

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

ANALISIS CUALI-CUANTITATIVO DE SAPONINAS EN
Cestrum nocturnum L. (Huele de Noche)

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

CARLOS RODOLFO CHINCHILLA DEL CID

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO

GUATEMALA, MAYO DE 1997

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D10
TC(1430)
1.3

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Decano:	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Secretario:	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Vocal I:	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
Vocal II:	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Vocal III:	Lic. Rodrigo Herrera San José
Vocal IV:	Br. Ana Maria Rodas Cardona
Vocal V:	Br. Hayro Oswaldo García García

REPOSICION DE LA BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DEDICATORIA

- A DIOS:
El amigo que nunca falla
- A MARIA:
Por su silencio
- A MI MADRE:
María Otilia Del Cid Muralles
Por toda su dedicación, esfuerzo y amor
- A MIS HERMANOS:
Luis Alberto y María Antonleta
Por todo su apoyo
- A MI ESPOSA:
Dina Eugenia Jacobo Avila
Con amor
- A MIS TIOS:
Miguel y Antonleta Muralles
- A MIS AMIGOS:
Luis Alberto Monterroso, Giovani Motta, Rafael
Pratdezaba
- A MIS MAESTROS:
Clemencia Gálvez de Avila, Luis Fernando Giron,
Romeo Pérez, Beatriz Medinilla, Jeannette Wyler, María
Eugenia Dominguez

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Departamento de Análisis Aplicado.

Al Departamento de Análisis Inorgánica.

A la Licenciada Beatriz Medinilla, por la generosidad y paciencia que tuvo en la realización de este trabajo.

A Edwin Zuleta

A Olivia Jurado.

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCION.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
4.	JUSTIFICACIONES.....	8
5.	OBJETIVOS.....	9
6.	HIPOTESIS.....	10
7.	MATERIALES Y METODOS.....	11
8.	RESULTADOS.....	17
9.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	20
10.	CONCLUSIONES.....	22
11.	RECOMENDACIONES.....	23
12.	REFERENCIAS.....	24
13.	ANEXOS.....	27

PROFESOR DE LA CATEDRA
1971

1. RESUMEN

Para la caracterización y cuantificación de saponinas esteroidales en las hojas de Cestrum nocturnum L. (huele de noche), se recolectaron muestras de dicha planta, en cantidad suficiente para efectuar cinco procedimientos de análisis.

Por medio del test de espuma y el test de hemólisis, fue posible determinar que las hojas de Cestrum nocturnum L., contienen efectivamente, saponinas esteroidales. Dicho resultado fue confirmado por medio de caracterización con cromatografía en capa fina.

A través de la determinación del índice de espuma y el porcentaje de agliconas presente, fue posible concluir que la cantidad de saponinas presentes en la planta, es abundante, señalando así su potencial utilidad, como materia prima para la obtención de hormonas esteroidales.

2. INTRODUCCION

El deterioro de la situación socioeconómica en Guatemala ha provocado que la salud de la población se vea afectada de una forma muy alarmante, ya que los hospitales nacionales no cuentan con el equipo y material necesarios para proporcionar un servicio adecuado al público.

Por otro lado, la mayoría de los medicamentos disponibles en Guatemala son importados de Norteamérica y Europa, debido a que en muchos casos no se cuenta con la tecnología adecuada para la fabricación de los mismos en Guatemala. Esto, junto a la inestabilidad de la moneda ha hecho que los medicamentos queden fuera del alcance de la mayoría de la población.

En la búsqueda de nuevas alternativas para la obtención de materias primas para la fabricación de medicamentos, las plantas constituyen un recurso ilimitado, el cual no ha sido suficientemente explotado. Guatemala goza de una cantidad inmensa de plantas que, debidamente aprovechadas pueden constituir un valioso recurso para la salud de la población y a la vez contribuir a elevar el nivel socioeconómico de ésta.

Con anterioridad se ha reportado que la planta Cestrum nocturnum L. (huele de noche), presenta en sus hojas saponinas esteroidales (Morton, J. 1981). Este grupo de compuestos representa en la actualidad una fuente importante para la síntesis de hormonas sexuales y cortisona. Con el presente trabajo se evaluó si el contenido de saponinas esteroidales en Cestrum nocturnum L. permite considerar esta planta como una fuente potencial para la obtención de precursores biosintéticos de hormonas sexuales y cortisona a nivel industrial.

3. ANTECEDENTES.

3.1. Generalidades sobre Glicósidos Saponínicos:

Los glicósidos son sustancias no reductoras, que por hidrólisis producida por reactivos o enzimas, dan lugar a uno o más azúcares entre los productos de la reacción. La parte no glucosídica de la molécula se denomina genina o aglicona. La unión entre el azúcar y la aglicona es generalmente un puente de oxígeno entre el grupo reductor del azúcar y un grupo hidroxílico o fenólico (1).

Se da el nombre de saponinas (del latín sapón, jabón) a un grupo de glicósidos solubles en agua, que disminuyen la tensión superficial de esta, dando lugar a la formación de espuma abundante, y relativamente estable, cuando la mezcla se agita (1-3).

Se caracterizan por poseer propiedades hemolíticas y, si se inyectan en el torrente sanguíneo, son muy tóxicas. Por vía oral son prácticamente inactivas (1).

Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades, por ello muchas veces se prefiere hidrolizar el extracto crudo de la planta. Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. Según la estructura de la genina o sapogenina, se conocen dos grupos

de saponinas: saponinas triterpénicas (triterpenoides pentacíclicos) y saponinas esteroidales (generalmente triterpenoides tetracíclicos) (ver anexo 1). Ambos presentan un enlace heterósido en el carbono número 3 y tienen un origen biogenético común, vía ácido mevalónico y unidades isoprenóides (1,3).

Las saponinas triterpénicas se encuentran extensamente distribuidas, y constituyen la mayoría de las que se encuentran en la naturaleza; una gran variedad de ellas difieren unicamente en el número y tipo de unidades de azúcar unidas a las sapogeninas; generalmente pertenecen al grupo de la 3-amirina. Otras pocas son derivadas de la alfa-amirina del lupeol y del grupo de triterpenos tetracíclicos (1,3).

Fuentes ricas de saponinas triterpenoides y sus geninas son el ginseng, la alfalfa, la avena y la soya entre otras (2-4).

Las saponinas esteroidales son materia inicial para la preparación de varios productos muy potentes y ampliamente usados como productos farmacéuticos, entre ellos: cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona, etc. Son fuentes ricas de saponinas esteroidales algunas especies de las familias Dioscoreaceae, Liliaceae, y Scrofularaceae(3,7).

3.2 Descripción botánica:

Cestrum nocturnum L. pertenece a la familia Solanaceae, es un arbusto de 1 a 4 metros de alto, las ramas jóvenes tienen pocos pelos, finos y delicados o son glabras; las hojas son desde aovadas o lanceoladas, hasta elípticos o elípticas-oblongas, la mayoría mide de 8 a 16 cms. de largo y de 2.5 a 6 cms. de ancho, glabras en toda la superficie tanto de arriba como de abajo, el ápice es acuminado, la base es desde redonda hasta aguda o cortamente atenuada; los peciolos miden de 1 a 1.5 cms. de largo, glabros; la inflorescencia es axilar y terminal en racimo y paniculada. Generalmente tiene muchas flores, el ráquis con vellos o algunas veces liso; las brácteas son lineales, caducas, con vellos, algunas veces sin ellos. Las flores son subsésiles y con pedúnculo corto. El cáliz mide de 2 a 3 mm. de largo, es glabro, ligeramente dividido en dos lados. Los lóbulos son triangulares o mucronados, de 0.2 a 0.5 mm. de largo, ciliolados; la corola es verde-amarillo o verde pálido, el tubo es delgado, mide 17 a 20 mm. de largo, en la parte ascendente se va ampliando o ensanchando, los lóbulos de la corola miden de 3 a 3.5 mm. de largo, lanceolado-oblongos, con pelos marginales externos; los filamentos miden de 3 a 3.5 mm. de largo, y poseen apéndices en sus bases,

los apéndices son enteros o ligeramente endidos, a veces divididos hasta su base, glabros o inconspicuamente pilósulos. Las triazas estaminales son glabras o poseen muy pocos pelos. El estilo mide 16.5 a 19.5 mm. de largo. El fruto es blanco, mide de 7 a 9 mm. de largo. Posee cinco semillas de 3.5 a 4 mm. de longitud. Las flores son fragantes en la noche (8-10).

Las hojas de Cestrum nocturnum L. son tóxicas para especies vivas, contienen las saponinas esteroidales trigogenina, smilagenina y yucagenina (6)

4. JUSTIFICACIONES

Cestrum nocturnum L. (huele de noche) Es una planta ampliamente cultivada en Guatemala, utilizandose hasta hoy únicamente como ornamento. Con anterioridad se ha dado a conocer que sus hojas contienen saponinas esteroidales (6).

En la actualidad este grupo de compuestos son empleados como materia prima para obtención de productos farmacéuticos, como la cortisona, anticonseptivos, estrógenos, testosterona y otros. Es por ello de suma importancia establecer si las hojas de Cestrum nocturnum L. pueden significar una fuente potencial para la producción de este tipo de sustancias.

5. OBJETIVOS.

5.1. General:

Contribuir al planteamiento de alternativas para la obtención de materias primas destinadas a la fabricación de sustancias medicamentosas.

5.2. Específicos:

- 5.2.1 Evaluar la utilidad de las hojas de Cestrum nocturnum L. como fuente de saponinas esteroidales.
- 5.2.2. Determinar el contenido de dichas saponinas presentes en la hojas de Cestrum nocturnum L.

6. HIPOTESIS

La cantidad de saponinas presentes en hojas de Cestrum nocturnum L. es igual o mayor al 0.1%.

(saponinas en cantidades de 0.1% o mayores, se consideran suficientes para que la planta presente interés a mayores investigaciones con fines industriales (11)).

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo:

Hojas secas pulverizadas de Cestrum nocturnum L.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos:

Br. Carlos Rodolfo Chinchilla Del Cid, autor del presente trabajo.

Licda. Q.F. Beatriz Medinilla, asesora del presente trabajo.

Lic. Q.B. Federico Nave asesor estadístico del presente trabajo.

7.3 Recursos materiales:

7.3.1 Materiales

-Laboratorios del departamento de Análisis Aplicado, de la Escuela de Química Farmacéutica de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

-Balanza Analítica.

-Rotaevaporador.

-Estufa.

-Horno.

-Aparato de Soxhlet.

-Papel filtro cualitativo.

-Cámara cromatográfica de vidrio.

-Placas cromatográficas de sílica gel.

-Cristalería en general.

7.3.2 Reactivos:

- Acido clorhídrico Merck, grado analítico.
- n-Heptano Merck grado analítico.
- Agar sangre (Ver anexo 2).
- Etanol al 70% Merck, grado analítico.
- Cloroformo Merck, grado analítico.
- Metanol Merck, grado analítico.
- Acido sulfúrico Merck, grado analítico.
- Hidróxido de amonio Merck, grado analítico.
- Vainillina Merck, grado analítico.
- Reactivo de Liebermann-Burchard (ver anexo 3)
- Anisaldehido Merck, grado analítico.
- Acido acético glacial Merck, grado analítico.

7.3.3. Procedimiento:

7.3.3.1 Test de Espuma (11): 100 mg. del material vegetal seco se colocan en un tubo de ensayo. En otro tubo se coloca un control de 1 ml. de una solución preparada con 100 mg. de droga saponínica conocida.

Añadir 10 ml. de agua destilada a cada tubo, taparlos y agitar vigorosamente durante 30 segundos. Permitir que los tubos reposen en posición vertical durante media hora.

Observar si se ha formado espuma en una zona de 3 cm. por encima de la superficie del líquido. Si persiste después de 30 minutos, se presume la presencia de saponinas. Dicho ensayo se realiza en quintuplicado.

7.3.3.2 Determinación del índice de espuma (11): Colocar en un erlenmeyer de 50 ml., 1g de material vegetal pulverizado y hervir con 50 ml. de agua durante treinta minutos. Filtrar, enfriar y diluir a 100 ml., en una serie de tubos de ensayo de 15 cm. de alto y 15 mm. de diámetro. Medir sucesivamente 1,2,3, hasta 10 ml. de la decocción y enrasar el volumen de cada tubo a 10 ml., con agua destilada. Agitar cada tubo verticalmente durante 15 segundos, dejar reposar por 15 minutos y medir luego la altura de la espuma. Si ésta es de 1 cm., en un tubo dado la dilución de la droga en ese tubo es el índice de espuma buscado. Si por ejemplo se trata del quinto tubo que contiene 5 ml. de la decocción al 1%, el índice será igual a 0.05%.

7.3.3.3 Test de Hemólisis (12,13): Colocar en una caja de Petri 25 ml. de agar sangre y esperar a que se solidifique. Con un tubo de ensayo pequeño, remover una copita del agar de tres partes diferentes de la caja y equidistantes una de la otra.

aplicaciones 6). Como fase móvil se utiliza una mezcla de cloroformo-metanol-agua (70-30-4). Se utiliza tres diferentes reveladores. Reactivo de vainillina (ver anexo 4), reactivo de Liebermann-Burchard y reactivo de anisaldehído (ver anexo 5). Luego de asperjar, se calientan las comatoplasas a 100 grados centígrados durante 5 a 10 minutos. Con el reactivo de Liebermann-Burchard se observa bajo luz UV-365 nm (13-15) Dicho ensayo se realiza en triplicado.

7.3.3.5. Cuantificación de las Agliconas contenidas en los Glicósidos Saponínicos: Extraer mediante reflujo 40g de material vegetal pulverizado durante dos horas, hasta desaparición de la espuma con 250 ml de ácido clorhídrico 4M y filtrar. Secar el residuo con el papel, a 50 grados centígrados. Colocar el papel filtro y el contenido seco en un dedal de soxhlet y extraer con n-heptano. Evaporar el n-heptano en un rotaevaporador al vacío. Pesar el residuo de agliconas saponínicas obtenidas.

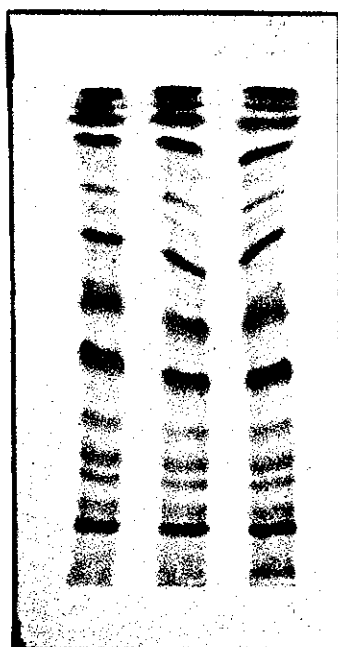
Efectuar los cálculos para establecer el contenido porcentual. Menos de 0.1% se considera insignificante (16). Este ensayo se repite 15 veces, siguiendo el diseño estadístico planteado para la investigación (Nave, F. 1,994).

7.3.4. Diseño de la Investigación:

La evaluación de los resultados se lleva a cabo por medio de estadística descriptiva, la cual incluye las siguientes pruebas: media, desviación estándar y coeficiente de variación. Estas pruebas solo se utilizan para la prueba de cuantificación de agliconas.

8.4. Identificación de Saponinas por cromatografía en capa fina:
Con el reactivo de anisaldehído se pudo observar dos manchas rojo-violeta y una café-rojizo (fotografía 1). Con el reactivo de vainillina se observo dos manchas de color azul intensos y una mancha de color verde (fotografía 2). Con el reactivo de Liebermann-Burchard bajo luz UV (365nm.). Se observó la fluorescencia de tres manchas de color rojo-violeta, dos de estas en una forma intensa, (fotografía 3).

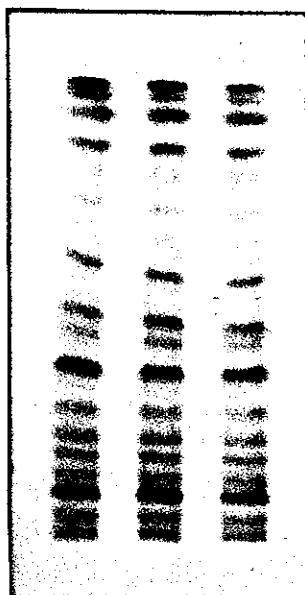
Fotografía 1.



Reveladores:

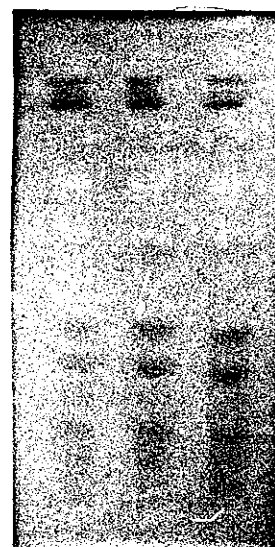
Anisaldehído

Fotografía 2.



Vainillina

Fotografía 3.



Liebermann-
Burchard

Mezcla de solventes: Cloroformo-metanol-agua (70:30:4).

8.5 Cuantificación del contenido de agliconas en los glicósidos saponínicos: Se obtuvieron los siguientes resultados:

PORCENTAJE DEL CONTENIDO DE AGLICONAS DE
GLICOSIDOS SAPONINICOS.

3.26%	3.37%	3.26%
3.34%	3.31%	3.34%
3.36%	3.33%	3.35%
3.23%	3.33%	3.35%
3.26%	3.39%	3.39%

* (esta prueba se llevó a cabo quince veces).

Media (X)= 3.33, desviación estándar (S)= 0.0476, coeficiente de variación (SV)= 1.43%

9. DISCUSION DE RESULTADOS.

9.1 Test de espuma:

La presencia de espuma por mas de 24 horas en el tubo ensayo a una altura aproximada de 12 cm. indica claramente la presencia de saponinas en las hojas de Cestrum nocturnum L., ya que este tipo de compuestos disminuyen la tensión superficial del agua, dando lugar a la formación de espuma abundante y relativamente estable, cuando la mezcla se agita (1-3).

9.2 Test de hemólisis:

La formación de un área de hemólisis de 1.1 cm. alrededor del agujero donde se agregó el extracto vegetal en el agar sangre, confirma la presencia de saponinas en hojas de Cestrum nocturnum L., debido a que éstos componentes se caracterizan por poseer propiedades hemolíticas (2).

9.3 Identificación de saponinas por cromatografía en capa fina:

La coloración de dos manchas rojo-violeta y una café-rojizo utilizando el reactivo de anisaldehído confirma la presencia de saponinas en hojas de Cestrum nocturnum L., debido a que como se mencionó anteriormente, las saponinas reaccionan de esa forma con dicho reactivo (13-15) (Ver fotografía 1).

La coloración de dos manchas azul intensas y una de color verde utilizando el reactivo de vainillina confirma la presencia de saponinas en hojas de Cestrum nocturnum L., debido a como se mencionó anteriormente, las saponinas reaccionan de esa forma con dicho reactivo (13-15) (ver fotografía 2)

Al observar bajo la luz UV-365 nm. la fluorescencia de tres manchas de color rojo-violeta utilizando el reactivo de Liebermann-Burchard confirma la presencia de saponinas en hojas de Cestrum nocturnum L., Debido a que como se mencionó anteriormente, las saponinas reaccionan y se observan de esa forma con dicho reactivo (13-15) (ver fotografía 3).

9.4 Determinación de las agliconas de los glicósidos saponínicos.

El contenido de agliconas de glicósidos saponínicos reportó una media de 3.33%. La prueba se repitió quince veces, siendo los valores muy similares. Se obtuvo una desviación estándar igual a 0.0476, esta nos indica que el rango de variación de cada dato obtenido es bastante pequeño., el coeficiente de variación fue de 1.43%, para un trabajo de tipo gravimétrico se acepta hasta un coeficiente de variación de 4% (Nave F, comunicación personal). Todos éstos datos permiten aceptar la hipótesis planteada, ya que la cantidad de saponinas encontradas en las hojas de Cestrum nocturnum L., fué bastante mayor de 0.1%, lo cual permite afirmar que dicha planta tiene valor potencial como fuente de saponinas esteroidales a escala industrial.

10. CONCLUSIONES.

10.1. Las hojas de Cestrum nocturnum L., contienen saponinas esteroidales, que fueron detectadas a través del test de espuma y de hemólisis, caracterizadas mediante cromatografía en capa fina.

10.2 La cantidad de saponinas esteroidales presentes en ésta planta es abundante, lo cual fué confirmado por el porcentaje de aglicona obtenido (3.33%). Esto permite afirmar que Cestrum nocturnum L. es una planta con potencial utilidad como materia prima para la obtención de hormonas esteroidales.

11. RECOMENDACIONES.

Debido a la elevada cantidad de saponinas cuantificadas en las hojas de Cestrum nocturnum L. Sería muy beneficioso proseguir con investigaciones más profundas sobre la identificación de los tipos de saponinas presentes, así como el contenido cuantitativo de cada una de ellas para que en un futuro las hojas de Cestrum nocturnum L. puedan ser una fuente de importancia industrial en la síntesis de hormonas esteroidales a partir de saponinas.

12. REFERENCIAS.

1. Domínguez XA. Métodos de investigación Fitoquímica. 3ra. Ed. México: Editorial Limusa, 1985. 281p (p149-160)
2. Evans W. Farmacognosia. Cabo J. Trad. México: Continental, 1984. 910p (p519-527)
3. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Perú: Fondo Editorial, 1988. 213p (p62-71)
4. Morrisón RT, Boyd RN. Química Orgánica 2da. Ed. México: Fondo Educativo Interamericano, 1985. 1376p (p848)
5. Roy AR, Chatterjee ML. Pharmacological Observations on Saponins from Cestrum diurnum L. and Cestrum nocturnum L. Chem. Abs. 1968;89:94901.
6. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants Middle América: Bahamas to Yucatán. Springfield, USA: Charles C. Thomas Publisher, 1981. 1420p (p789-90)
7. Oliva AM, Santacruz LH. Recopilación Botánica y Análisis Químico Cualitativo de Algunas Especies de Plantas Medicinales en Guatemala. USAC. (tesis de graduación, Facultad de CCQQ y Farmacia 1979). 63p (p45)

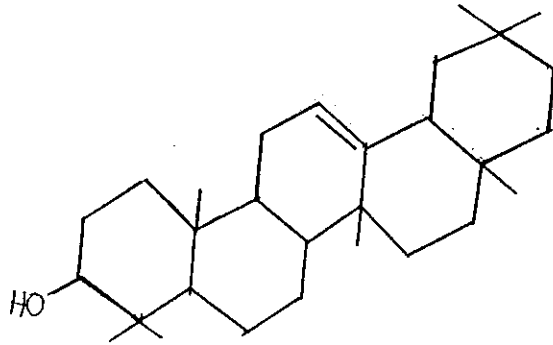
8. Gentry JL, Standley PC. Flora of Guatemala. New York: Field Museum of Natural History, 1974. vol X 151p (p31-32)
9. Cronquist A. Introducción a la Botánica. Ambrioso AM. Trad México: CECSA 1986.848p (p667-697)
10. Morton JF. Major Medicinal Plants; Botany, Cculture and Uses. Springfield, USA: Charles C. Thomas Publisher, 1977. 431p (p281-310).
11. Albornoz A. Productos Naturales; Estudio de las sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas. Caracas: Universidad de Venezuela 1980. 1296p (p238-39,454,55)
12. Coneman EW, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2da. ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1987. 690p (p260-272).
13. Medinilla BE. Manual de Prácticas de Laboratorio de Fitoquímica. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1993. 50p (p23-28)
14. Wagner H, Blatt S. Plant Drug Analysis; A Thin Layer Cromatography Atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 320p (p225-228).
15. Lederer E, Lederer M. Cromatografía; Revisión de sus Principios y aplicaciones. 2da. Ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo, 1960. 752p (p292-312)

16. Durand E, Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia. Ciudad de la Habana: Facultad de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, 1986. 103p (p59)
17. Daniel W. Estadística 2da. Ed. México: McGraw-Hill, 1987. 504p.
18. Porter CL. Taxonomy of Flowering Plants. San Francisco: WH. Freeman and company, 1967. 471p. (p402-03).

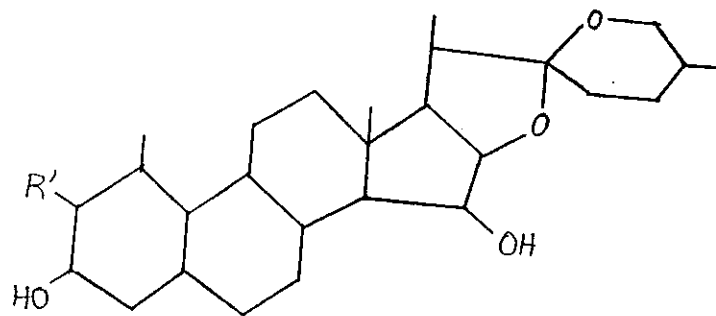
13. ANEXOS.

Anexo 1:

Estructura general de la saponinas triterpénicas. (3).



Estructura general de las saponinas esteroidales (3).



Anexo 2.

Agar Sangre se utiliza una base de agar tripticasa-soya o agar nutritivo, se esteriliza a 121 grados centígrados durante quince minutos, en caliente se le agrega sangre de carnero liofilizada para una concentración entre el 5 y el 10% y se espera que se solidifique.

Anexo 3.

Reactivo de Liebermann-Burchard: Se prepara una mezcla de anhídrido acético sulfúrico en proporción 1:1, y se diluye en etanol absoluto en proporción 1:5 (13-14).

Anexo 4.

Reactivo de vainillina: Se disuelve 1 gramo de vainillina en 100 ml. de etanol absoluto. Las coloraciones observadas en visible varían entre azul intenso, verde, rojo y café (13-14).

Anexo 5.

Reactivo de anisaldehído: Mezclar 0.5 ml. de anisaldehído con 10 ml., de ácido acético glacial, seguido por 85 ml., de etanol y 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado, en este orden. El reactivo tiene limitada estabilidad, y no debe usarse cuando el color se torna rojo-violáceo. Se observan las siguientes coloraciones: Rojo-violeta, Café-rojizo, Azul-verdoso y azul. (13-14).

Carlos Rodolfo Chinchilla
Carlos Rodolfo Chinchilla Del Cid
AUTOR

Medinilla
Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana
ASESORA

Batres
Licda. Beatriz Batres de Jiménez
DIRECTORA

Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE GUATEMALA
Biblioteca Central