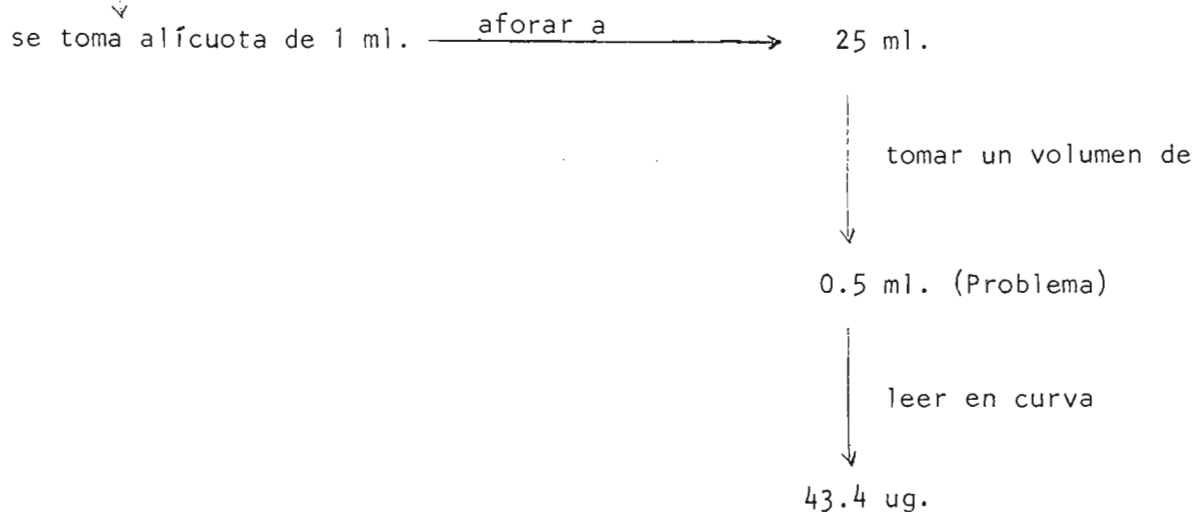
1. Cálculos:

Tomando en cuenta el factor de dilución y el peso de la muestra, los cálculos son similares en todos los métodos.

Por ejemplo, para obtener los datos del Cuadro N° 5 se partió de una muestra de 500 gramos, y el extracto obtenido se llevó a volumen de 10 mililitros, así se forma la Solución Madre, de la cual se tomó un mililitro y se aforó a 25 mililitros, ésta será la Solución N° 2, de aquí se partió para tomar diferentes alícuotas, que fueron las soluciones problemas.

Luego, las extinciones obtenidas se interpolaron en la curva de calibración para encontrar la concentración de dichas alícuotas.

Solución Madre



Entonces:

$$\begin{array}{rcl} 0.5 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 43.4 \text{ ug.} \\ 25 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & X \end{array} \quad \begin{array}{l} X = 2170 \text{ ug./25 ml.} \\ \\ = 2170 \text{ ug./1 ml.} \end{array}$$

Luego:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 2170 \text{ ug.} \\ 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & X \end{array} \quad \begin{array}{l} X = 21700 \text{ ug./10 ml.} \\ \\ = 21700 \text{ ug./500 g.} \\ \\ = 21.7 \text{ mg./500 g.} \\ \\ = 0.00217 \text{ g./500 g.} \end{array}$$

Ahora, para encontrar el porcentaje lo relacionamos a 100 gramos de muestra:

$$\begin{array}{rcl} 500 \text{ g.} & \underline{\hspace{2cm}} & 0.0217 \text{ g.} \\ 100 \text{ g.} & \underline{\hspace{2cm}} & X \end{array}$$

$$X = 0.00434 \%$$

La muestra de 500 gramos de algas tiene el 0.00434 % de alfa tocoferol.

METODO DE EMMERIE Y ENGEL

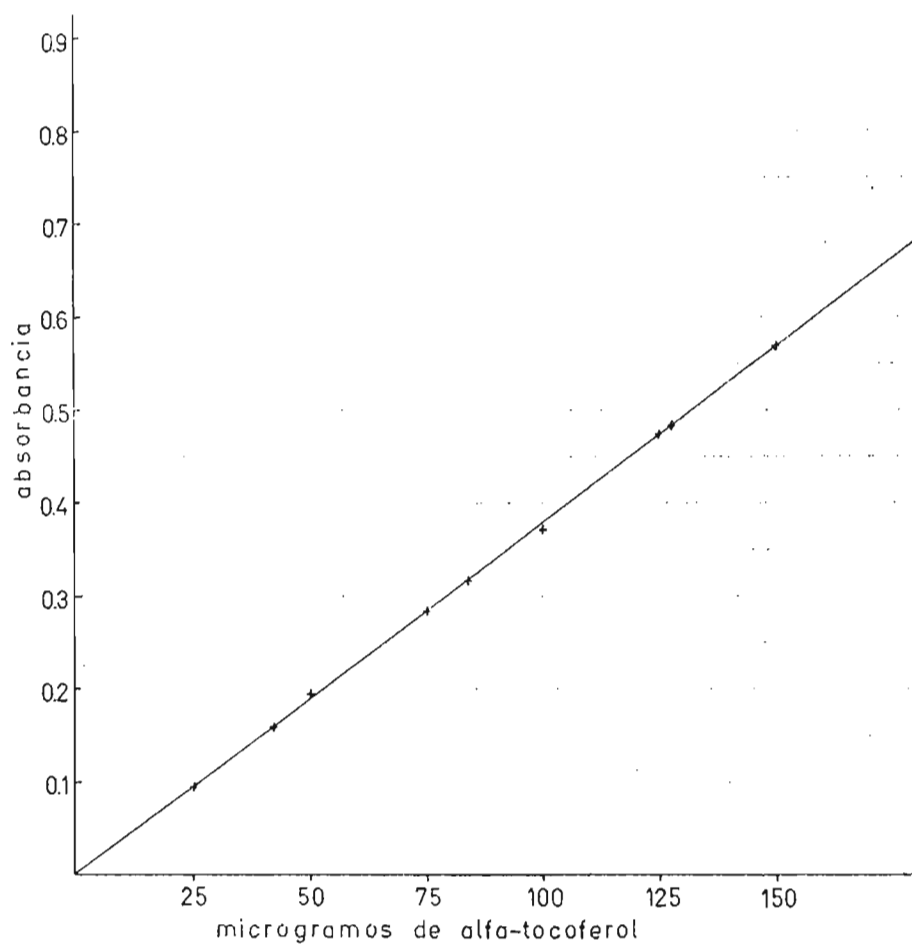


GRAFICO No. 2. curva de calibración del alfa-tocoferol con el espectrofotómetro perkin-elmer 124

Al aplicar el método de Emmerie y Engel se obtuvieron los datos que están en el cuadro N° 6, utilizados para hacer la curva de calibración (ver gráfico N° 2). Se usó el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124:

CUADRO N° 6

METODO DE EMMERIE Y ENGEL		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	25 ug.	0.095
1.0 ml.	50 ug.	0.195
1.5 ml.	75 ug.	0.285
2.0 ml.	100 ug.	0.373
2.5 ml.	125 ug.	0.473
3.0 ml.	150 ug.	0.570

En el cuadro N° 7 se presentan los datos de la solución problema al interpolar las extinciones en la curva de calibración, se usó el mismo espectrofotómetro:

CUADRO N° 7

METODO DE EMMERIE Y ENGEL		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	42 ug.	0.160
1.0 ml.	83.5 ug.	0.317
1.5 ml.	127.4 ug.	0.484

METODO DE EMMERIE Y ENGEL					
VOLUMEN	C O N C E N T R A C I O N				
	Alícuota	Solución N° 2 (25 ml.)	Solución Madre (10 ml.)	M u e s t r a Miligramos Porcentaje	
0.5 ml.	42 ug.	2100 ug.	21000 ug.	21.0	0.0042 %
1.0 ml.	83.5 ug.	2087.5 ug.	20875 ug.	20.875	0.0041 %
1.5 ml.	127.4 ug.	2123.3 ug.	21233 ug.	21.233	0.0042 %

Cuadro N° 8 Resultados obtenidos con el método de Emmerie y Engel. Se partió de una muestra de algas de 500 gramos.

METODO DE M.FURTER Y R.E.MEYER

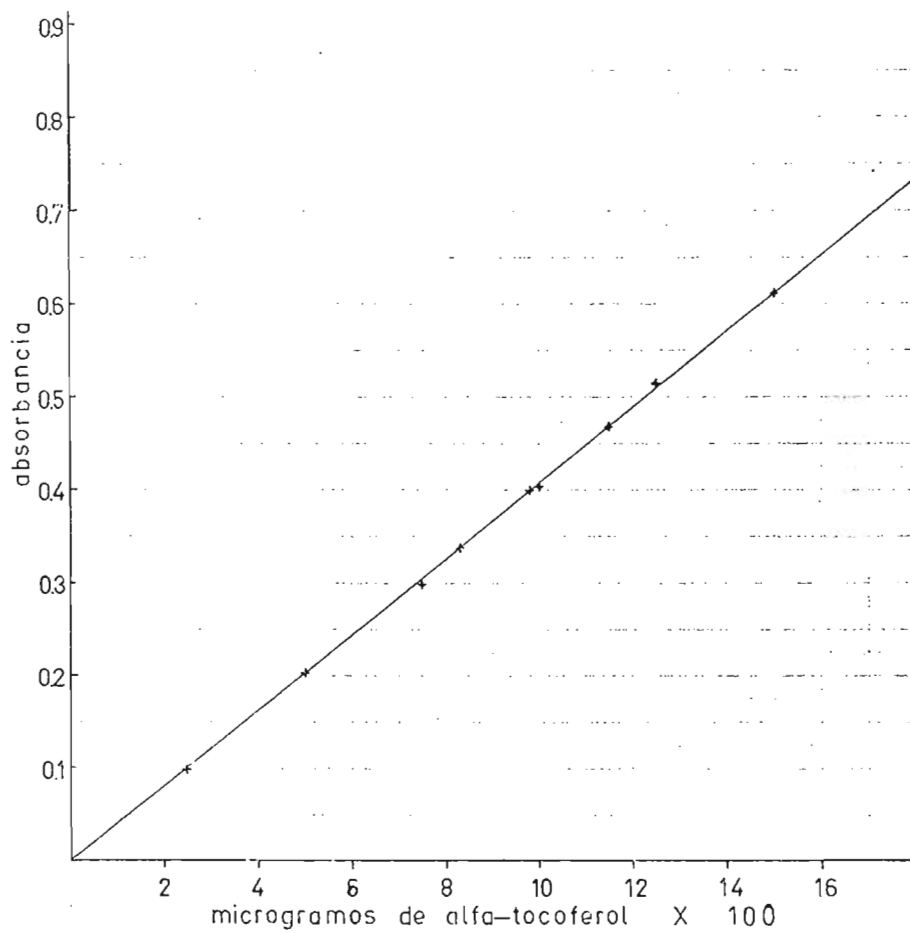


GRAFICO No. 3. curva de calibración del alfa-tocoferol con el espectrofotómetro perkin-elmmer 124

Los resultados obtenidos con el método de M. Furter y R. E. Meyer, aparecen en el cuadro N° 9; utilizados para la curva de calibración (ver gráfico N° 3). Se usó el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124:

CUADRO N° 9

METODO DE M. FURTER Y R.E.MEYER		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
1.0 ml.	250 ug.	0.102
2.0 ml.	500 ug.	0.203
3.0 ml.	750 ug.	0.300
4.0 ml.	1000 ug.	0.405
5.0 ml.	1250 ug.	0.514
6.0 ml.	1500 ug.	0.613

En el cuadro N° 10 están los datos de la sustancia problema, con el mismo espectrofotómetro. Para encontrar la concentración se interpolaron las absorbancias obtenidas:

CUADRO N° 10

METODO DE M. FURTER Y R. E. MEYER		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
5.0 ml.	830 ug.	0.338
6.0 ml.	980 ug.	0.400
7.0 ml.	1150 ug.	0.470

METODO DE M. FURTER Y R. E. MEYER					
VOLUMEN	C O N C E N T R A C I O N E S				
	Alícuota	Solución N° 2 (25 ml.)	Solución Madre (10 ml.)	M u e s t r a Miligramos Porcentaje	
5.0 ml.	830 ug.	4150 ug.	20750 ug.	20.75	0.0040 %
6.0 ml.	980 ug.	4083.3 ug.	20416.6 ug.	20.41	0.0040 %
7.0 ml.	1150 ug.	4107.1 ug.	20535.7 ug.	20.53	0.0041 %

Cuadro N° 11 Resultados de la solución problema. Se usó el espectrofotómetro Perkin-Elmer 124

METODO DEL ACIDO SULFURICO

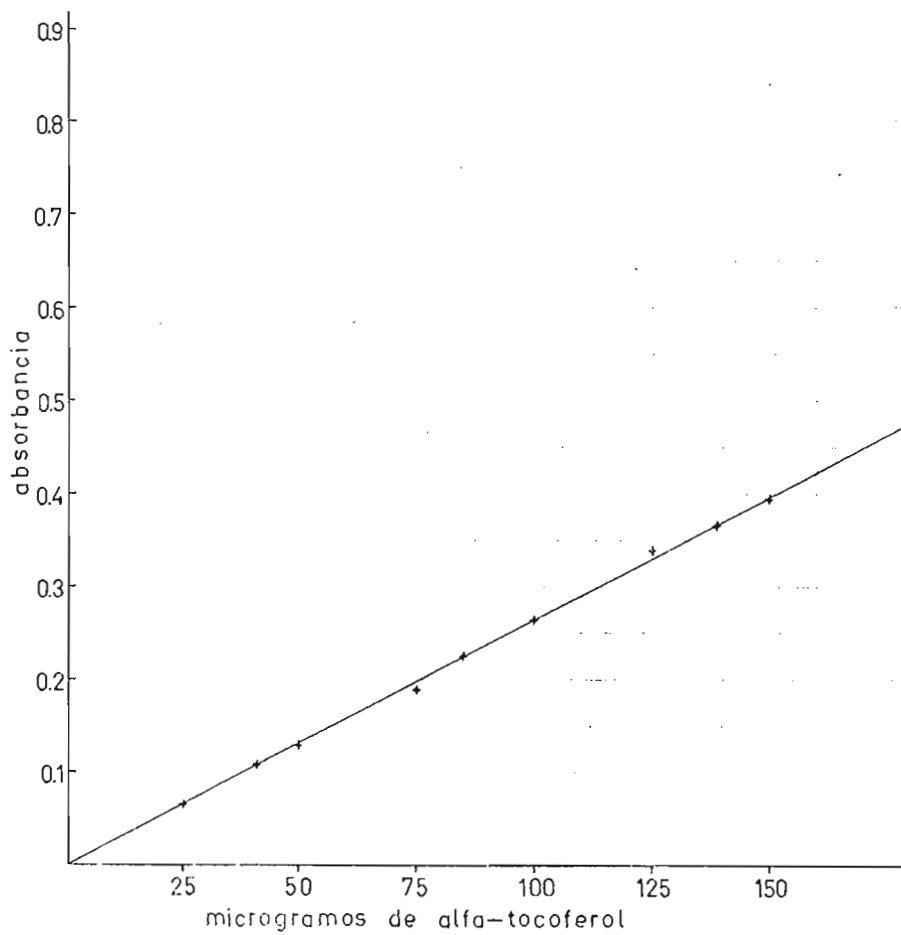


GRAFICO No.4. curva de calibración del alfa-tocoferol con el espectrofotómetro coleman 295

En el cuadro N° 12 aparecen los datos correspondientes a la curva de calibración (ver gráfico N° 4). Se utilizó el espectrofotómetro Coleman 295:

CUADRO N° 12

METODO DEL ACIDO SULFURICO		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	25 ug.	0.065
1.0 ml.	50 ug.	0.130
1.5 ml.	75 ug.	0.187
2.0 ml.	100 ug.	0.263
2.5 ml.	125 ug.	0.338
3.0 ml.	150 ug.	0.395

En el siguiente cuadro se presentan los datos de la sustancia problema, leídos con el mismo espectrofotómetro:

CUADRO N° 13

METODO DEL ACIDO SULFURICO		
VOLUMEN	CONCENTRACION	ABSORBANCIA
0.5 ml.	41 ug.	0.108
1.0 ml.	85 ug.	0.225
1.5 ml.	139 ug.	0.367

METODO DEL ACIDO SULFURICO					
VOLUMEN	CONCENTRACIONES				
	Alícuota	Solución N° 2 (25 ml.)	Solución Madre (10 ml.)	Muestra Miligramos Porcentaje	
0.5 ml.	41 ug.	2050 ug.	20500 ug.	20.5	0.0041 %
1.0 ml.	85 ug.	2125 ug.	21250 ug.	21.25	0.0042 %
1.5 ml.	139 ug.	2316.6 ug.	23166 ug.	23.166	0.0046 %

Cuadro N° 14 Resultados obtenidos con el método del ácido sulfúrico. Se usó el espectrofotómetro Coleman 295.

METODO DE COMPROBACION

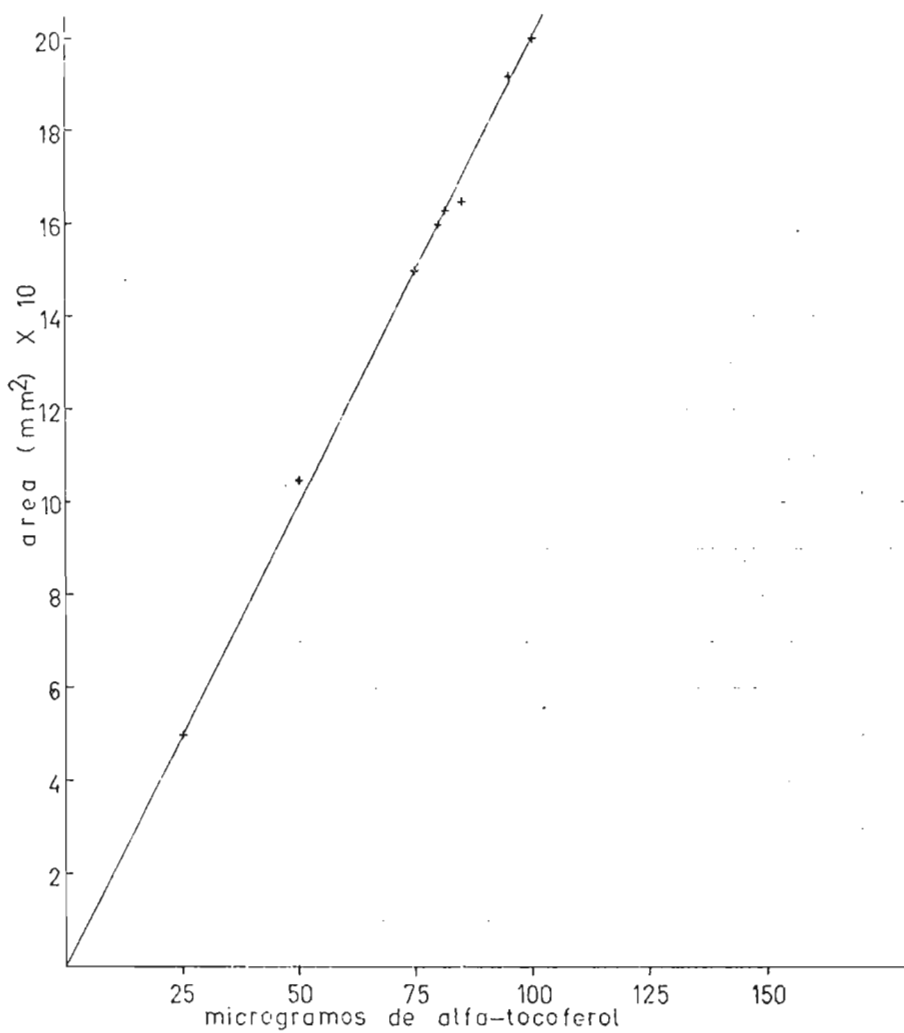


GRAFICO No. 5. curva de calibración del alfa-tocoferol con el comparador de areas

El método de Comprobación dio los resultados del cuadro N° 15. Se utilizó un espesor de 0.5 mm:

CUADRO N° 15

METODO DE COMPROBACION		
VOLUMEN	CONCENTRACION	AREA
0.5 ml.	25 ug.	50 mm ²
1.0 ml.	50 ug.	105 mm ²
1.5 ml.	75 ug.	150 mm ²
1.6 ml.	80 ug.	160 mm ²
1.7 ml.	85 ug.	165 mm ²
1.9 ml.	95 ug.	192 mm ²
2.0 ml.	100 ug.	200 mm ²

En el siguiente cuadro aparecen los datos de las concentraciones y áreas obtenidas por el método de comparación, se usaron placas 20 x 20 cm. y con espesor de 0.5 mm.

CUADRO N° 16

METODO DE COMPROBACION		
VOLUMEN	CONCENTRACION	AREA
1.0 ml.	81.5 ug.	163 mm ²
1.0 ml.	80.0 ug.	160 mm ²
1.0 ml.	85.0 ug.	165 mm ²

M E T O D O D E C O M P R O B A C I O N					
VOLUMEN	C O N C E N T R A C I O N				
	Alícuota	Solución N° 2 (25 ml.)	Solución Madre (10 ml.)	M u e s t r a Miligramos Porcentaje	
1.0 ml.	81.5 ml.	2037.5 ug.	20375 ug.	20.375	0.0040 %
1.0 ml.	80.0 ml.	2000 ug.	20000 ug.	20.0	0.004 %
1.0 ml.	85.0 ml.	2125 ug.	21250 ug.	21.250	0.0042 %

Cuadro N° 17 Resultados obtenidos por el método de comprobación, se usó el comparador de áreas (multi-purpose template), que es parte del equipo de TLC. También se usaron placas 20 x 20 cm.

METODO DE MEENEN

Cálculos:

Este es un método volumétrico, en él 1 mililitro de la solución de hiposulfito de sodio 0.01 N es igual a 2.15 miligramos de alfa tocoferol.

Datos:

Mililitros gastados de hiposulfito de sodio = 5.2 ml.

alícuota tomada de la solución madre = 5.0 ml.

volumen de la solución madre = 10 ml.

Entonces:

1 ml. de hiposulfito _____ 2.15 mg. de alfa tocoferol

5.2 ml. de hiposulfito _____ X

X = 11.18 mg. de alfa tocoferol en la alícuota de 5 ml.

Luego:

5 ml. _____ 11.18 mg. de alfa tocoferol

10 ml. _____ X

X = 22.36 mg./10 ml.

= 0.02236 g./500 g.

= 0.0044 g./100 g.

= 0.0044 %

CUADRO N° 18

DISOLVENTE	a	b	R_f	hR_f
Ciclohexano-Cloroformo (1:1 v/v)	13.6 cm.	16.7 cm.	0.814	81.4
	13.8 cm.	17.0 cm.	0.811	81.1
	13.4 cm.	16.5 cm.	0.812	81.2
		promedio	0.8123	81.23
Cloroformo	11.2 cm.	16.5 cm.	0.678	67.8
	11.0 cm.	16.2 cm.	0.679	67.9
	11.0 cm.	16.5 cm.	0.666	66.6
		promedio	0.674	67.4
Benceno	10.5 cm.	18.0 cm.	0.583	58.3
	10.5 cm.	18.0 cm.	0.577	57.7
	10.6 cm.	18.5 cm.	0.572	57.2
		promedio	0.577	57.7

Valores de R_f y hR_f con diferentes disolventes y placas de 5 x 20 cm., con espesor de 0.25 mm.

C U A D R O N° 19

DISOLVENTE	a	b	R_x
Ciclohexano: cloroformo (1:1 v/v)	13.4	13.6	0.985
	13.3	13.5	0.985
	13.4	13.5	0.992
		promedio =	0.987
Cloroformo	11.0	11.5	0.956
	11.5	11.5	1.0
	11.2	11.5	0.973
		promedio =	0.976
Benceno	10.5	10.6	0.990
	10.4	10.5	0.990
	10.5	10.6	0.990
		promedio =	0.990

Valores de R_x con diferentes disolventes y placas de 5 x 20 cm., espesor de 0.25 mm.

C U A D R O N° 20

		ALFA TOCOFEROL (%)	
Emmerie y Engel (Fotométrico) E. Coleman 295 promedio	0.0043	%
Emmerie y Engel (Fotométrico) E. Perkin-Elmer 124 promedio	0.0041	%
M. Furter y R. E. Meyer (Fotométrico) E. Perkin-Elmer 124 promedio	0.0040	%
Acido Sulfúrico (Fotométrico) E. Coleman 295 promedio	0.0043	%
Comprobación promedio	0.0040	%
Meenen	0.0044	%

Cuadro final de comparación de resultados obtenidos con los métodos aplicados.

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

En el presente trabajo se obtuvo una pequeña cantidad de alfa-tocoferol en una muestra de 500 gramos de alga Chara ceylanica.

Aún cuando se tomaron las precauciones necesarias, durante todo el proceso de la investigación, se dieron pérdidas por oxidación, debido a la sensibilidad del alfa tocoferol al oxígeno atmosférico. Esto ocasiona una disminución del contenido real de dicha vitamina en las mencionadas plantas. El porcentaje de error se incrementa a medida que es menor la cantidad determinada.

También contribuye a crear error, la presencia de numerosas sustancias reductoras que se hayan en los productos naturales, aunque éstas sean eliminadas por métodos cromatográficos.

Sin embargo, los resultados obtenidos son valederos porque el grado de pérdida o error es mínimo y, naturalmente, no influye en la determinación de la presencia del alfa tocoferol en el alga mencionada.

Es necesario agregar que entre los métodos de cuantificación utilizados, el mejor es el método fotométrico de Emmerie y Engel con el espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer 124; pero antes deberá realizarse una buena purificación y separación por cromatografía en capa fina. Con respecto a los métodos cualitativos para la identificación de dicha vitamina el mejor es haciendo un espectro infrarrojo y comparándolo con el espectro patrón.

En vista del escaso rendimiento de alfa tocoferol en dichas algas, no vale la pena considerarla como fuente potencial de vitamina E. Sin embargo, se recomienda la investigación de otro tipo de vitaminas, proteínas, carbohidratos y otras sustancias importantes, a fin de determinar su utilidad como fuente de alimentación humana.

R E S U M E N

Este estudio es una investigación tanto cualitativa como cuantitativa del alfa-tocoferol en algas macroscópicas de la Flora Salvadoreña especie Chara ceylanica.

Se obtuvo un rendimiento que oscila entre 0.0040% - 0.0044 % de vitamina E en 500 gramos de muestra, éste porcentaje es de acuerdo al método aplicado, siendo los mejores los métodos fotométricos y entre éstos el más recomendado es el de Emmerie y Engel con el espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer 124.

Las muestras fueron recolectadas en el Lago de Coatepeque, se secaron a temperatura ambiente y luego se procedió con la investigación química, que comprende los siguientes pasos:

1. extracción de la fracción lipide
2. saponificación de la fracción lipide
3. aplicación del método TLC a la fracción insaponificable
4. cuantificación del alfa tocoferol

Con disolventes orgánicos se extrajo la fracción lipide de dichas algas, luego se aplicó cromatografía en capa fina (TLC), llevando una sustancia patrón para separar, identificar y purificar el alfa tocoferol, después se le aplica los métodos cuantitativos al extracto que se obtiene por TLC.

Los solventes y reactivos utilizados en todo el experimento son químicamente puros, el material de vidrio usado estaba limpio y libre de impurezas y el agua que se usó fue agua destilada.

BIBLIOGRAFIA CITADA

A. LIBROS

1. ABBOTT, David y Andrews, R. S., Introducción a la cromatografía, 2a. Edición en Español, Editorial Alhambra, S. A. Madrid (España), 1970, pp. 8, 37-38, 59.
2. CONNORS, Kenneth Antonio, A. textbook of Pharmaceutical Analysis, 2nd. Edition, Wiley-Interscience Publication, New York, United States of America, 1975, pp. 94-106.
3. DIEM, Konrad, (redactor), Tablas Científicas, Documenta Geigy, 6a. Edición, Editorial Sociedad Alianza de Artes Gráficas (SADAG), Barcelona (España), 1965, pp. 462-463.
4. FONT, Quer, Pfo, Enciclopedia Medicamenta, 6a. Edición, t.1, Editorial Labor S. A., Barcelona (España), 1962, pp. 59-64.
5. HASHMI, Manzur-Ul-Haque, Assay of vitamins in pharmaceutical preparations, 1a. Edición, John Wiley & Sons, Londres (Inglaterra), 1973, pp. 360-389.
6. HOFFMAN, F., Compendio de Vitaminas, La Roche & Cía, S. A. Basilea (Suiza) 1972, pp. 68-75.
7. KIRK, Raymond E. y Othmer, Donald F., Enciclopedia de Tecnología Química, t. xvi, Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana, México, 1966, pp. 198.
8. MARKS. John, Las vitaminas una revisión actualizada, J y A Churchill Limited, Madrid (España), 1968, pp. 61-66 y 155-157.
9. PALMER, Mervin C., Algas, 1a. Edición, Editorial Interamericana S. A., México, 1962, pp.55.

10. RANDEATH, Kurt, Cromatografía en Capa Fina, Enciclopedia de la Química Industrial, t. 8, Reimpresión, Madrid (España), 1970, pp. 184-186.
11. SAN MARTIN Casamada, Ramón. Farmacognosia con Farmacodinamia, Editorial Científico-Médica, Madrid (España), 1968, pp. 991-993.
12. STROHECKER, R. Henning, H. M., Análisis de vitaminas, métodos comprobados, Edición , Editorial Paz Montalvo, Madrid (España), 1967, pp. 355.
13. STHAL, Egon, Thin-Layer Chromatography, 2a. Edición, Editorial Springer Verlag, Berlín (Alemania), 1969, pp. 283-288, 263-271.

B. PUBLICACIONES PERIODICAS

1. PIGRETTI, M. Marta, "Influencia de las condiciones de cultivo sobre la biosíntesis del alfa tocoferol en *Euglena gracilis*", Revista Latinoamericana, Microbiología 15, Estados Unidos, 1974, pp. 99-

C. ENTREVISTAS Y CONFERENCIAS

1. LAGOS, Jorge Adalberto, Profesor de Botánica Farmacéutica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Entrevista realizada en la Ciudad Universitaria, 9 de febrero de 1976.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

A. LIBROS

1. CLAUS, Edward P. y Tyler, Varro E., Farmacognosia, 5a. Edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires (Argentina) 1968, pp. 363-364.
2. CALVETT, Fernando, Bioquímica para médicos, químicos y farmacéuticos, 2a. Edición, Editorial Alhambra, S. A. Madrid (España), 1971.
3. CELSI, Santiago A. y Iacobucci, Alberto D., Tratado Elemental de Química ORGÁNICA, 16a. Edición, Editorial Kapelusz, Buenos Aires (Argentina), 1964, pp. 75, 231, 246 y 341.
4. CRONQUIST, Arthur, Introducción a la Botánica, Compañía Editorial Continental, S. A., México, 1974, pp. 125-126 y 137-156.
5. DE GANDARIAS, J. M., Bioquímica y Fisiología General, 6a. Edición, Ediciones Toray, S. A. Barcelona (España), 1974, pp. 250-252.
6. DAWSON, Vale E., How to know the seaweeds, WM. C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa, 1956.
7. GRASS, J., Fundamentos de Bioquímica Médica, 5a. Edición, Ediciones Toray S. A., Barcelona (España), 1971, pp. 41, 52 y 185.
8. GILG, Ernest y Schurhoff, P. N., Botánica Aplicada a la Farmacia, 3a. Edición, Editora Nacional, Edinal, S. A. de R. L., México, 1960, pp. 183-184.
9. HIGUCHI, Takeru y Brochman-Hanssen, Elinar., Pharmaceutical Analysis, Interscience Publishers, Inc. New York (U.S.A.), 1971, pp. 647.
10. HARPER, Harold A., Manual de Química Fisiológica, 1a. Edición, El Manual Moderno, S. A., México, 1971, pp. 102-104, 325-326 y 429.

11. HOLMAN, Richard M. y Robbins, Wilfred M., Botánica General, 1a. Edición en Español, UTEHA, México, 1961, pp. 51-52, 200 y 326-334.
12. HILL-OVERHOLTS-POPP-GRAVE, Tratado de Botánica, Ediciones Omega, S. A., Barcelona (España), 1967, pp. 435-463.
13. KIRSCHENBAUER, H. G., Grasas y Aceites, Química y Tecnología, Traducción de la 2a. Edición, Compañía Editorial Continental, S. A., México 1964, pp. 15, 31, 61.
14. McELVAIN, Samuel M., La caracterización de los compuestos orgánicos, 3a. Edición, Ediciones Aguilar, S. A., Madrid (España), 1968, pp. 89-91 y 127-128.
15. PRESCOTT, G. W. How to grow the fresh water algae, W.M.C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa, 1974, pp. 22-23.
16. ROSEMBERG, H. R., Chemistry and Physiology of vitamin, Revised reprint, Interscience Publishers, New York (U.S.A.), 1945.
17. RUIZ-ORONÓZ, Manuel y otros, Tratado Elemental de Botánica, 7a. Edición, Editorial Porrúa, S. A., México, 1962, pp. 427-488.
18. SMITH, Gilbert M., Cryptogamic Botany, v. I y II, Algae and fungi, 2nd. Edition, McGraw Hill Book Company, Inc., New York (U.S.A.) pp. 121-130.
19. THE ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, INC., Methods of vitamins assay, 2nd. Edition, Interscience Publishers, Inc. New York (U.S.A.), 1971.
20. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, Decimatercera Revisión, Mack Printing Company, Easton, Pensilvania (U.S.A.), 1949. pp. 583, 905 y 906.
21. USP XIX, The United States Pharmacopeia, Mack Printing Company, Easton, Pensilvania (U.S.A.), 1975, 00. 772.

B. PUBLICACIONES PERIODICAS

1. SOCIEDAD DE QUIMICA DEL PERU, v. XL, Boletín No. 1, Lima (Perú), Marzo de 1974, pp. 50
2. SOCIEDAD DE QUIMICA DEL PERU, v. XL, Boletín No. 4, Lima (Perú), Diciembre de 1974, pp. 249.
3. THREALFALL, D. R. y Goodwin, T. W. Nature Intracellular Distribution and Farmation of terpenoid Quinones in Euglena gracilis, v. 103, REVista de Bioquímica Wales (England), 1967, pp. 573-588.

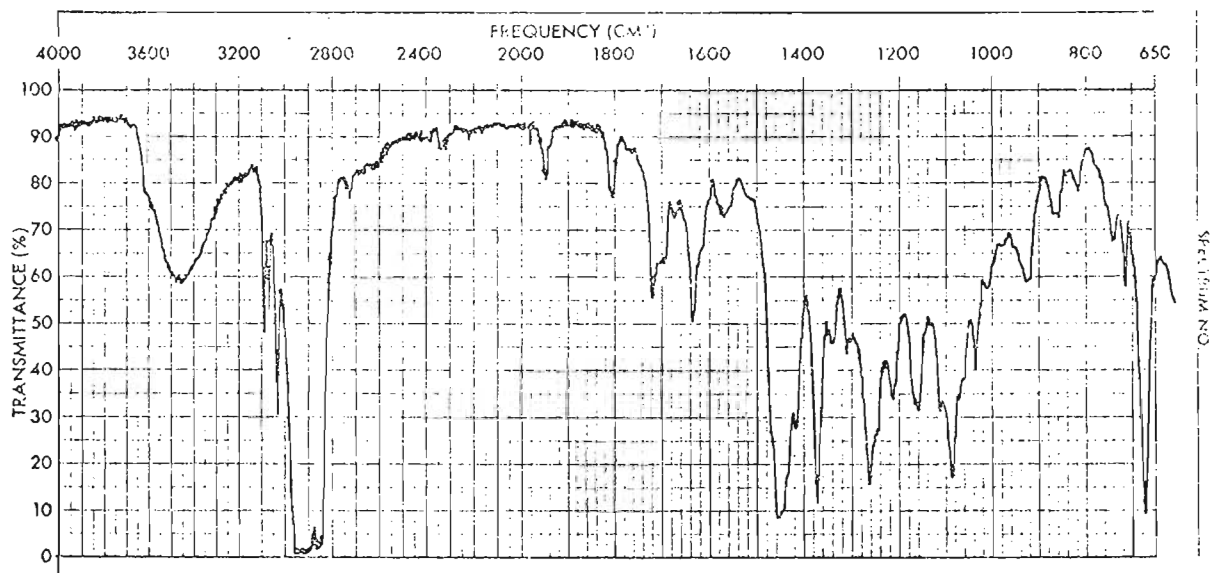
C. F O L L E T O S

1. DOMINGUEZ, Xorge Alejandro, Como preparar y escribir una tesis, Sociedad de Química de México, 1960.
2. E. MERCK, Cromatografía en capa fina, Darmstadt, Alemania

D. ENTREVISTAS Y CONFERENCIAS

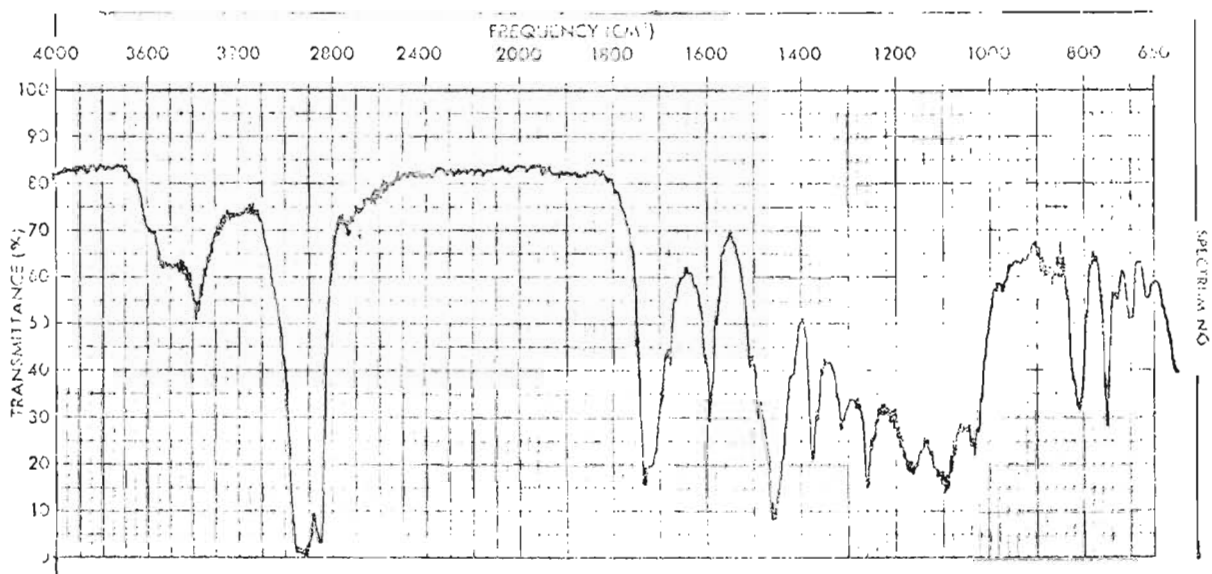
1. ROVELO, Batres, Romeo Amilcar, Sub-Director del Laboratorio de Investigación y Tesis Profesionales, Facultad de Química y Farmacia, Varias conferencias, Ciudad Universitaria, 1975.

ESPECTRO INFRARROJO
DE
ALFA-TOCOFEROL



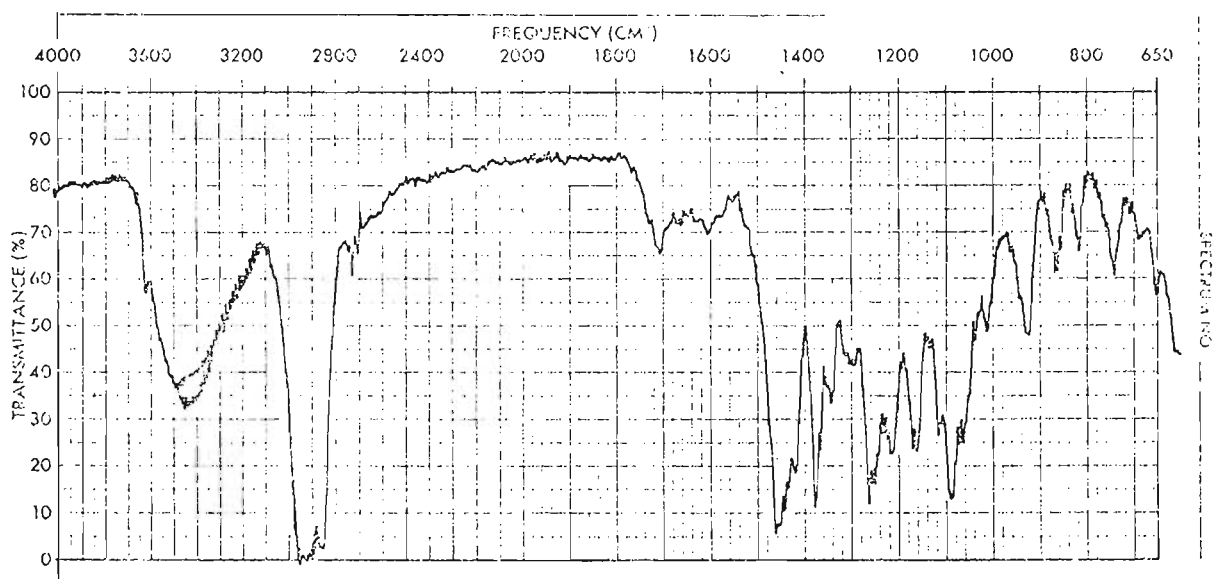
1. Primera Cromatografía (TLC)

ESPECTRO INFRARROJO
DE
ALFA - TOCOFEROL



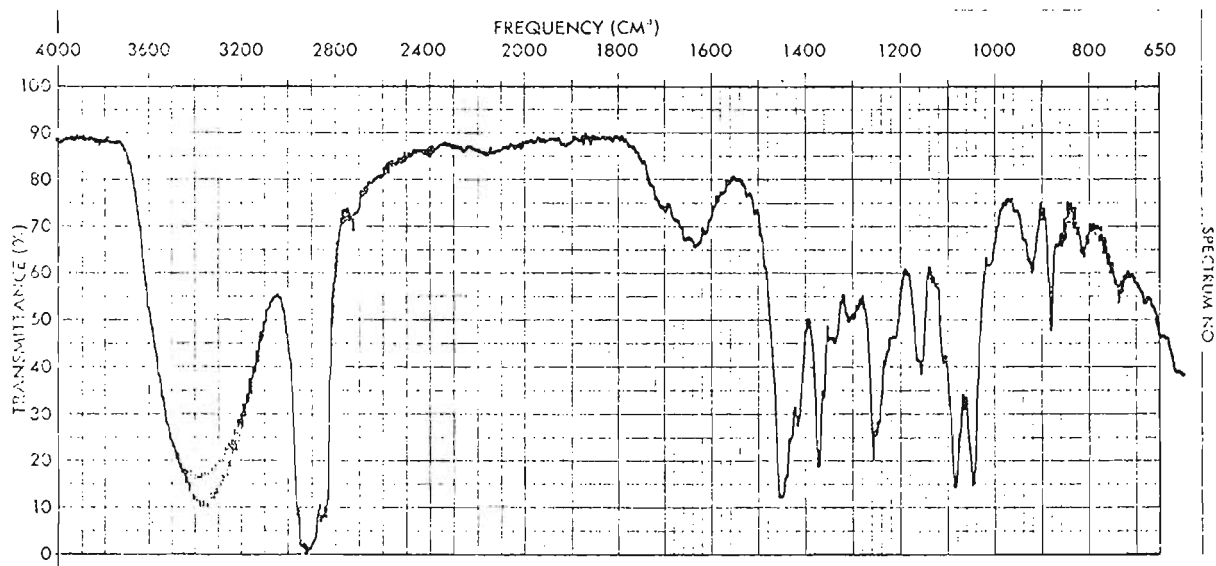
2. Segunda Cromatografía (TLC)

ESPECTRO INFRARROJO
DE
ALFA-TOCOFEROL



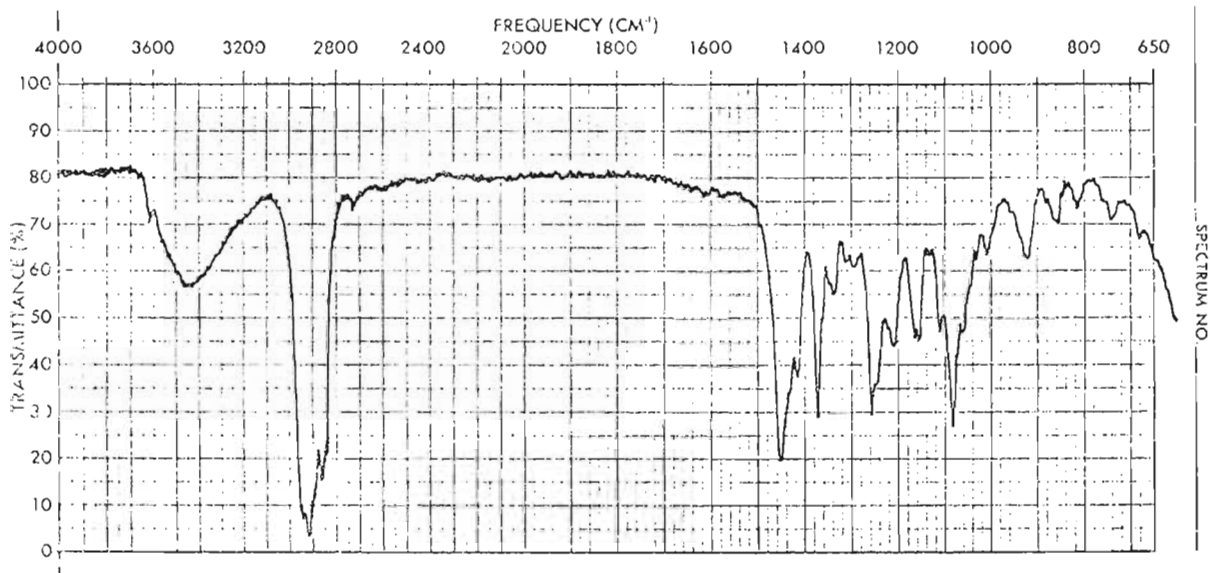
3. Tercera Cromatografía (TLC)

ESPECTRO INFRARROJO
DE
ALFA-TOCOGEROL



4. Cuarta Cromatografía (TLC)

ESPECTRO INFRARROJO
DE
ALFA-TOCOFEROL



5. Quinta Cromatografía (TLC)

