

35
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO QUIMICO DE EQUISETUM MYRIOCHAETUM
SCHLECHT. & CHAM.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
DANIEL CHAVEZ VELASCO

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

LISTA DE CUADROS.	I
LISTA DE FIGURAS.	II
LISTA DE ESQUEMAS.	III
LISTA DE ESPECTROS.	IV
I INTRODUCCION	
1.1 Generalidades acerca del género <u>Equisetum</u>	1
1.2 Generalidades de <u>Equisetum myriochaetum</u> . ..	15
II JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.	19
III EXPERIMENTAL	
3.1 Material vegetal.	21
3.2 Método de extracción y fraccionamiento. ...	21
3.3 Análisis cromatográficos.	23
3.4 Aislamiento y purificación de algunos constituyentes de <u>Equisetum myriochaetum</u>	
3.4.1 Aislamiento del β -sitosterol, <u>13</u>	23
3.4.2 Aislamiento del β -D-glucositolsterol, <u>14</u>	23
3.4.3 Aislamiento de la pínocembrina, <u>15</u>	27
3.4.4 Aislamiento de la crisina, <u>16</u>	27
3.4.5 Aislamiento de la β -D-Glucosa, <u>17</u>	27
3.4.6 Aislamiento de la mezcla de ácidos grasos, <u>I</u>	27

3.5. Caracterización de los compuestos aislados	
3.5.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas	29
3.5.2 Obtención del derivado acetilado de la Pinocembrina.	29
3.5.3 Obtención de los derivados metilados. ...	30
3.5.4 Caracterización de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la mezcla metilada.	31
3.5.5 Prueba de Molish.	31
3.6. Determinación de la toxicidad <u>in vitro</u> para <u>Artemia salina</u> Leach del extracto, fracciones y compuestos.	32
3.6.1 Incubación de los huevos de <u>Artemia salina</u>	32
3.6.2 Preparación de las muestras.	32
3.6.3 Bioensayo.	33
IV RESULTADOS.	34
V DISCUSION DE LOS RESULTADOS.	62
VI RESUMEN Y CONCLUSIONES.	78
VII BIBLIOGRAFIA.	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Flavonoides descritos en el género <u>Equisetum</u> .	5
Cuadro 2.	Alcaloides descritos en el género <u>Equisetum</u> .	10
Cuadro 3.	Especies del género <u>Equisetum</u> utilizadas en la medicina tradicional.	16
Cuadro 4.	Resumen del fraccionamiento preliminar via cromatografía en columna del extracto de <u>E. myriochaetum</u> .	24
Cuadro 5.	Sistemas de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para el análisis cromatográfico en capa delgada.	25
Cuadro 6.	Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 210-224 de la columna original, (Cuadro 4).	26
Cuadro 7.	Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 225-257 de la columna original, (Cuadro 4).	28
Cuadro 8.	Rendimiento de los derivados metilados.	30
Cuadro 9.	Rendimiento de los compuestos aislados de <u>Equisetum myriochaetum</u> .	35
Cuadro 10.	Toxicidad expresada en % de mortalidad y su correspondiente LC_{50} del extracto, la fracción 225-257 y compuestos bioactivos de <u>Equisetum myriochaetum</u> para <u>Artemia salina</u> .	37

Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas de la pinocembrina (<u>15</u>).	38
Cuadro 12. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7-diacetilpinocembrina (<u>15A</u>).	45
Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la crisina (<u>16</u>).	50
Cuadro 14. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7-metoxicrisina (<u>16A</u>).	58
Cuadro 15. Acidos grasos de <u>Equisetum myriochetum</u>	60

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Distribución mundial del género <u>Equisetum</u>	3
Figura 2.	Estructuras básicas de flavonoides descritos en el género <u>Equisetum</u>	11
Figura 3.	Estructuras de alcaloides descritos en el género <u>Equisetum</u>	13
Figura 4.	<u>Equisetum myriochaetum</u>	17
Figura 5.	Distribución de <u>Equisetum myriochaetum</u>	18
Figura 6.	Estructura de los ácidos grasos de <u>Equisetum myriochaetum</u>	61
Figura 7.	Patrón de fragmentación de la pinocembrina en espectrometría de masas.	64
Figura 8.	Espectro de RMN ¹ H bidimensional 2D-COSY de la pinocembrina.	66
Figura 9.	Patrón de fragmentación de la crisina en espectrometría de masas.	68
Figura 10.	Espectro de RMN ¹ H bidimensional 2D-COSY de la crisina.	70
Figura 11.	Formación de los iones M-31, 59, 74 y 87 de los ésteres metílicos de ácidos grasos.	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Método de extracción de <u>Equisetum</u> <u>myriochaetum</u>	22
--	----

LISTA DE ESPECTROS.

Espectro 1.	Espectro U V de la pinocembrina, (15).	39
Espectro 2.	Espectro I R de la pinocembrina, (15).	40
Espectro 3.	Espectro de masas de la pinocembrina, (15).	41
Espectro 4.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) de la pinocembrina, (15).	42
Espectro 5.	Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3) de la pinocembrina, (15).	43
Espectro 6.	Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3) de la pinocembrina, (15).	44
Espectro 7.	Espectro I R la 5,7-diacetil-pinocembrina, (15A).	46
Espectro 8.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) de la 5,7-diacetilpinocembrina, (15A).	47
Espectro 9.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de la 5,7-diacetilpinocembrina, (15A).	48
Espectro 10.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de la 5,7-diacetilpinocembrina, (15A).	49

Espectro 11. Espectro U V de la crisina, (<u>16</u>).	51
Espectro 12. Espectro I R de la crisina, (<u>16</u>).	52
Espectro 13. Espectro de masas de la crisina, (<u>16</u>).	53
Espectro 14. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) de la crisina, (<u>16</u>).	54
Espectro 15. Espectro de RMN ^1H (D_2O) de la crisina, (<u>16</u>).	55
Espectro 16. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) de la crisina, (<u>16</u>).	56
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO- d_6) de la crisina, (<u>16</u>).	57
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) de la 7-metoxicrisina, (<u>16A</u>).	59
Espectro 19. Espectro de masas del ester metilico del ácido láurico.	73
Espectro 20. Espectro de masas del ester metilico del ácido mirístico.	73
Espectro 21. Espectro de masas del ester metilico del ácido pentadecanoico.	74

Espectro 22. Espectro de masas del ester metílico del ácido palmítico.	74
Espectro 23. Espectro de masas del ester metílico del ácido margárico.	75
Espectro 24. Espectro de masas del ester metílico de ácido esteárico.	75
Espectro 25. Espectro de masas del ester metílico del ácido behénico.	76
Espectro 26. Espectro de masas del ester metílico del ácido lignocérico.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	centímetros	AcOEt	acetato de etilo
g	gramos	CDCl ₃	cloroformo deuterado
kg	kilogramos	CHCl ₃	cloroformo
m	metros	D ₂ O	Agua deuterada
mg	miligramos	DMSO-d ₆	dimetil sulfóxido deuterado
mm	milímetros	Hex	Hexano
ml	mililitros	MeOH	metanol
min	minutos		
nm	nanómetros		
p f	punto de fusión		
p m	peso molecular	ap	alta pureza
t r	tiempo de retención	d	doblete
μl	microlitros	dd	doblete de dobletes
		Hz	hertz
°C	grados centígrados	J	constante de acoplamiento
IR	infrarojo		
LC ₅₀	concentración letal 50	MHz	megahertz
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear protónica	m	multiplete
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de ¹³ C	ppm	partes por millón
		s	singulete
UV	ultravioleta	sa	singulete amplio

I INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO EQUISETUM.

El género Equisetum pertenece a la familia Equisetaceae (Orden Equisetales y clase Articulatae) y comprende cerca de 32 especies. Considerando las diferencias que existen en la estructura de los estomas de las especies, el género se ha dividido en dos subgéneros: Equisetum e Hippochaete, (Hauke, 1963).

En el subgénero Equisetum los estomas se encuentran al mismo nivel que la epidermis y esparcidos o agrupados en bandas gruesas, el grosor de la nervadura no está articulada cerca del punto de origen, este subgénero incluye las especies E. fluviatile, E. palustre, E. silvaticum, E. pratense, E. telmateia y E. arvense, entre otras.

En el subgénero Hippochaete los estomas están hundidos por debajo de la superficie de la epidermis y se acomodan en bandas angostas. El grosor de la nervadura está articulada cerca del punto de origen; como ejemplo de algunas especies pertenecientes a este subgénero se encuentran E. giganteum, E. myriochaetum, E. leavigatum, E. hyemale, E. variegatum, E. scrippoides, y E. ramosissimum.

Este género, como se muestra en la Figura 1, se encuentra ampliamente distribuido en casi todo el mundo excepto en Australia y Nueva Zelanda. En general sus especies crecen bien en suelos ácidos y son con frecuencia prolíficos a lo largo de los caminos, en terraplenes de vías de ferrocarril, depósitos de grava y dunas arenosas; otros hábitats adecuados son los pantanos alrededor de los lagos y bosques húmedos. Generalmente el crecimiento de las especies esta favorecido en climas y suelos húmedos.

Desde el punto de vista fitoquímico, varias especies del género han sido investigadas, la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha describen el aislamiento y caracterización de flavonoides y alcaloides como los principales metabolitos secundarios presentes en las especies objeto de estudio. También se han descrito la presencia de varios esteroides (Ludwiczak y Stachowiack, 1963; Chiu, et al., 1988; D'Agostino, et al., 1984), ácidos orgánicos (Damirov, et al., 1960; Adams y Bonnet, 1969; Adams y Bonnet, 1971; Minimikawa y Yoshida, 1972; Ruellkoette, et al., 1975; Syrchina, et al., 1975; Bakke, et al., 1978; Syrchina et al., 1978; Syrchina, et al., 1982; Viden, 1989), carbohidratos (Damirov, et al., 1960; Kientzel y Bettinger, 1962; Potapou, 1964; Lukasiak, 1972; Baytopiturhan, et al., 1972; Piekos y Daslawska, 1975; Bakke, et al., 1978), aminoácidos (Kientzler y Bettinger, 1962) vitaminas (Damirov, et al., 1960), taninos

Figura 1. Distribucion mundial del género Equisetum.



(Damirov, et al., 1960; Musaelyan, et al., 1983), derivados de la indanona (Syrchina, et al., 1978; Semensu, et al., 1978; Syrchina, et al., 1980), resinas (Damirov, et al., 1960), ácidos inorgánicos (Damirov, et al., 1960) y la obtención de varios aceites esenciales (Damirov, et al., 1960; Sommer, 1961; Sommer, et al., 1962).

Los flavonoides descritos en el género incluyen flavonoles, flavonas y flavanonas, como se resume en el Cuadro 1. Con relación a los alcaloides se han obtenido varios derivados piridínicos como la nicotina 8 y piperidínicos del tipo de la palustrina 9 (ver Cuadro 2). Cabe hacer notar, por una parte, que la especie que mas atención ha recibido desde el punto de vista fitoquímico ha sido el E. arvense (Sommer, et al., 1962; Ludwiczak, et al., 1963; Adams y Bonnett, 1971; Syrchina, et al., 1975; Semenov, et al., 1978; Veda, et al., 1982; D'Agostino, et al., 1984; inter alia.) y, por la otra que no se han realizado estudios fitoquímicos sobre especies mexicanas de este género.

Varias especies del género Equisetum, particularmente el E. arvense (cola de caballo), son de gran importancia económica ya que son utilizadas como ingredientes de una gran variedad de preparados farmacéuticos y cosméticos (Damirov, et al., 1960; Sommer, et al., 1962; Szabason, 1963; Kabanova, et al., 1968; Doerfel, et al., 1969; Baytopiturhan, et

Cuadro 1. Flavonoides descritos en el género Equisetum.Derivados del campferol 1

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
campferol.	Beckmann y Geiger, 1963; Saleh, <u>et al.</u> , 1972; Beshia, <u>et al.</u> , 1982; Strzelecka, <u>et al.</u> , 1982.
dihidrocampferol.	Syrchina, <u>et al.</u> , 1975. Syrchina, <u>et al.</u> , 1978.
3-ramnopiranosil-	Beckmann y Geiger, 1963; Strzelecka, <u>et al.</u> , 1982.
3-soforosil-	Syrchina, <u>et al.</u> , 1974; Saleh, 1975; Saleh y Abdalla, 1980.
3- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972; Saleh, 1975; Geiger y Lang, 1978.
3-rutinosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972; Aly y Geiger, 1975; Saleh, 1975.
3-rutinosilglucosil-	Beckmann y Geiger, 1963.
3- β -diglucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
3,7- β -diglucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972 Saleh, 1975.
3- β -soforil-7- β -glucopiranosil-	Saleh, 1975.
3-rutinosil-7-ramnosil-	Geiger y Lang, 1978.
3-glucosil-7-ramnosil-	Geiger y Lang, 1978.
3-ramnosil-7-glucosil-	Beckmann y Geiger, 1963.

Cuadro 1. Flavonoides descritos en el género Equisetum.
(continuación)

Derivados del campferol 1.

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
3-rutinosil-7-glucosil-	Saleh, 1975;
3-diglucosil-7-glucosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
3-glucosil-7-diglucosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
3- β -D-6-O-acetilglucosil- 7- α -L-ramnosil-	Geiger, <u>et al.</u> , 1978.
3- β -D-6-O-acetilglucosil- 7- β -D-glucosil-	Geiger, <u>et al.</u> , 1978.
7-glucosil-	Beckmann y Geiger, 1963; Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
7-ramnopiranosil-	Geiger y Lang, 1975.
7- β -D-diglucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972

Cuadro 1. Flavonoides descritos en el género Equisetum.
(continuación)

Derivados de la quercetina. 2

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
quercetina.	Beckmann y Geiger, 1963; Beshia, <u>et al.</u> , 1982.
dihidroquercetina.	Syrchina, <u>et al.</u> , 1975; Syrchina, <u>et al.</u> , 1978.
3-rutinosil-	Beckmann, y Geiger, 1963; Hassan, <u>et al.</u> , 1975; Beshia, <u>et al.</u> , 1982.
3- β -D-glucopiranosil-	Beckmann y Geiger, 1963; Syrchina, <u>et al.</u> , 1974; Tarle, <u>et al.</u> , 1980;
3- β -safiril-	Saleh, 1975.
3-diglucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
3-rutinosil-7-ramnopiranosil-	Beckmann y Geiger. 1963.
3,7-diglucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
3-diglucopiranosil-7- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.
7-ramnopiranosil-	Beckmann y Geiger, 1963; Hassan. <u>et al.</u> , 1975.
7- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972.

Cuadro 1. Flavonoides descritos en el género Equisetum.
(continuación)

Derivados de la herbacitrina. 3

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
herbacitrina	Salen, <u>et al.</u> , 1972; Nakasawa y Hanaya, 1984.
3- β -D-(2-O- β -glucopiranosido glucopiranosido)- 8- β -D-glucopiranosil-	Geiger, <u>et al.</u> , 1982.
7- β -D-glucopiranosil-	Veda, <u>et al.</u> , 1982

Derivados de la gossipitrina. 4

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
gossipitrina	Salen, <u>et al.</u> , 1972; Nakasawa y Hanaya, 1984.
3- β -D-(2-O- β -glucopiranosido glucopiranosido)- 8- β -D-glucopiranosil-	Geiger, <u>et al.</u> , 1982.
7- β -D-glucopiranosil-	Veda, <u>et al.</u> , 1982

Cuadro 1. Flavonoides descritos en el género Equisetum (continuación).

Derivados de la luteolina. 5

COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
luteolina.	Syrchina, <u>et al.</u> , 1978;
5- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972; Saleh, <u>et al.</u> , 1980; Syrchina, <u>et al.</u> , 1980.

Derivados de la apigenina. 6

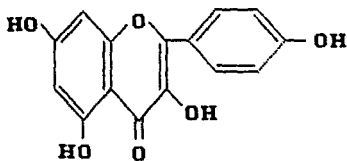
COMPUESTO O SUSTITUYENTE	REFERENCIA
apigenina.	Syrchina, <u>et al.</u> , 1978; Syrchina, <u>et al.</u> , 1978; Strtzeleca, <u>et al.</u> , 1982; Zhou y Yu, 1983.
4'- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1972; Saleh, 1975.
5- β -D-glucopiranosil-	Saleh, <u>et al.</u> , 1980.
5- β -D-glucopiranosil-6- C-D-glucopiranosil-	Syrchina, <u>et al.</u> , 1978 Syrchina, <u>et al.</u> , 1980.
7-metoxi-	Syrchina, <u>et al.</u> , 1978; Zhou y Yu, 1983.

Naringenina. 7

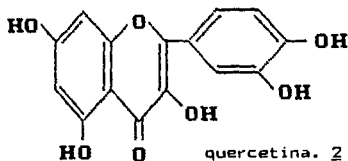
COMPUESTO	REFERENCIA
naringenina.	Syrchina, <u>et al.</u> , 1975; Syrchina, <u>et al.</u> , 1978.

Cuadro 2. Alcaloides descritos en el género Equisetum.

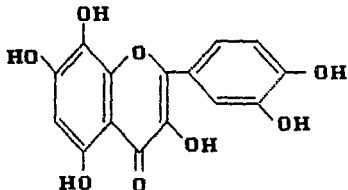
COMPUESTO	REFERENCIA
nicotina. <u>8</u>	Phillipson y Melville, 1960; Baytopiturhan, <u>et al.</u> , 1972.
palustrina. <u>9</u>	Dietsche y Eugster, 1960; Baytopiturhan, <u>et al.</u> , 1972; Waelchli, <u>et al.</u> , 1978.
dihidropalustrina. <u>10</u>	Dietsche y Eugster, 1960; Mayer, <u>et al.</u> , 1986.
palustridina. <u>11</u>	Green, <u>et al.</u> , 1969; Waelchi, <u>et al.</u> , 1978.
indol 3-carboxialdehido <u>12</u>	Bourdeaux, <u>et al.</u> , 1971.



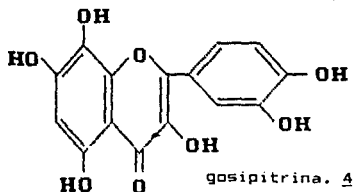
campferol. 1



quercetina. 2

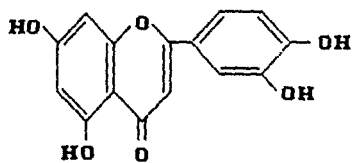


herbacitrina. 3

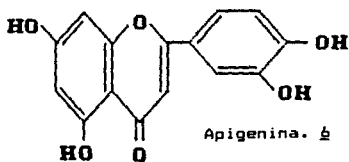


gossipitrina. 4

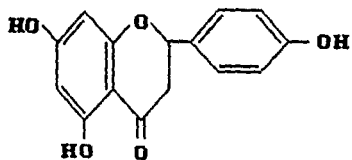
Figura 2. Estructuras básicas de flavonoides descritos en el género Equisetum.



lutealina. 5



Apigenina. 6



naringenina. 7

Figura 2. Estructuras básicas de flavonoides
descritas en el género Equisetum.
(continuación)

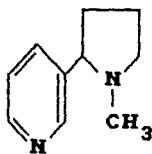
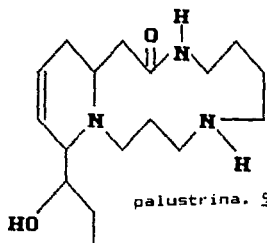
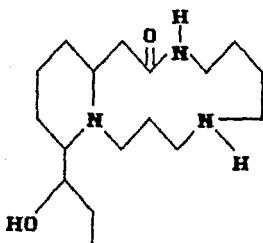
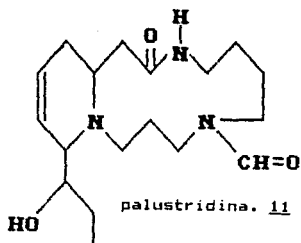
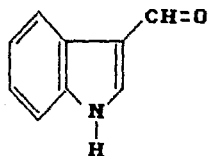
nicotina. 9palustrina. 9dihidropalustrina. 10palustridina. 11Indol 3-carboxialdehído. 12

Figura 3. Estructuras de alcaloides descritos en el género Equisetum.

al., 1972; Tarle, et al., 1980; Oreal, S. A., 1981; Gill, et al., 1982; Beshia, et al., 1982; Lapinet, 1986; Villano, 1986; Nekrasova, et al., 1985; Orkiszewska, et al., 1985; Balogh y Gyula, 1985; Husson, et al., 1986; Iyubartseum, et al., 1987; Hodisan y Mester, 1988; Lyubartseva et al., 1988; Tivasyan, et al., 1987; Mompon, 1988; Hodisan, et al., 1988). En el caso de los preparados farmacéuticos el extracto total de E. arvense y de otras especies relacionadas se incorporan en formulaciones con diferentes aplicaciones terapéuticas (diuréticos, antimicrobianos, hipotensivos, hemostáticos, hemolíticos, antifúngicos, antialérgicos, antivirales, urolíticos, calcificantes y para el tratamiento de la obesidad). Cabe mencionar que la actividad antimicrobiana es atribuida a la presencia de flavonoides derivados de la quercetina y campferol (Beshia, et al., 1982). También en el caso particular de E. arvense se ha demostrado que el aceite esencial posee propiedades antimicrobianas (Sommer, et al., 1962). En relación a los preparados cosméticos los extractos de E. arvense y otras especies se incluyen también en una gran variedad de cremas (humectantes, desinfectantes, anticelulíticas, etc.) y shampoos.

De manera adicional el E. arvense es utilizado para determinar el grado de contaminación ambiental ya que posee la particularidad de absorber metales pesados suspendidos en el aire. (Sankar y Wosley, 1979). Finalmente cabe destacar que

varias especies de este género se utilizan en la medicina tradicional de diversas regiones del mundo para el tratamiento de varias enfermedades (ver Cuadro 3).

1.2 GENERALIDADES DE *EQUISETUM MYRIOCHAETUM* SCHLECHT ET CHAM.

El *Equisetum myriochaetum* (Figura 4) se encuentra ampliamente distribuido en México, países Centroamericanos, Colombia, Ecuador y Perú (Figura 5). En la República Mexicana se conoce popularmente con el nombre de cola de caballo y se utiliza medicinalmente como diurético y antiséptico urinario (Palacios-Rios, 1990). Hauke en su monografía acerca del género *Equisetum* hace una descripción detallada de la planta (Hauke, 1963).

Es de hacer notar que esta especie es frecuentemente mal identificada como *Equisetum giganteum* porque ambas tienen una distribución geográfica muy similar. Sin embargo, el examen detallado de los patrones endodérmicos permite la correcta identificación de ambas especies.

Cuadro 3. Especies del género Equisetum utilizadas en la medicina tradicional.

USO	ESPECIE	VIA DE ADMON.	REFERENCIA
Diurético	<u>E. arvense</u> <u>E. fluviatilis</u> <u>E. hyemale</u> <u>E. robustum</u>	Oral	Duke, 1929 Martinez, 1989
Tratamiento de varios tipos de cancer	<u>E. arvense</u> <u>E. hyemale</u>	Oral	Duke, 1929
Astringente	<u>E. arvense</u> <u>E. hyemale</u>	Tópico	Duke, 1929 Martinez, 1989
Hidropesía	<u>E. arvense</u>	Oral	Duke, 1929
Gota	<u>E. arvense</u>	Oral	Duke, 1929
Reumatismo	<u>E. arvense</u>	Oral	Duke, 1929
Tuberculosis	<u>E. arvense</u>	Oral	Duke, 1929
Cálculos vesiculares y renales	<u>E. hyemale</u> <u>E. fluviatilis</u>	Oral	Duke, 1929 Martinez, 1989
Gonorrea	<u>E. arvense</u> <u>E. fluviatilis</u>	Oral	Duke, 1929 Martinez, 1989
Hemostático	<u>E. arvense</u> <u>E. hyemale</u>	Tópico	Duke, 1929
Cicatrizante	<u>E. arvense</u> <u>E. hyemale</u>	Tópico	Duke, 1929
Calcificante	<u>E. arvense</u>	Oral	Duke, 1929
Tratamiento de úlceras	<u>E. arvense</u> <u>E. fluviatilis</u>	Oral	Duke, 1929
Disentería	<u>E. hyemale</u> <u>E. fluviatilis</u>	Oral	Duke, 1929 Martinez, 1989

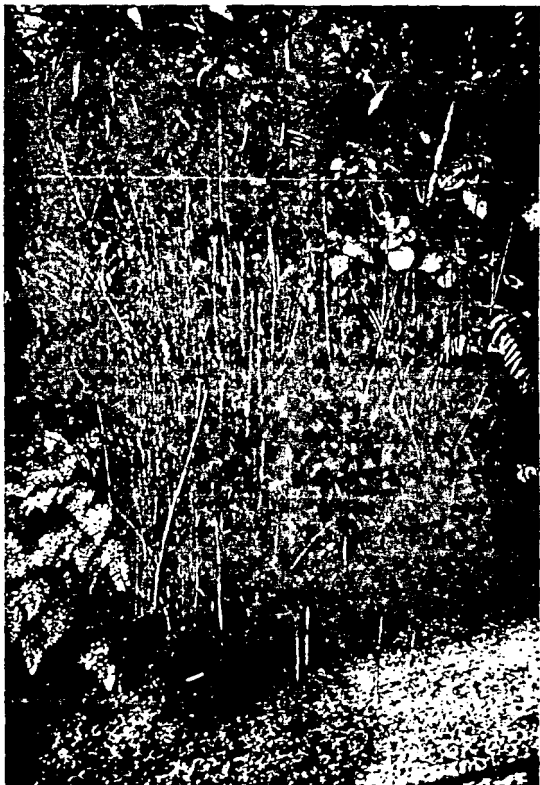


Figura 4. Equisetum myriochaetum.



Figura 5. Distribución de *Equisetum myriochaetum*.

II JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

2.1 JUSTIFICACION Y OBJETIVOS GENERALES.

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional (Garcia, 1987; Camacho, 1990; Rodriguez, 1990; Rojas 1990., inter alia) que tiene por objetivo general aislar compuestos bioactivos de la flora medicinal mexicana y contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la misma, el propósito de este trabajo es el de realizar una investigación fitoquímica preliminar del Equisetum myriochaetum Shlech et cham. (Equisetaceae) procedente del estado de Veracruz, donde es utilizado en la medicina popular como diurético y antiséptico urinario. Las consideraciones sobre la cual se sustenta este estudio sistemático se ha explicado detalladamente en varias oportunidades (Castañeda, 1988; Calzada, 1989; Lopez, 1989; Cruz y Mendoza, 1991; inter alia). Sin embargo de manera breve se podría mencionar:

- 1) Que las plantas utilizadas en la medicina folclórica representan fuentes de gran valor para la búsqueda de principios activos nuevos, o conocidos.
- 2) Que la validación y por lo tanto la posible implementación oficial de la medicina tradicional requiere de un estudio

sistemático multidisciplinario que incluye la investigación de aspectos biológicos y químicos de las plantas utilizadas por los usuarios de este tipo de medicina.

- 3) Que en México no se han realizado estudios químicos ni biológicos sobre plantas del género Equisetum.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para el cumplimiento de los objetivos generales se consideraron pertinentes los siguientes objetivos particulares.

- a) Establecer mediante ensayos fitoquímicos preliminares el método mas adecuado para efectuar la extracción del material vegetal.
- b) Preparar el extracto total de acuerdo con los resultados obtenidos en el punto anterior.
- c) Fraccionar el extracto vegetal mediante los métodos fitoquímicos adecuados.
- d) Separar y purificar los constituyentes de las fracciones obtenidas en el proceso de fraccionamiento.
- e) Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
- f) Correlacionar en lo posible los resultados químicos obtenidos con la actividad biológica que se le atribuye a la planta.

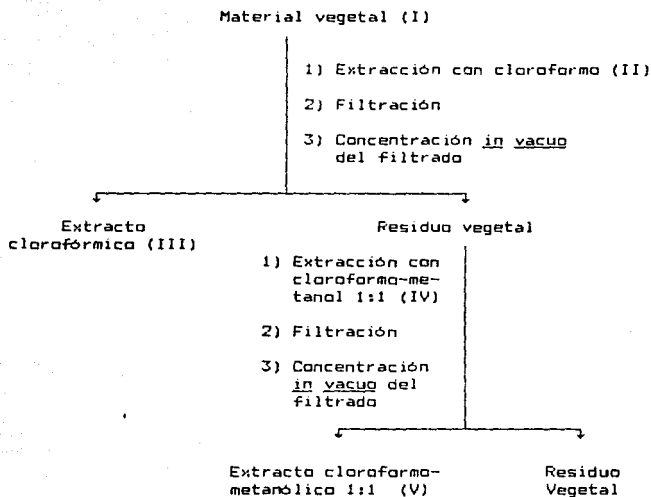
III EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL.

La planta fue recolectada en la barranca adelante de Tuzamapan, carretera Tuzamapan-Jalcomulco, Municipio Tuzamapan Veracruz en enero de 1990 Y fué identificada por la Bióloga Mónica Palacios-Rios. Una muestra de referencia se depositó en el herbario del Instituto de Ecología A. C. XALAPA, UNAM. (Voucher: Palacios- Rios y Garcia Franco No. 3247). Las partes aereas de E. murvyochaetum se dejaron secar a temperatura ambiente y se cortaron en trozos pequeños.

3.2 METODO DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO.

El material vegetal desecado y reducido a trozos pequeños se extrajo primero con cloroformo y luego con una mezcla de cloroformo-metanol en proporción 1:1, siguiendo el procedimiento señalado en el Esquema 1. Se reunieron los extractos cloroformico y cloroformo-metanólico al comprobarse por medio de cromatografía en capa fina que no existían diferencias notables entre ambos extractos. El extracto reunido (39.7 g) se fracciona via cromatografía preparativa en columna abierta, utilizando como adsorbente gel de silice (1.1 Kg de silica gel 60, granulos de 0.2-0.5 mm malla 35-70 ASTM MERCK). El proceso de elución se efectuó con hexano,



- I) Cantidad total del material vegetal 1.1 Kg.
- II) Extracción vía maceración (dos veces por periodos de dos días cada uno).
- III) Cantidad total del extracto cloroformico 17.3 g.
- IV) Extracción vía maceración (dos veces por periodos de dos días cada uno).
- V) Cantidad total del extracto cloroformo-metanólico 22.4g.

Cantidad total de los extractos III y V reunidos 39.7 g

Esquema 1. Proceso de extracción de la planta Equisetum myriochaetum.

hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y acetona en diferentes proporciones. En el Cuadro 4 se resumen los sistemas de elución empleados, el número de fracciones obtenidas en cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

3.3 ANALISIS CROMATOGRAFICOS.

Los análisis cromatográficos en cada fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (silica 60 GF ²⁵⁴ MERCK). Varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromógenos (Ver Cuadro 5).

3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ALGUNOS CONSTITUYENTES DE *EDUISETUM MYRIOCHAETUM*.

3.4.1 Aislamiento del β - sitosterol, 13.

De las fracciones 111-127 de la columna original (cuadro 4) cristalizaron espontáneamente 250 mg de un material cristalino.

3.4.2 Aislamiento del β -D-glucositosterol, 14.

De las fracciones 181-224 del Cuadro 6 precipitaron 118 mg de un sólido color amarillo crema.

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento preliminar via cromatografia en columna del extracto de E. myriochaetum.

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	COMPUESTOS AISLADOS
Hexano	100	1-27	1-19	
Hex-CHCl ₃	90:10	28-50	20-22	
Hex-CHCl ₃	80-20	51-67	23-25	
Hex-CHCl ₃	70-30	68-83	26-39	
Hex-CHCl ₃	60-40	84-107	40-43	
Hex-CHCl ₃	50-50	108-137	44-49	
Hex-CHCl ₃	40-60	138-148	50-74	
Hex-CHCl ₃	30-70	149-159	75-87	
CHCl ₃	100	160-178	88-110	
CHCl ₃ -MeOH	99-1	179-194	111-127	<u>13</u>
CHCl ₃ -MeOH	98-2	195-201	128-133	
CHCl ₃ -MeOH	95-5	202-209	134-143	
CHCl ₃ -MeOH	90-10	210-219	144-180	Mezcla I
CHCl ₃ -MeOH	85-15	220-230	181-191	
CHCl ₃ -MeOH	80-20	231-243	192-195	
CHCl ₃ -MeOH	70-30	344-249	196-205	
Acetona	100	250-257	206-209	
			210-224	
			225-257	<u>17</u>

Cuadro 5. Sistemas de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa delgada.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION	REFERENCIA
I	Hexano:CHCl ₃	Diversas proporciones	-
II	CHCl ₃	100%	-
III	CHCl ₃ :AcOEt	Diversas proporciones	-
IV	CHCl ₃ :Acetona	Diversas proporciones	-
V	CHCl ₃ :MeOH	Diversas proporciones	-
VI	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O	64:50:10:	Bauer, 1978

REACTIVO	AGENTES CROMOGENICOS COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico* (A)	12 g de Sulfato cérico 22.2 ml de H ₂ SO ₄ (conc) 350 g de hielo	Stahl, 1969
Anisaldehído* (B)	0.5 ml de anisaldehído 9.0 ml de etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄ 1.0 ml de ácido acético	Stahl, 1969

* En todos los casos antes de revelar con el cromógeno A, se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta y larga); para el desarrollo del color era necesario calentar por dos minutos a 110 °C.

Cuadro 6. Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 210-224 de la columna original (Cuadro 4).

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	COMPUESTOS AISLADOS
Hexano	100	1-9	1-76	
Hex-CHCl ₃	90-10	10-15	77-83	
Hex-CHCl ₃	80-20	16-23	84-88	
Hex-CHCl ₃	70-30	24-30	89-95	
Hex-CHCl ₃	60-40	31-40	96-127	
Hex-CHCl ₃	50-50	41-47	128-157	
Hex-CHCl ₃	40-60	48-62	158-180	
Hex-CHCl ₃	30-70	63-69	181-224	<u>14</u>
Hex-CHCl ₃	20-80	70-76	225-245	
Hex-CHCl ₃	10-80	77-92		
CHCl ₃	100	93-111		
CHCl ₃ -MeOH	99-1	112-130		
CHCl ₃ -MeOH	98-2	131-140		
CHCl ₃ -MeOH	97-3	141-159		
CHCl ₃ -MeOH	96-4	160-184		
CHCl ₃ -MeOH	95-5	185-225		
CHCl ₃ -MeOH	94-4	226-233		
CHCl ₃ -MeOH	92-8	234-238		
CHCl ₃ -MeOH	80-20	239-245		

3.4.3 Aislamiento de la Pinocembrina, 15.

De las fracciones 46-77 del Cuadro 7 se separaron mediante cromatografía preparativa en capa delgada 140 mg de un sólido amarillo pálido de $p f = 195-197^{\circ}C$ soluble en cloroformo; para la separación se utilizaron cuatro placas y como fase móvil una mezcla de cloroformo-acetato de etilo en proporción 85:15.

3.4.4 Aislamiento de la Crisina, 16.

De las fracciones 53-99 del Cuadro 7 se separaron 21 mg de un sólido amarillo claro de $p f = 254-257^{\circ}C$, en este caso también la separación se realizó mediante cromatografía preparativa en capa delgada.

3.4.5 Aislamiento de la β -D-glucosa, 17.

De las fracciones 225-257 del Cuadro 4 precipitaron en forma espontánea 193 mg de un sólido blanquecino.

3.4.6 Aislamiento de la mezcla de ácidos grasos, I.

De las fracciones 144-180 de la columna original (Cuadro 4) se aislaron 409 mg de una mezcla de ácidos grasos (Mezcla I).

Cuadro 7. Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 225-257 de la columna original (Cuadro 4)

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	COMPUESTOS AISLADOS
Hex-CHCl ₃	50-50	1-50	1-7	
Hex-CHCl ₃	40-60	51-76	8-45	
Hex-CHCl ₃	30-70	77-100	46-52	<u>15</u>
Hex-CHCl ₃	20-80	101-115	53-77	<u>15, 16</u>
Hex-CHCl ₃	10-90	116-131	78-99	<u>16</u>
CHCl ₃	100	132-145	100-113	
CHCl ₃ -MeOH	99-1	146-162	114-148	
CHCl ₃ -MeOH	98-2	163-185	149-189	
CHCl ₃ -MeOH	97-3	186-204	190-212	
CHCl ₃ -MeOH	96-4	205-216	213-246	
CHCl ₃ -MeOH	95-5	217-242	247-257	
CHCl ₃ -MeOH	94-6	243-277	258-272	
CHCl ₃ -MeOH	93-7	278-299	273-280	
CHCl ₃ -MeOH	85-15	300-317	281-285	
			286-290	
			291-317	

3.5 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

3.5.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos; los espectros IR fueron registrados en un instrumento Perkin-Elmer 599'B en pastilla de KBr; los espectros de RMN se determinaron en un instrumento Varian UXR-300S, utilizando como disolventes CDCl_3 y DMSO-d_6 . Como referencia interna se utilizó TMS; Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer 202; Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5988A.

3.5.2 Obtención del derivado acetilado de la pinocembrina 15.

Para obtener el derivado acetilado de la pinocembrina se disolvieron 50 mg del compuesto en una mezcla de 0.5 ml de piridina y un ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 36 horas y al término de este tiempo el producto acetilado se separó de la manera habitual (Shriner et al., 1980), obteniéndose 35.7 mg del derivado acetilado 15A, con $p f = 115-116^\circ \text{C}$.

3.5.3 Obtención de los derivados metilados.

Para obtener los derivados metilados de los productos aislados se utilizó una solución eterea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de etanol y 21.9 g de N-metil-n-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald Aldrich), en 45 ml de eter etílico. (por cada 100 mg de producto a metilar se utilizó 20 ml de una solución eterea de diazometano). El producto a metilar se disolvió en 10 ml de eter o etanol y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. En el Cuadro B se indican los compuestos sometidos a metilación, el rendimiento de los productos obtenidos y sus puntos de fusión.

Cuadro B. Rendimiento de los derivados metilados

COMPUESTO	PESO DEL COMPUESTO	PRODUCTO METILADO	PESO DEL PRODUCTO METILADO	PUNTO DE FUSION °C
crisina <u>16</u>	5 mg	7-metoxi-crisina <u>16A</u>	2.3 mg	121-122
Mezcla <u>I</u>	10 mg	Mezcla <u>IA</u>	9 mg	-

3.5.4 Caracterización de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la mezcla IA.

La separación e identificación de los esteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la mezcla IA, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5988A. La columna utilizada fué del tipo fenil metil silicón MB, con una longitud de 25 m por 0.32 mm de diametro. El gas acarreador fue Helio a p con un flujo de 1 ml/min. La temperatura de la columna se programó de 150-275 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura del eyector y detector fué de 275 °C. El voltaje para registros de espectros de masas fue de 70 v. Las masas se registraron en un rango de 33-600 amu.

3.5.5 Prueba de Molish.

Una pequeña cantidad del compuesto 17, se disolvió en tres ml de agua destilada, se le adicionó un ml de una solución de reactivo de α -naftol (10% en etanol), y seguidamente se agregó por las paredes del tubo de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observandose una coloración violeta en la interfase de los líquidos: la coloración era indicativa de una prueba positiva para carbohidratos. Se utilizó un

control positivo (β -D-glucositolsterol) y uno negativo.

3.6 Determinación de la toxicidad in vitro para Artemia salina Leach del extracto original, fracciones y compuestos aislados.

3.6.1 Incubación de los huevos de Artemia salina.

Los huevecillos de A. salina fueron incubados en medio salino artificial durante 48 horas, al término de este tiempo los camarones fototrópicos se encontraban en disposición de ser empleados en el bioensayo.

3.6.2 Preparación de las muestras.

20 mg de extracto, fracción o compuesto puro, objeto de evaluación se disolvió en dos ml de un disolvente apropiado, se transfirieron 5, 50 y 1000 μ l de dicha solución a tres viales por separado obteniéndose de esta manera 10, 100, y 1000 ppm respectivamente. Cada disolución se realizó por triplicado, finalmente se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío.

3.6.3 Bioensayo.

Se transfirieron diez camarones (colectados con pipeta Pasteur) a cada uno de los viales conteniendo la muestra a evaluar y cinco ml de un medio salino artificial. Los viales fueron mantenidos con iluminación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la cuenta de los camarones sobrevivientes y se procedió a determinar la LC_{50} .

IV RESULTADOS

Al extracto cloroformo-metanólico (39.7 g) obtenido a partir de las partes aéreas de Equisetum myriochaetum se le determinó la toxicidad contra A. salina, los resultados obtenidos se indican en el Cuadro 11. Posteriormente el extracto se fraccionó de manera convencional mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Como resultado del análisis cromatográfico se obtuvieron las fracciones primarias indicadas en el Cuadro 4 (sección experimental). La recromatografía en columna de las fracciones combinadas 225-257 y posteriores cromatografías preparativas permitieron el aislamiento de la pinocembrina 15 y la crisina 16. De las fracciones 181-224 (Cuadro 6) se obtuvo el β -D-glucositosterol, 14. De las fracciones primarias 111-127 y 225-257 cristalizaron espontáneamente el β -sitosterol 13 y la glucosa 17, respectivamente. Finalmente, la recromatografía de las fracciones primarias 144-180 condujo a la obtención de una mezcla de ácidos grasos (Mezcla I). El rendimiento obtenido de cada uno de los compuestos se indica en el Cuadro 9.

Cuadro 9 Rendimiento de los compuestos aislados de
Equisetum myriochaetum.

COMPUESTO	mg OBTENIDOS	% DE RENDIMIENTO EN BASE A PLANTA SECA
<u>13</u>	250	0.0227
<u>14</u>	118	0.0107
<u>15</u>	140	0.0127
<u>16</u>	21	0.0019
<u>17</u>	193	0.0175
Mezcla I	409	0.0372

La pinocembrina 15, se aisló de las fracciones 46-77 (Cuadro 7) como un sólido amarillo pálido soluble en cloroformo. De este compuesto se obtuvieron 140 mg dando un rendimiento de 0.0127% en base a planta seca. Sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en el Cuadro 11. El tratamiento con anhídrido acético y piridina permitió la obtención del derivado acetilado 15A. Las constantes físicas y espectroscópicas del derivado se resumen en el Cuadro 12.

Por otra parte, de las fracciones 53-99 (Cuadro 7) se obtuvieron 21 mg de crisina 16 como un sólido amarillo claro, en el Cuadro 13 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas. El tratamiento de 16 con diazometano permitió obtener el derivado metilado 16A cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en el Cuadro 14.

El β -sitosterol, 13, el β -D-glucositosterol, 14 y la β -D-glucosa, 17, se identificaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra auténtica.

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la mezcla de ácidos grasos metilados, (mezcla 1A) permitió la detección e identificación de ocho ésteres metílicos de ácidos grasos. Los ésteres identificados correspondían a los ácidos: láurico (18), mirístico (19), pentadecanoico (21), palmítico (21), margárico (22), esteárico

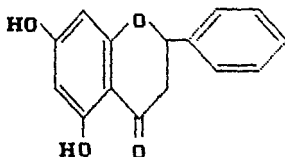
(23), behénico (24), v lignocérico (25). En el Cuadro 15 se resumen los tiempos de retención y fragmentos de masa/carga mas importantes para cada uno de los compuestos antes mencionados.

Finalmente se determino la de toxicidad para A. salina del extracto de E. myriochaetum, pinocembrina, crisina y la fracción (225-257) de donde se obtuvieron ambos compuestos. Los resultados del % de mortalidad de las muestras ensayadas se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Toxicidad expresada en % de mortalidad y su correspondiente LC_{50} del extracto, la fracción 225-257 y compuestos bioactivos de Equisetum myriochaetum para Artemia salina.

MUESTRA	% DE MORTALIDAD					LC_{50}
	1000ppm	100ppm	10ppm	5ppm	1ppm	
Extracto	100	0	0	-	-	< 1000
Fracción 225-257	73.3	56.7	0	-	-	169.3
Pinocembrina	100	100	100	26.7	0	8.2
Crisina	100	10	0	-	-	202.6

Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas de la pinocembrina 15.



F M = $C_{15}H_{12}O_4$

P F = 195-197 °C

U V λ MeOH nm. 290, 330.
max.

Espectro 1

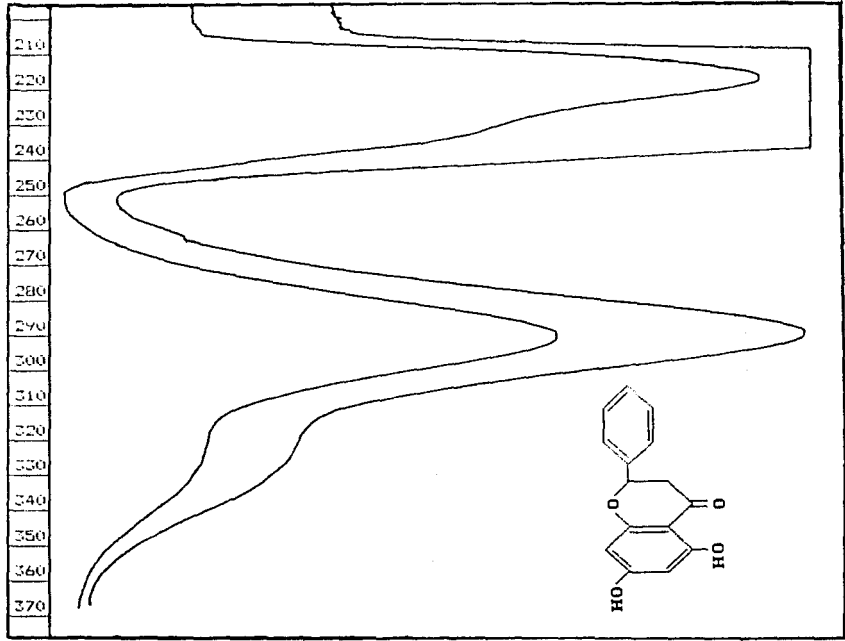
I R KBr ν cm^{-1} max. 3100, 3000, 1620, 1580, 1480, 1290, 1160, 1080, 820.

Espectro 2

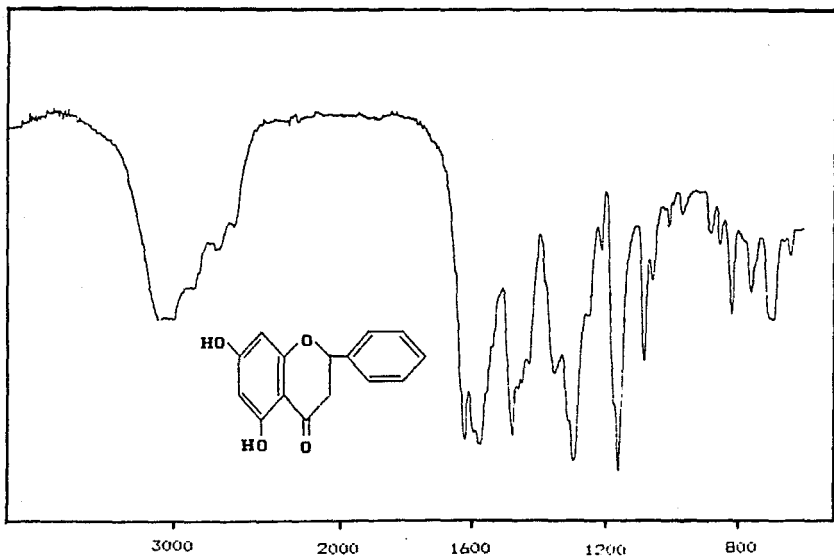
EMIE m/z (int.rel.) 256(M⁺, 100), 255(M-1, 69), 179(M-77, 52), 153(M-103, 12), 152(M-104, 43), 124(M-132, 40), 104(M-152, 19), 91(M-165, 65), 78(M-148, 23) Espectro 3

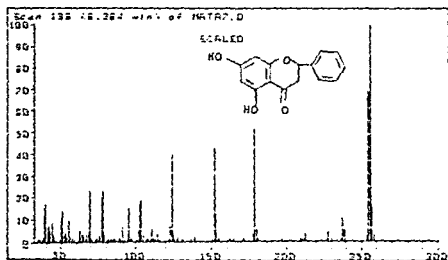
RNM ¹H δ (ppm) (CDCl₃, 300 MHz) 12.04(s, OH-5), 9.89(sa, OH-7), 7.47-7.29(m, H-2'-H-6'), 6.04 d (2.14 Hz., H-B), 6.03(d, 2.14 Hz., H-6), 5.40(dd, 12.85, 3.10 Hz., H-2), 3.06(dd, 17.14, 12.92 Hz., H-3), 2.79(dd, 17.14, 3.09 Hz., H-3'). Espectro 4

RNM ¹³C δ (ppm) (CDCl₃, 300 MHz.) 195.19(C-4), 166.80(C-7), 164.07 (C-5), 162.80(C-9), 138.46(C-1'), 128.65(C-3', C-5'), 126.00(C-2, C-6'), 102.35(C-10), 95.58(C-8), 78.89(C-2), 43.26(C-3). Espectros 5 y 6

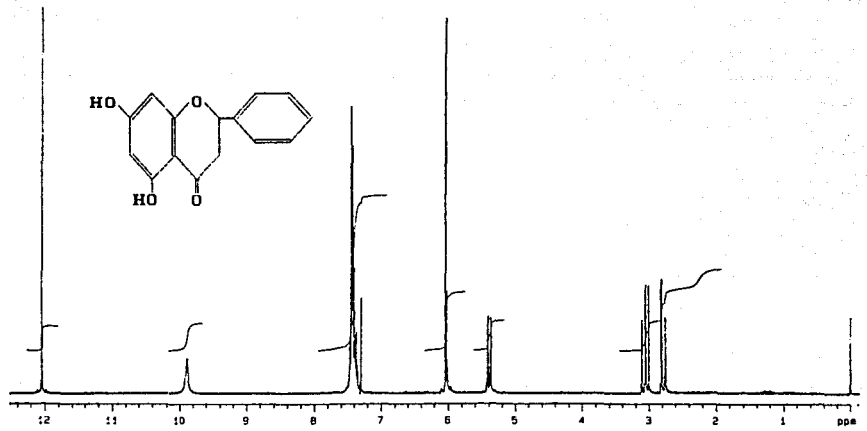


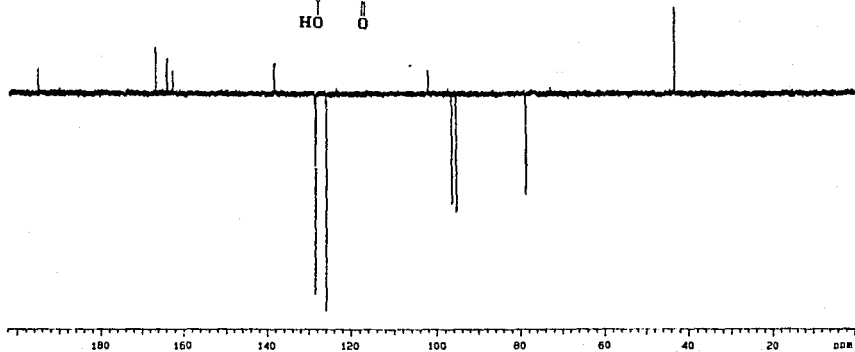
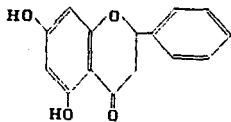
Espectro 1.





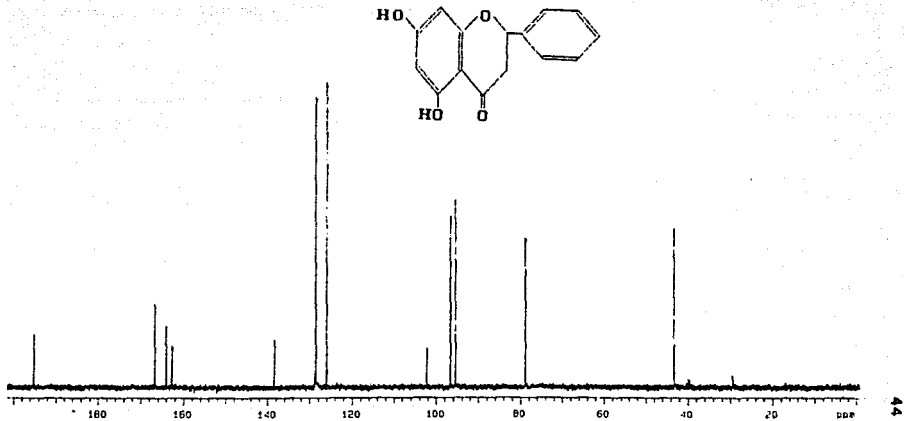
Espectro 4.



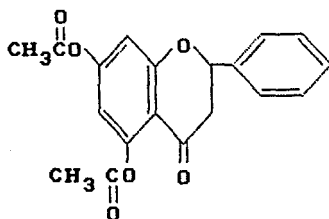


ESPERINO S.

Espcetro 6.



Cuadro 12. Constantes físicas y espectroscópicas de la
5,7-diacetilpinocembrina 15A.



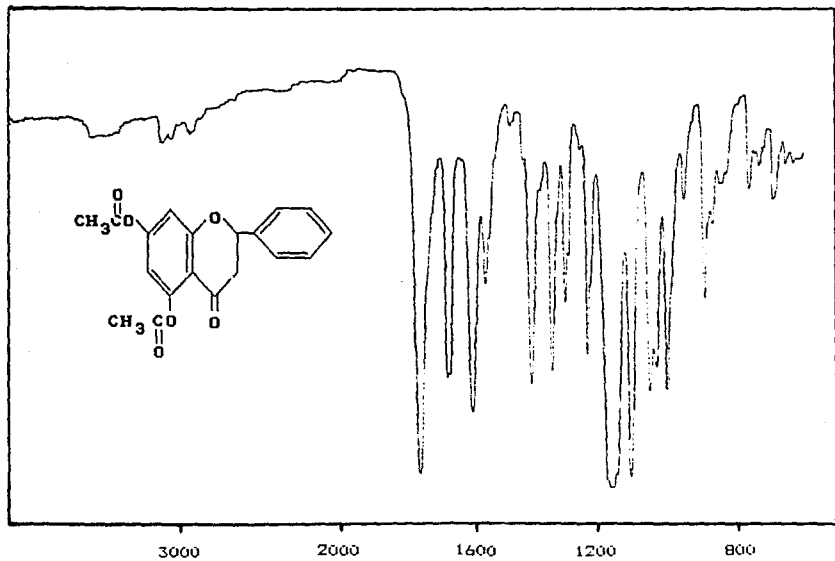
F M $C_{19}H_{16}O_6$

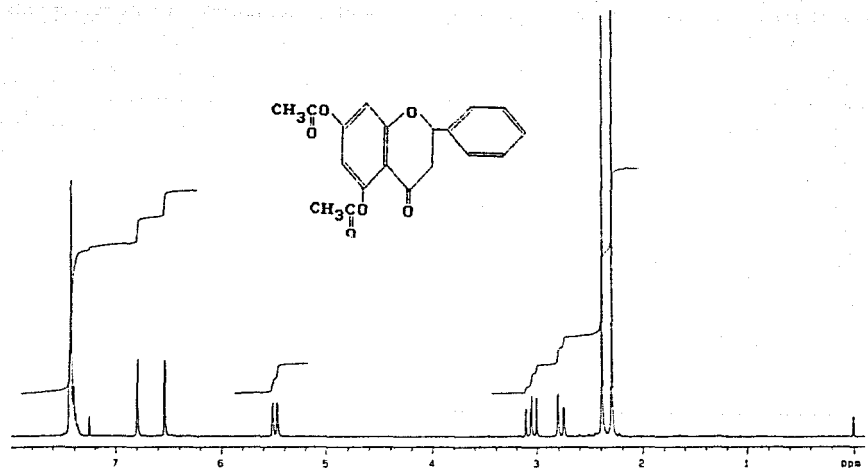
P F = 115-116 °C

I R	KBr	1760, 1680, 1600, 1570, 1430, 1320, 1260, 1180, 1120, 1070, 1050, 1010, 900.	Espectro 7
	ν cm ⁻¹ max.		

RMN ¹ H	δ (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz.)	7.45-7.38(m, H-2'-H-6'), 6.79(d, 2.2 Hz., H-8), 6.54(d, 2.20 Hz., H-6), 5.49(dd, 15.05, 2.81 Hz., H-2), 3.05(dd, 16.73, 13.55 Hz., H-3), 2.78(dd, 16.73, 2.81 Hz., H-3'), 2.38(s, CH ₃ CO-), 2.29(s, CH ₃ CO-).	Espectro 8

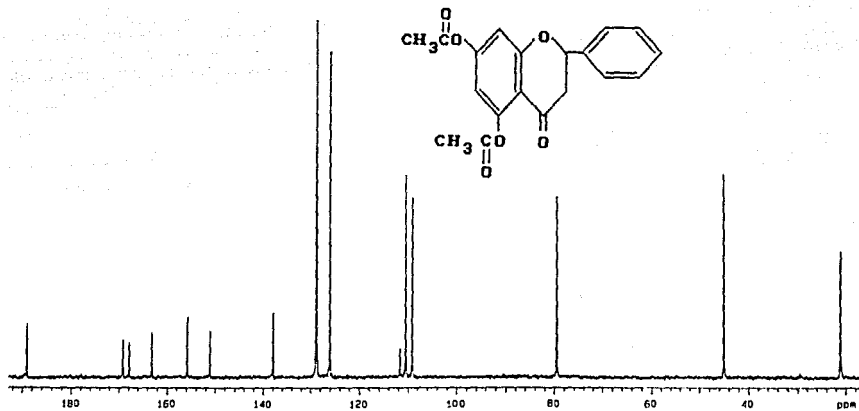
RMN ¹³ C	δ (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz.)	189.05(C-4), 169.17(CH ₃ CO-), 167.90(CH ₃ CO-), 163.18(C-7), 155.88(C-5), 151.13(C-4), 137.96(C-1'), 128.87(C-3'-C-5'), 126.07(C-2', C-6'), 117.72(C-10), 110.46(C-6), 109.07(C-8), 79.55(C-2), 45.11(C-3), 21.16(CH ₃ CO-), 21.04(CH ₃ CO-).	Espectros 9 y 10



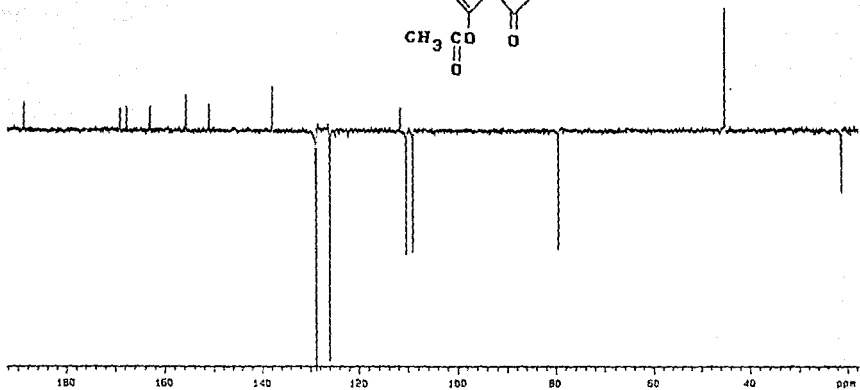
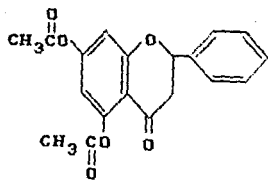


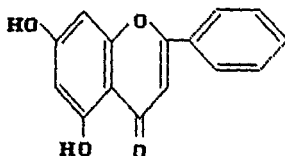
Espectro B.

Espectro 9.



4B



Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la crisina, 16.

F M = $C_{15}H_{10}O_4$

P F = 254-257 °C

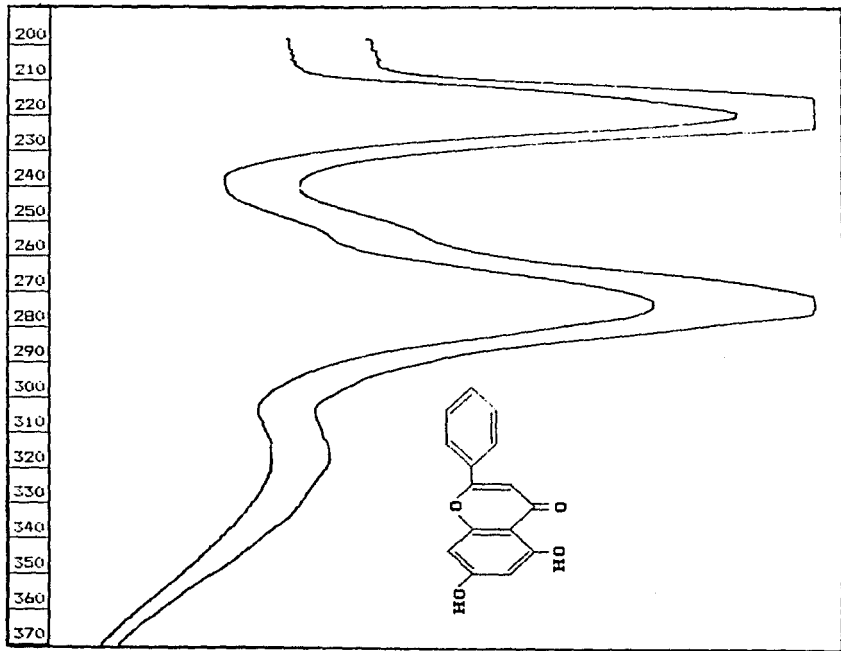
U V MeOH
λ nm. 270, 320 Espectro 11
max.

I R KBr
ν cm^{-1} 3000, 1640, 1600, 1570, 1490,
1350, 1300, 1160, 1020. Espectro 12
max.

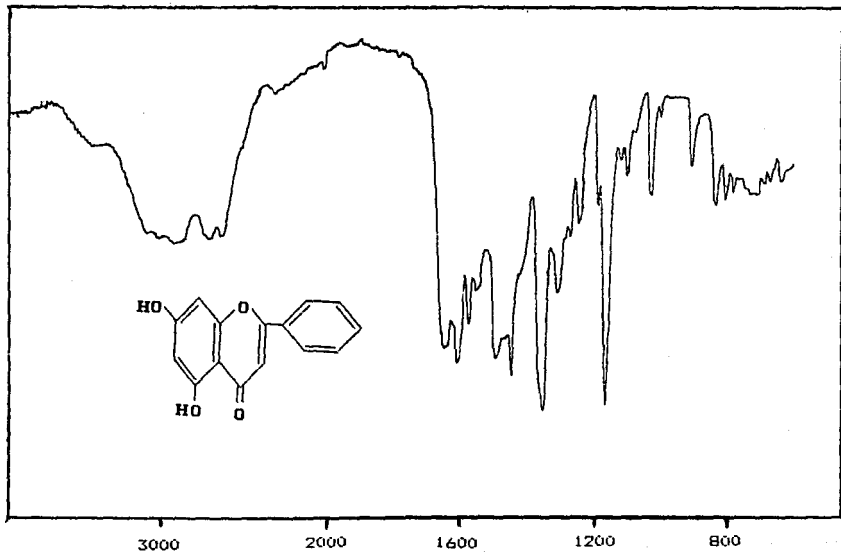
EMIE m/z (int.rel.) 254(M⁺, 100), 253(M-1, 12),
226(M-28, 22), 152(M-102, 30),
124(M-130, 35), 113(M-141, 19),
105(M-149, 5), 96(M-158, 15),
77(M-177, 14). Espectro 13

RMN ¹H δ (ppm) 12.84(s, OH-5), 8.08(dd, 6.25,
(DMSO-d₆, 300 MHz.) 1.40 Hz., H-2', H-6'), 7.59(dd,
6.25, 1.40 Hz., H-3', H-5'),
7.58(s, OH-7), 7.58(m, H-4')
6.98(d, 2.13 Hz., H-8), 6.23
(d, 2.13 Hz., H-6'). Espectros 14 y 15

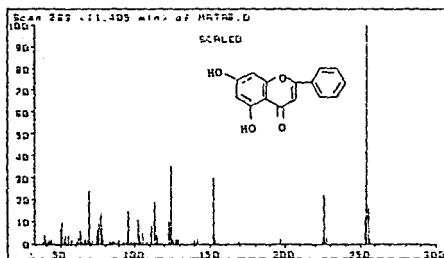
RMN ¹³C δ (ppm) 181.81(C-4), 164.50(C-7),
(DMSO-d₆, 300 MHz.) 163.10(C-2), 161.45(C-5),
157.42(C-9), 132.01(C-4'),
130.67(C-1'), 129.12(C-3', C-5')
126.39(C-2', C-6'), 105.15 (C-3)
103.91(C-10), 99.03(C-6),
94.13(C-8). Espectros 16 y 17

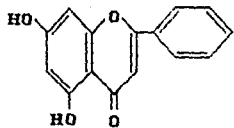


Espectro 11.

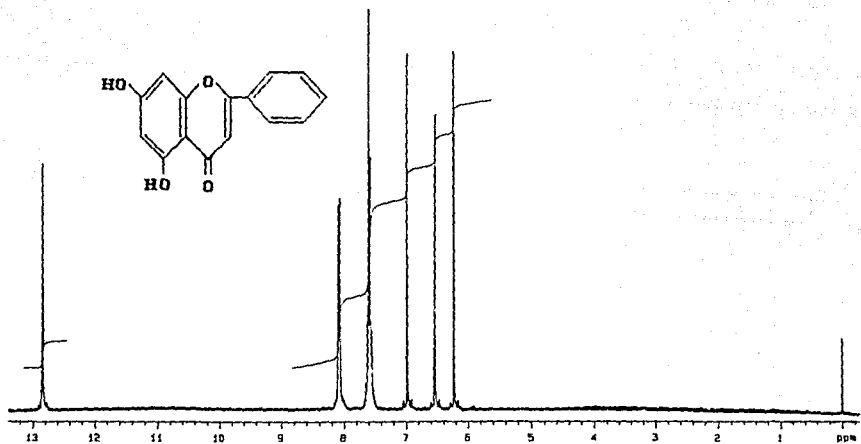


Espetra 12.

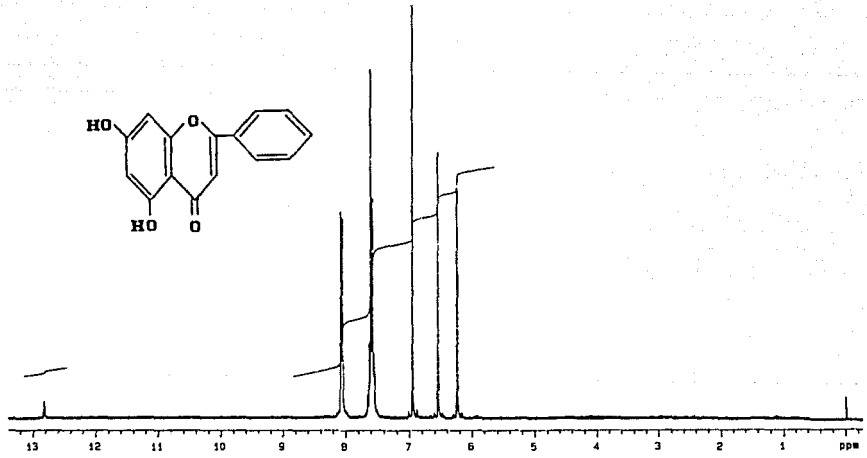


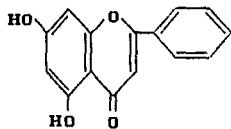


Espectro 14.

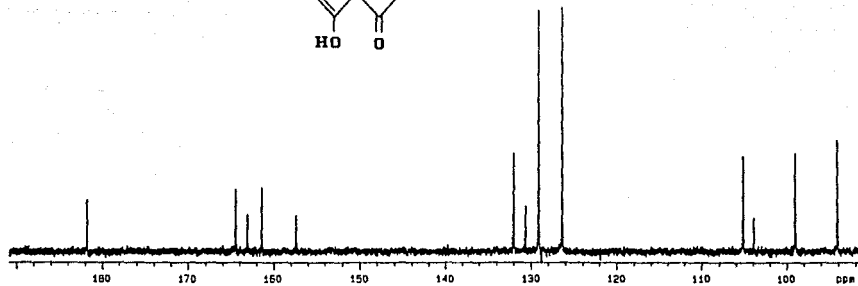


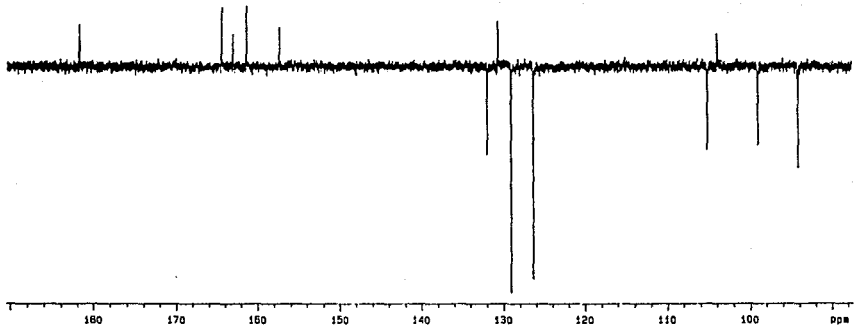
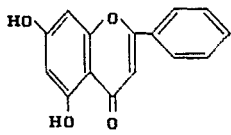
Espectro 15.





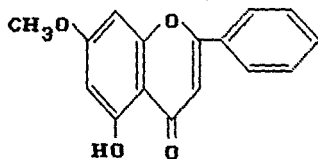
Espectro 16.





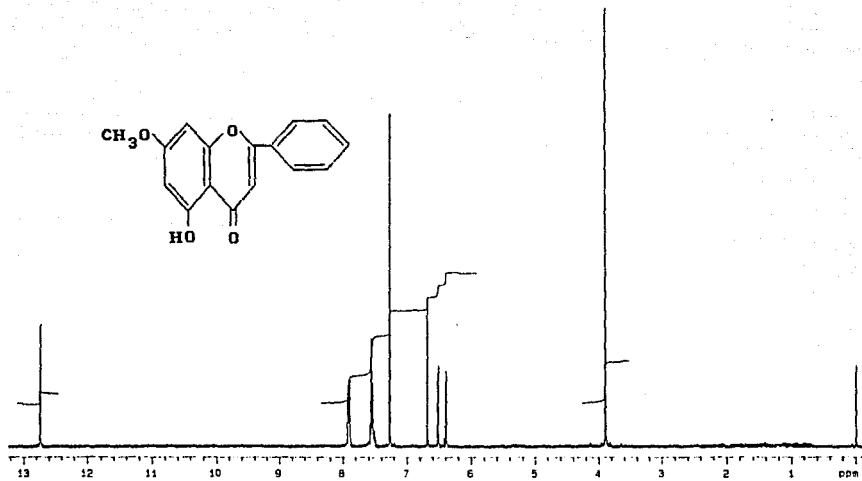
Espectro 17.

Cuadro 14. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7-metoxicrisina 16A.



I R	KBr ν cm^{-1} max.	1655, 1615, 1595, 1350, 1155, 1035, 853.
RMN ^1H	δ (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz.)	12.74 (s, OH-5), 7.91-7.88(m, H2', H6'), 7.55-7.52(H-3'-H-5') 6.68(s, H-3), 6.52(d, 2.20 Hz., H-6), 6.39(d, 2.20 Hz., H-8), 3.89(s, $\text{CH}_3\text{-O}$). Espectra 18

Espectro 18.



Cuadro 15. Acidos grasos de Equisetum myriochaetum.

NOMBRE	T R [*] min	% ^{**}	FORMULA g/mol	P M	FRAGMENTOS			OTROS	ESPECTRO
					M ⁺	M-31	74 87		
AC. LAURICO (18)	3.445	1.96	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214	1	1	38 31	143(10), 111(20), 55(39), 43(99).	Espectro 19
AC. MIRISTICO (19)	5.306	10.76	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	6	6	100 59	199(13), 143(18), 75(15), 55(34).	Espectro 20
AC. PENTADECANOICO (20)	6.297	11.06	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	6	4	100 59	143(13), 55(29), 43(47), 42(32).	Espectro 21
AC. PALMITICO (21)	7.296	28.79	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	9	5	100 56	143(14), 55(27), 43(49), 41(31).	Espectro 22
AC. MARGARICO (22)	8.307	5.74	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	4	12	100 56	143(17), 55(26), 43(34), 41(23).	Espectro 23
AC. ESTEARICO (23)	9.267	17.18	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	296	22	5	100 65	255(29), 199(22), 55(28), 43(99).	Espectro 24
AC. BEHENICO (24)	12.732	7.15	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	7	1	100 66	143(38), 55(25), 43(38).	Espectro 25
AC. LIGNOCERICO (25)	14.431	17.35	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382	26	4	100 73	143(22), 57(32), 43(49).	Espectro 26

* Correspondientes a los ésteres metílicos.
** Referida a la mezcla total metilada.



ácido laurico, 18.



ácido mirístico, 19.



ácido pentadecanoico, 20.



ácido palmítico, 21.



ácido margárico, 22.



ácido esteárico, 23.



ácido behénico, 24.



ácido lignocérico, 25.

Figura 6. Estructuras de los ácidos grasos de

Equisetum myriochaetum.

V. DISCUSION

Sucesivas cromatografías en columna y en capa delgada de un grupo de fracciones cromatográficas primarias del extracto cloroformo-metanólico de Equisetum myriochaetum permitieron la obtención de dos flavonoides: la pinocembrina (15) y la crisina (16); dos esteroides: el común β -sitosterol (13) y el β -D-glucositosterol (14); un monosacárido: la β -D-glucopiranososa (17) y una mezcla de ácidos grasos (Mezcla I).

De manera general los compuestos se caracterizaron por métodos químicos, espectroscópicos y por comparación con muestras auténticas.

El análisis de las evidencias que permitieron la identificación de los compuestos aislados será el objetivo fundamental de la presente sección.

El compuesto 15 se aisló como un sólido amarillo pálido con $p_f = 195-197^\circ C$, soluble en cloroformo. El comportamiento cromatográfico en capa fina, la magnitud de los máximos de absorción en el UV, (290, 230 nm., Espectro 1) y el espectro de IR (Espectro 2), en el que se observaron bandas para hidroxilo (3000 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1620 cm^{-1}) y aromaticidad (1600 y 1500 cm^{-1}), indicaron a priori que el compuesto era un flavonoide (Harborne, 1975; Markham, 1982).

El espectro de masas (Espectro 3) permitió establecer la fórmula molecular como $C_{15}H_{12}O_4$ y presentó los fragmentos característicos para una flavanona tetrasustituida en el anillo A y monosustituida en el anillo C (Harborne, 1975; Marckham, 1982). Los fragmentos mas importantes se ilustran en la Figura 7. La obtención del derivado diacetilado (15A) confirmó la naturaleza difenólica del compuesto.

El espectro de RMN 1H en $CDCl_3$ (Espectro 4) confirmó que el producto 15 era una flavanona ya que se observaron señales para:

- a) Dos hidroxilos fenólicos a δ 9.89 y δ 12.04; el desplazamiento químico de este ultimo sugirió que uno de los hidroxilos se encontraba quelatado con el carbonilo de la γ -pirona y que por lo tanto en C-5 debía de ubicarse un hidroxilo.
- b) Un multiplete entre δ 7.47 y δ 7.29 asignable a los cinco hidrógenos de un anillo aromático monosustituido.
- c) Dos hidrógenos aromáticos meta relacionados a δ 6.04 y δ 6.03 atribuibles a H-8 y H-6 de una flavanona con sustituyentes oxigenados en C-5 y C-7.
- d) Un sistema ABX en δ 5.40 (dd, $J = 12.85, 3.10$ Hz, H-2), δ 3.06 (dd, $J = 17.2, 12.92$ Hz, H-3) y δ 2.79 (dd, 17.14, 3.09 Hz, H-3')

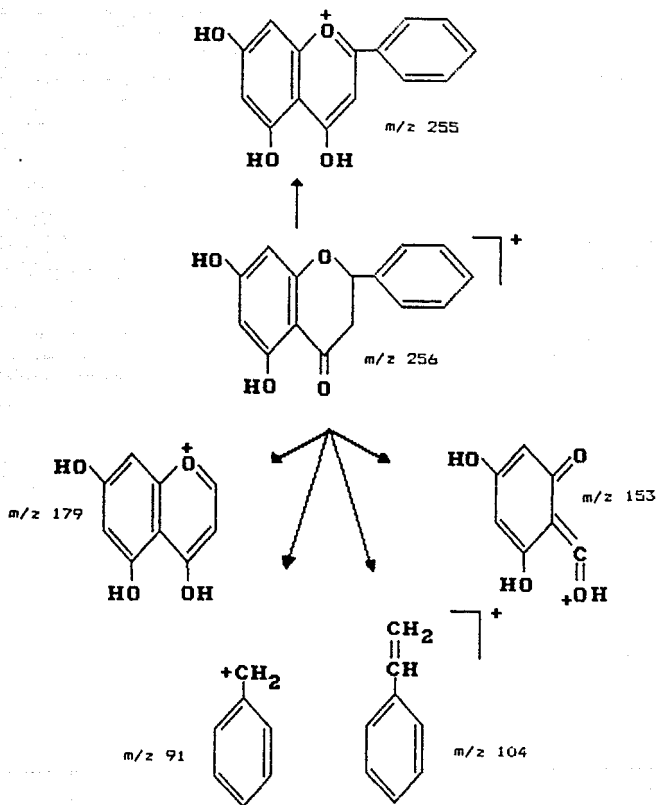


Figura 7. Patrón de fragmentación de la pinocembrina en espectrometría de masas.

El estudio detallado del espectro RMN ^1H bidimensional (Figura 8) permitió confirmar las correspondientes correlaciones entre los hidrógenos que conformaban el sistema ABX antes mencionado y el cual es diagnóstico para flavanonas. Los aspectos más importantes del análisis fueron los siguientes:

- a) La señal en δ 5.40 (H-2) correlacionaba con el doblete de dobletes ($J = 17.2, 12.92$ Hz) en δ 3.06 (H-3).
- b) H-2 además de correlacionar con H-3 lo hacía también con el doblete de dobletes ($J = 17.14, 3.09$ Hz) en δ 2.97 (H-3'). Las magnitudes de las constantes de acoplamiento entre H-2, H-3 y H-3' eran consistentes con la orientación α del fenilo en C-2.

Los espectros de RMN ^{13}C (Espectros 5 y 6) fueron congruentes con la naturaleza flavanona del compuesto ya que presentaron las señales características para este tipo de compuestos (Harborne y Mabry, 1982).

Con base a la discusión antes presentada se identificó al producto 15 como la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona).

El comportamiento cromatográfico en capa delgada y los espectros de UV e IR (Espectros 16 y 17) del compuesto (16) sugirieron al igual que en el caso del compuesto anterior (15), que este producto era un flavonoide.

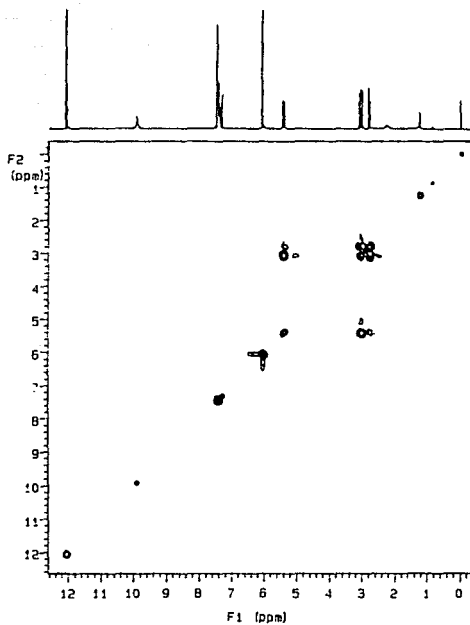


Figura 8. Espectro de RMN ^1H bidimensional 2D-COSY de la pinacembrina.

Su fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{10}O_4$ por espectrometría de masas (Espectro 13) y el patrón de fragmentación observado (Figura 9) indicó claramente que el compuesto era una flavona tetrasustituida en el anillo A y monosustituida en el anillo C (Harborne, 1975; Marckham, 1982).

Las características más importantes del espectro de RMN 1H (Espectro 14) fueron las siguientes:

- a) En δ 8.7 y δ 12.06; se observaron dos señales para hidroxilos fenólicos, la señal en δ 12.8 al igual que en el caso anterior debe corresponder a la del hidroxilo en la posición C-5 del núcleo base.
- b) En δ 8.08 aparece un doblete de dobletes que integra para dos hidrógenos ($J = 6.25, 1.44$ Hz H-2 y H-6').
- c) Un multiplete en δ 7.58 que integraba para cuatro hidrógenos uno de los cuales correspondía a un hidroxilo debido a que en el espectro registrado con D_2O (Espectro 15), esta misma señal integraba tan solo para tres hidrógenos. Este multiplete era asignable a los hidrógenos restantes del anillo B.
- d) Un singulete en δ 6.98 que integra para un hidrógeno atribuible al H-3 de la flavona.

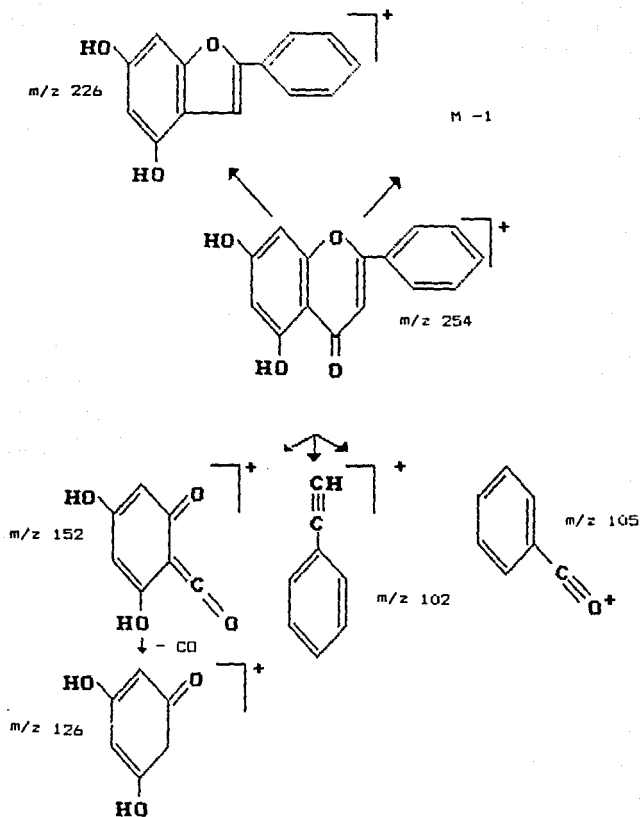


Figura 7. Patrón de fragmentación de la crisina en espectrometría de masas.

- e) Dos dobletes centrados en δ 6.53 ($J = 2.13$ Hz) y δ 6.23 ($J = 2.13$ Hz) asignables a H-B y H-6, respectivamente.

El análisis del espectro bidimensional (Figura 10) confirmó la interrelación entre estos dos hidrógenos.

El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 16) presentó el perfil típico de una flavona, ya que se observaron claramente señales para:

- a) Un carbonilo de la γ -pirona en δ 181.81.
- b) Cuatro carbonos aromáticos con sustituyentes oxigenados en δ 164.50, δ 163, δ 161 y δ 157.
- c) Siete metinos aromáticos los cuales se asignaron de la siguiente forma: δ 132 (C-4'), δ 129.12 (C-3' y C-5'), δ 126 (C-2' y C-6'), δ 99.03 (C-6) y δ 94.13 (C-8).
- d) El C-3 de una flavona en δ 105.5.
- e) Dos carbonos cuaternarios no oxigenados en δ 130.67 y δ 103.91 asignables a C-1' y C-10, respectivamente.

El tratamiento con diazometano permitió obtener el derivado monometilado (16A) cuyas constantes físicas y espectroscópicas (Cuadro 15) resultaron idénticas al de una muestra auténtica de tectocrisina 16A.

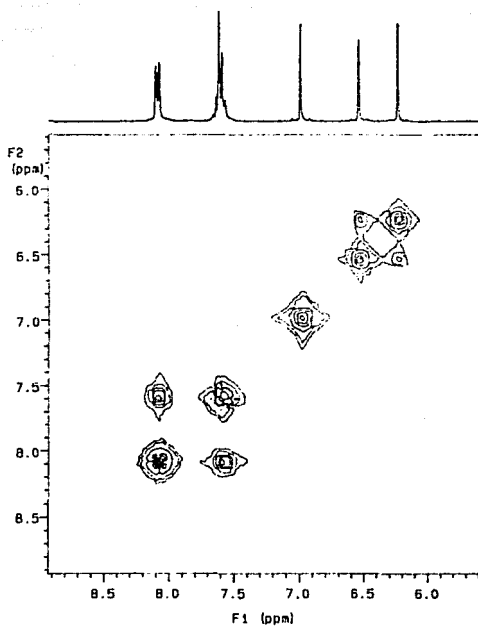


Figura 10. Espectro de RMN ¹H bidimensional 2D-COSY de la crisina.

Con base a las evidencias presentadas, el compuesto 16 se identificó como la crisina (5,7-dihidroxi-flavona)

La identificación de β -sitosterol, β -D-glucositolsterol y la β -D-glucopiranososa, se realizó por comparación con muestras auténticas.

Finalmente el análisis vía cromatografía de gases-espectrometría de masas permitió la detección e identificación de ocho ésteres metílicos de ácidos grasos (Cuadro 15). Los ésteres metílicos corresponden a los siguientes ácidos grasos: láurico (18), mirístico (19), pentadecanoico (20), palmítico (21), margárico (22), esteárico (23), behénico (24) y lignocérico (25).

Los espectros de masas (Espectros 19-26) de los ésteres metílicos de los ocho ácidos grasos fueron muy similares. En todos los casos se detectaron los iones moleculares correspondientes y los fragmentos diagnósticos para los ésteres metílicos de ácidos grasos a m/z M-31, 74, 87 y 59 (Silverstein, et al., 1981). El pico m/z 74 es el más característico y se debe un rearrreglo de McLafferty. En la Figura 11 se representa la formación de los iones antes mencionados.

Dado el bajo porcentaje de mortalidad presentado por el extracto de Equisetum myriochaetum (Cuadro 10) se decidió

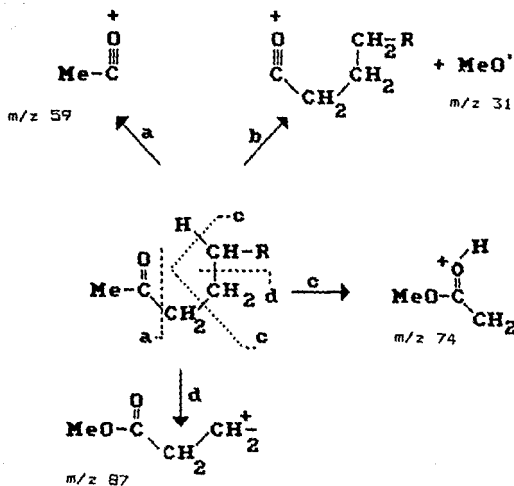
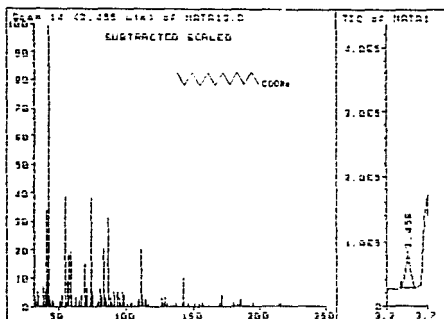
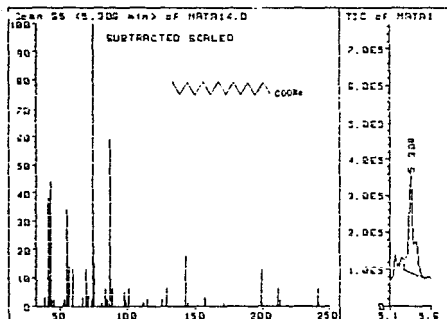


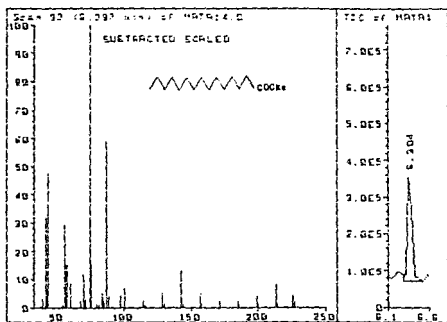
Figura 11. Formación de los iones M-31, 49, 74 y 87 de los ésteres métilicos de ácidos grasos.



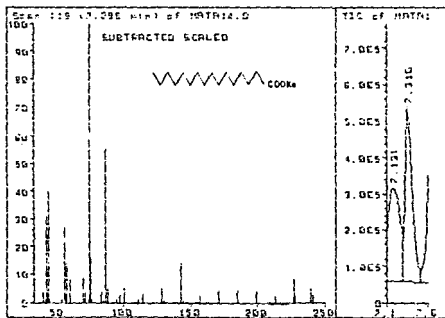
Espectro 19.



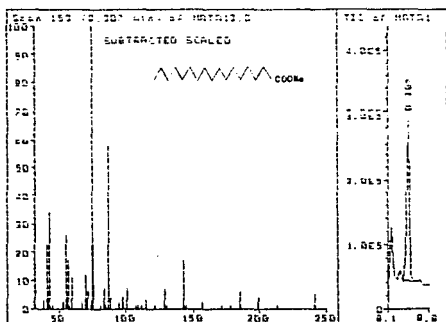
Espectro 20.



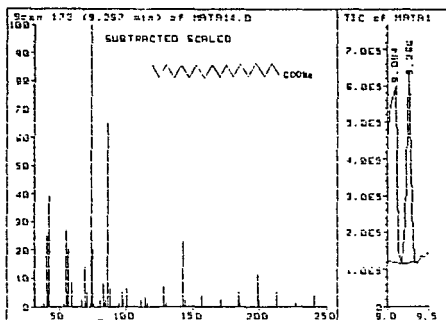
Espectro 21.



Espectro 22.



Espectro 23.



Espectro 24.

realizar el estudio fitoquímico de la planta de manera convencional. Sin embargo al evaluar los compuestos aislados se encontró que dos de ellos (pinocebrina y crisina) mostraron una buena toxicidad para el crustáceo Artemia salina, en consecuencia se decidió evaluar posteriormente todas las fracciones primarias (Cuadro 4) encontrándose que tan solo la fracción 225-257 de donde se aislaron ambos productos presentaba una moderada actividad. Estos resultados se pueden interpretar de la siguiente manera: que en el extracto original existieran sustancias que antagonizaran la acción de los compuestos bioactivos y segunda que la concentración de ambos constituyentes era muy baja.

Finalmente cabe hacer mención que tanto la pinocebrina como la crisina constituyen principios activos conocidos. La pinocebrina posee actividades ovicida, larvicida, fasciolicida y antimicrobiana, (Camacho, 1990). A la crisina se le ha demostrado actividad antimicrobiana específicamente contra Pseudomona aeruginosa y Candida albicans (Rojas, 1990).

VI RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico convencional de las partes aéreas de Equisetum myriochaetum permitió el aislamiento y caracterización de dos flavonoides: la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavonona) y la crisina (5,7-dihidroxi-flavona), dos esteroles: el β -sitosterol y el β -D-glucositolsterol, un carbohidrato: la β -D-glucopiranososa, y ocho ácidos grasos identificados como: láurico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico, esteárico, behénico y lignocérico.
2. El extracto cloroformo-metanólico y la fracción 225-257, presentaron una moderada actividad contra Artemia salina, (Ver Cuadro 10 sección de resultados) La pinocembrina ($LC_{50} = 8.2$ ppm) y la crisina ($LC_{50} = 202.6$ ppm) aisladas de la fracción activa mostraron una actividad considerable contra Artemia salina.
4. La presencia de pinocembrina y crisina en esta planta podrían estar correlacionado con el uso tradicional de la misma como antiséptico urinario, ya que previamente se demostró in vitro la actividad antimicrobiana de estos dos metabolitos.

5. En esta investigación no se encontró ninguna de los flavonoides descritos previamente en la literatura como constituyentes de las partes aéreas de varias especies del género Equisetum. Por otra parte los flavonoides aislados en este estudio no habían sido obtenidos de otras especies del género.

6. Dados los resultados obtenidos se cumplieron los objetivos generales propuestos, ya que no solo determinó la composición química de la especie objeto de estudio sino que además se aislaron y caracterizaron dos principios activos conocidos: la pinocembrina y la crisina.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Adams, K. R. y Bonnett, R. C., Phytochemistry, 10 (8) 1885-90 (1971).
2. Adams, K. R., Bonnett, R. C. y Kutney, J.P., J. Chem. Soc. D, 9 456-7 (1969).
3. Aivazyan, A.A., Nemeko, A.A., Shashkina, V.G., Shukhman, M. I. y Burisenkova, A. I., USSR SU 1,327,882 (Cl A6K7/08) 07 Aug. 1987 appl. 3,826,761 Dec. 1984 From. Otkrytiya Izobret, 29 16-17 (1987). [A través de C.A. 108 81803n (1988)].
4. Balogh, G. y Hung, T. H. V. 35, 160 (Cl A23F3/4) 28 Jun. 1985, appl. 8,212,490 03 Aug 1986 6 pp. [A través de C. A. 103 213827g (1985)].
5. Bauer, H. H., Instrumental Analysis, Henry H. Bauer, Gary D. Christian, James E. O' Reilly (eds) Allia and Bacon, Boston, 1978 p. 1832.
6. Baytopiturhan y Gurkan, E., Mecm 8 (1) 63-74 (1972). [A través de C. A. 79 15817b (1973)].
7. Bazeli, M. y Prankowska, I., Farm. Pol. 38 (11) 563-5 (1978). [A través de C. A. 98 204257x (1983)].
8. Beckmann, S., y Geiger, H., Phytochemistry 2 (3) 281-7 (1963).
9. Beshia, M., Leonte, A. y Dancea, I., Bul. Univ. Galati Fasc. 6 (5) 23-7, (1982). [A través de C. A. 101 167095a (1984)].
10. Bonnett, R., Middlemiss, F. A. y Nara T., Phytochemistry 11 (9) 2801-2, (1972).
11. Bourdoux, P., Vandervoist, D. y Hootele, C., Phytochemistry 10 (8) 1934-5, (1971).
12. Calzada, B. F. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM México, 1989.
13. Camacho, C. M. R. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM México, 1990.
14. Castañeda, L. P. C. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM México. 1988.

15. Chiu, F. L., Patterson, G. W. y Sart, T. A., Phytochemistry **27** (3) 819-22, (1988).
- 16 Cruz, R. M. C. y Mendoza, D. S. O. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM México, 1991.
17. D'Agostino M., Dinia, A. Pizza, C., Senatore, F., y Aquino, R., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **60** (12) 2241-5 (1984). [A través de C. A. 102 109852e (1985)].
18. Damirov, I. A., Ya, G. D. e Ismailov, A. I., Azerbaidzhan Med. **1957** No. 11, 36-43, (1957). [A través de C.A. 54 19876d (1960)].
19. Dietsche W. y Eugster C.H., Chimia (Switz) **14** 353-5 (1960). [A través de C.A. 55 12438d (1961)].
20. Doerfel, K., Schimming, J. y Gold, W., 62,649 (Cl A61K) 05 Jul. 1968 appl. 08 Aug. 1967, 2 pp. [A través de C.A. 70 90700a (1969)].
21. Duke, J. A., 1929, CRC Hand Book of Medicinal Herbs Florida, CRC 1985 677 p.
22. Eugster, C. H., Heterocycles **4** (1) 51-105 (1976).
23. Garcia, M. R. Tesis de Maestría Facultad de Química, UNAM, México. 1987.
24. Geiger, H., Lang, U., Britisch, E., Maboy T. J., Suhr-Shevecker, U., Vander, V. G., y Waldrum, H., Phytochemistry **17** (2) 336-7 (1978)
25. Geiger, H., Reichert, S., y Markham, K. R., Anorg. Chem. Org. Chem **37bB** (4) 504-7 (1982) [A través de C.A. 96 196551e (1982)]
26. Gill, S., Bazeli, M. y Dankowska, I. Farm. Pol. **38** (11) 563-5 (1982) [A través de C.A. 98 204257x (1983)].
27. Gradstein, I., Fr. Demande 2.294,714 (Cl.A61K35/78) 16 Jul. 1976 appl. 74/1222 15 Jan, 1974; 6 pp. [A través de C. A. 86 958732 (1977)].
28. Green, C. L., Mayer C., y Eugster, C., H. Helv. Chim. Acta **52** (3) 673-8 (1969)
29. Harborne, J.B., The Flavonoids, J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry.(eds) New York. Academic Press, 1975.

30. Harborne, J. B. and Mabry, H. T., *The Flavonoids, Advances in Research*, Chapman y Hall, London N. Y. 1982.
31. Hauke, R., *A Taxonomic Monograph Of The Genus Equisetum Subgenus Hippochaete*, Chr. Belsler. Stuttgart, 1963 123 p.
32. Hassan, F. A., Geiger, H., Schuecker, U., Waldrum, I., Vander, G. y Mabry T. J., Phytochemistry **14** (7) 1613-15 (1975).
33. Hodisan, V. y Mester, I. Rom. RD. 92,576 (Cl.A61K7/102) 30 Oct. 1987. appl. 119,700, 29 Jul 1985 3 pp. [A través de C.A. 108 226682; (1988)].
34. Hodisan, V. y Mester, I., Rom. RD. 93,807 (Cl.A61K35/78) 29 Feb. 1988 Appl. 122,887, 04 Apr. 1986. [A través de C. A. 109 413105 (1988)].
35. Hussong, G. P., Villagines, R. y Delaveau, P., Ann. Pharm. Fr. **44** (1) 41-8 (1986). [A través de C.A. 105 108128n (1986)].
36. Kabanova, E.U., Aleshina, Z. D. y Boyarskaya, M. M., USSR 191,060 (Cl.A61K) Jan 14, 1967Appl. Sept.16, 1965 [A través de C.A. 68 P24513z (1968)].
37. Kientzler, Z. y Pettinger, J., J. Bull. Soc. Lorraine Sci. **2** 34-8 (1962). [A través de C.A. 57 2590g (1962)].
38. Lapinet, E. G., Biosculpture Internacional Europe Pat. appl. E. p. 147,282 (Cl.A61K7/48) 03 Jul. 1985 Fr. Appl. 83,119,784, 09 Dec. 1983; 15 pp. [A través de C. A. 104 39518r (1986)].
39. Lopez, C. R., Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM México. 1989.
40. Ludwiczak, R. F. y Stachowiak, K., Rocznik: Chem **37** 575-9 (1963). [A través de C.A. 59 101169d (1963)].
41. Lukasiak, H., Zesz. Nauk. Uniw. Lodz Ser. Z. **47** 89-94 (1972). [A través de C.A. 77 137393q (1972)].
42. Liubartseva, L. A., Sokolova, V.E., Katesnikov, D.G., Shenger, V. T., USSR Jul, 324,669 (Cl.A6135/78) 23 Jul 1978 appl. 4,000,161 30 Dec. 1985 Otkrytiya Izobret **27** 15 (1987). [A través de C.A. 108 137888p (1988)].
43. Martinez, M., *Las Plantas Medicinales de México*, sexta Ediciones Botas, México D. F., 1989 456 p.

44. Markham, C. R. *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press INC Londres, 1982.
45. Mayer, C., Trueb, W., Wilson, J., y Eugster, C., Helv. Chim. Acta 51 (4) 661-8 (1968) [A través de C.A. 69 19346p (1968)].
46. Minimikawa, T. y Yoshida, S., Shokubustsugaku Zasshi 85 (988) 153-5 (1972). [A través de C.A. 77 149725n (1972)].
47. Mompon, B., Fr. Demande FR 2,610,523 (Cl.A61K35/78) 1989 Appl. B,711,445 1987 3 pp. [A través de C.A. 111 63922g (1989)].
48. Nakasawa, S. y Hanaya, K., Cytologia 49, (4) 883-7 (1984). [A través de C. A. 103 34894e (1985)].
49. Nekrasova, V. B., Kovalev, V. E., Koroleva, N.B., Komossarova, A. P., Zalenz, Y., Burylina, G. M., Rochdstuens K. G. S. y Mar'yndysheva, V.G. USSR Ju 1,152,590 (Cl.A61K7/06) 30 Apr. 1985 Appl. 3,486,393, 09 Jul 1982. From Otkrytiya Izobret (16) 13 (1985) [A través de C.A. 103 42400f (1985)].
50. OREAL, S. A. Belg. 888,941, (Cl.A61K) 30 Jun. 1981, Fr. Appl. 801093 04 Jan 1980; 18 pp. [A través de C. A. 95 103149w (1981)].
51. Orkiszewska, A., Lobarzewski, R. y Jedrzejewska, M., Pol. R. L. 119,889 (Cl.A61K35/78) 28 Feb. 1985; Appl. 200,030 02 Aug 1977; 3 pp. [A través de C.A. 103 166,188n (1985)].
52. Palacios, R. M., Comunicación personal, 1990.
53. Parihar, N. S., *An Introduction to Embryophyta*, Vol. 11 Indian university Alla Habad, 5a. Ed., India, 1965 331 p.
54. Phillipson, J. D. y Melville, C., J. Pharm and Pharmacol 12 506-8 (1960) [A través de C.A. 54 25573f (1960)].
55. Potapou, U. Y., Biokhimiya Osubennosti Rast Yakutii Akad. Nauk. SSSR 1964, 161-210 (1964) [A través de C. A. 62 12154a (1965)].
56. Rodriguez, L. V., Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM México. 1990.
57. Rojas, M. A., Tesis de Maestría Facultad de Química, UNAM México (1990)

58. Rudolph, A., Becker, R., Schdz, G., Prochazka, Z., Toman, J.; Macek, T. y Herovt, V., Biochem. Physiol. Pflanz. 180, (8) 557-63 (1985). [A través de C. A. 103 102083s (1985)].
59. Rullkoetter, J., Hernz, E. y Tulloch, A. P., Z. Pflanzen Physiol. 76, (2) 163-75 (1975). [A través de C.A. 83 175462t (1975)].
60. Sankar, N. R. y Wosley, J. W., Chemosphere 8, (3) 125-8 (1978). [A través de C.A. 91 44316r (1979)].
61. Saleh, N. A. M., Phytochemistry 14, (1) 286-7 (1975).
62. Saleh, N. A. M. y Abdalla, M. F. Phytochemistry 19, (5) 987 (1980).
63. Saleh, N. A. M., Majak, W. y Towers, G. H. N. Phytochemistry 11, (3) 1095-9 (1972).
64. Semenov, A. A., Syrchina, A. I., Gorenysheva, O. N., Biyushkin, U. N. y Malinovskii, T. I., Nat. Prod. 11th, 2, 374-8 (1978). [A través de C.A. 92 6297y (1980)].
65. Shriner, Fuson y Curton, Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos, Ed. Limusa, Mexico D. F., 1980.
66. Siegfried, B. y Hans, G., Phytochemistry 2, (3) 281-7 (1963).
67. Silverstein, Bassler y Meroill; Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos Ed. Diana, Mexico (1981)
68. Sommer, L., Farmacia (Bucharest) 1961, (9) 75-81 (1961). [A través de C.A. 55 21489i (1961)].
69. Sommer, L., Mintzer, L. y Rindasu, G. Farmacia (Bucharest) 1962, (10) 535-41 (1962). [A través de C.A. 13513b (1965)].
70. Stahl, E., Thin Layer Chromatography. Ed. Bolliger, H. R., Brenner, M. Gashirt, H. Berlin (1969).
71. Stahl, E. y Juell, G., Dtsch. Apoth. Ztg. 122, (39) 1951-7 (1982). [A través de C. A. 97 223041t (1982)].
72. Strzelecka, H., Dobrowolska, B. y Twardowska, K., Farm. Pol. 38, (7-8) 273-9 (1982). [A través de C.A. 98 50382u (1983)].

73. Syrchina, A. I. Gorenysheva, O. N. Semenov, A. A. Biyuskin U. N. y Malinsuski, T. I., Khim. Prir. Soedin 1978, (4) 508-15 (1978). [A través de C.A. 89 211930d (1978)].
74. Syrchina, A. I. Gorchkhov, V. G. Tyukaukina, N. A. Babkin, V. A. y Varonkov, M.G., Khim. Prir. Soedin. 1980, (3) 334-7 (1980). [A través de C. A. 93 128773] (1980)].
75. Syrchina, A. I. Varonkov, M. G. y Tyukaukina, N. A., Khim. Prir. Soedin. 1974, (6) 794-5 (1974). [A través de C. A. 82 108840f, (1975)].
76. Syrchina, A. I. Varonkov, M. G. y Tyukaukina, N. A., Khim. Prir. Soedin. 11, (3) 424-5 (1975). [a través de C. A. 84 235p, (1976)].
77. Syrchina, A. I., Varonkov, M. G., y Tyukaukina, N. A., Khim. Prir. Soedin. 11, (3) 416-17 (1975). [A través de C. A. 84 40719g (1976)].
78. Syrchina, A. I., Varonkov, M. G. y Tyukaukina, N. A., Khim. Prir. Soedin. 1978, (6) 803-4 (1978). [A través de C.A. 90 183187s (1979)].
79. Syrchina, A. I. Varonkov, M. G. y Tyukaukina, N. A., Khim. Prir. Soedin. 1978, (6) 807-8 (1978). [A través de C.A. 90 200280 (1979)].
80. Syrchina, A. I., Semenov, A. A., Tyukaukina, N. A., Vitkovskii, Y. y Varonkov, M. G. Khim. Prir. Soedin. 1981, (5) 658-9 (1981). [A través de C.A. 96 31671f (1982)].
81. Syrchina, A. I., Zapesochnaya, G. G., Tyukaukina, N. A. y Varonkov, M. G., Khim. Prir. Soedin. 1980, (3) 413-14 (1980). [A través de C. A. 93 164324 (1980)].
82. Szabason, A., Belg. 631,712, Aug. 16 1963 Appl. Apr. 30, 1963, 3pp. [A través de C. A. 60 P15688h (1964)].
83. Tarle, D., Stanic, G. y Detricic, J., Farm. Vesta (Ljubliana) 31, (4) 303-6 (1980). [A través de C. A. 95 3394d (1981)].
84. Tivazyan, A. A., Nemenko, A. A., Shashkina, V. G., y Shukman M. I., Otkrytiya Izobret 1987, (29) 16-17 (1987) (A través de C. A. 108 B1803n (1988)].

85. Vashist, V. N., Chaudhary, S. S. y Handa, K. L. Prod. Natl Acad. Sci. India 29A, 322 (1960). [A través de C. A. 56 715g (1962)].
86. Veda, N., Arakawa, S., Ando, M., Fukui, S., Shigemasa, Y. y Nakachima, R., Tottori Daigaku Kagakubu Kenkyu Hokoku 13, (1) 60-8 (1982). [A través de C.A. 99 3010h (1983)].
87. Viden, I. y Rezanek T., J. Chromatogr. 456, (2) 370-4 (1989).
88. Villano, G., Fr. Demande F. R. 2,571,616 (Cl.A61K7/48) 18 Apr. 1986 Appl. 84, 115,797, 11 Oct. 1989, 3 pp. [A través de C. A. 105 120519j (1986)].
89. Waelchli, P. C., Mukherjee-Muller, G. y Eugster, C. H. Helv. Chim. Acta 61, (2) 921-8 (1978). [A través de C. A. 89 43898d (1978)].