



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMICO DE
LAS HOJAS DE GEGROPIA OBTUSIFOLIA

TESIS

Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

RAMON MARCOS SOTO HERNANDEZ

342

MEXICO, D. F.

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA
PROC. Mt 308 323



QUIMICA

JURADO ATRIBUIDO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Dr. FRANCISCO GIRAL
VOCAL: Q.F.B. MA. LUISA GARCIA PADILLA
SECRETARIO: Dr. JORGE REYES LOPEZ
1er. SUPLENTE: Dra. OFELIA ESPEJO DE OCHOA
2o. SUPLENTE: Dra. CARMEN RIVERA DE REYES

SUSTENTANTE: RAMON MARCOS SOTO HERNANDEZ
ASESOR DEL TEMA: Dr. JORGE REYES L.

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN
EL LABORATORIO DE QUIMICA FAR
MACEUTICA Y PRODUCTOS NATURALES
DE LA DIVISION DE ESTUDIOS SU
PERIORES DE LA FACULTAD DE QUI
MICA DE LA UNAM. BAJO LA DIREC
CION DEL Dr. JORGE REYES L.

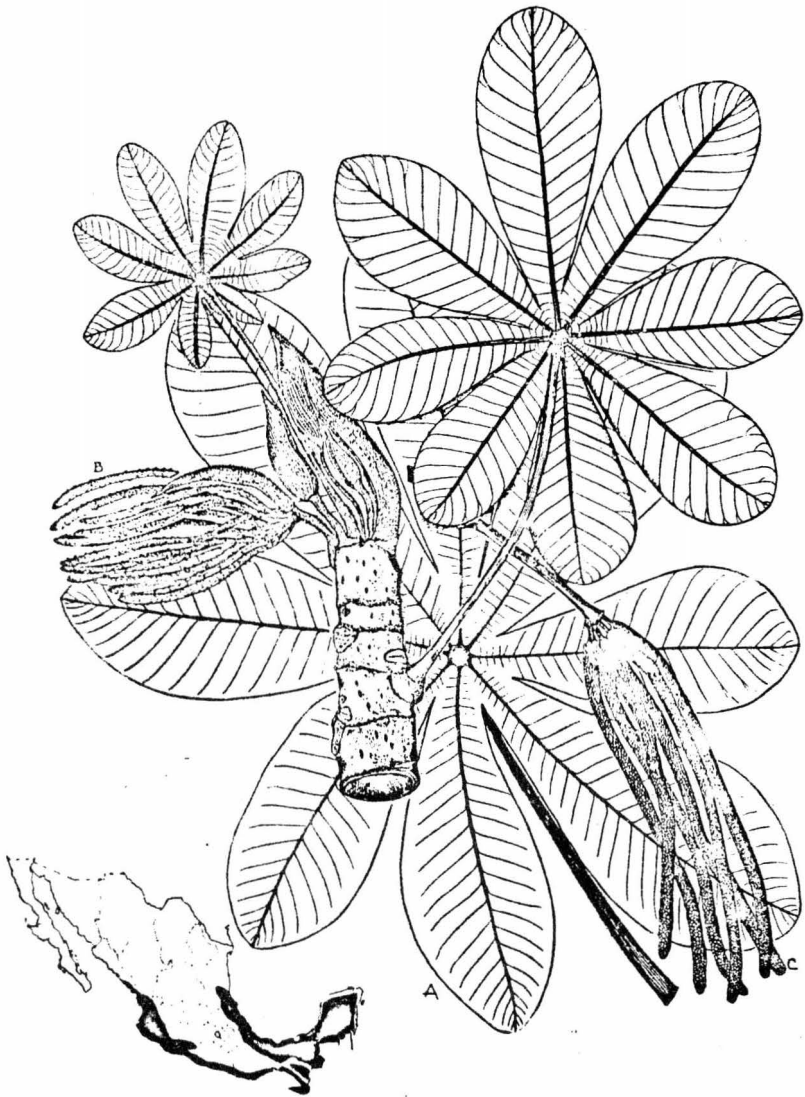
A MIS PADRES
CON ETERNO AGRADECIMIENTO

A MIS HERMANOS Y ABUELITA

AL Dr. JORGE REYES
CON ESTIMACION Y AGRADECIMIENTO
POR SU VALIDA ORIENTACION EN EL
DESARROLLO DE ESTA TESIS

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. PARTE TEORICA
3. PARTE EXPERIMENTAL
4. DISCUSION Y RESULTADOS
5. BIBLIOGRAFIA
6. CONCLUSIONES



Cecropia obtusifolia. A, hoja; B, rama con inflorescencia masculina; C, inflorescencia femenina. (x 1/2).

INTRODUCCION

Cecropia obtusifolia Bertol. (Cecropia mexicana Hemsl.). Es un árbol perteneciente a la familia de las Moráceas, particularmente abundante en los climas tropicales, se distingue a primera vista por sus enormes hojas lobuladas y por estar habitado su tallo por hormigas.

Ecología y Distribución.- Es una de las especies pioneras de vegetación secundaria más abundante y conspicua de las zonas tropicales, tiene una amplia área de distribución en México, desde Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo en la vertiente del Golfo y desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas en la del Pacífico. Se presenta en vegetación secundaria derivada de cualquier tipo de Selva, excepto Selva baja caducifolia y espionosa y en las zonas con precipitaciones pluviales marginales a las del clima hasta altitudes de 700 a 800 m sobre el nivel del mar. Se desarrolla por igual en suelos con impedimento de drenaje tanto de origen volcánico como calizo-sedimentario ó metamórfico. Tiene crecimiento rápido y puede alcanzar hasta 15 m de altura y de 50 a 60 cm de diámetro en 12 a 15 años.

Especies Afines.- En la costa del Pacífico, especialmente en Oaxaca y Chiapas se encuentra Cecropia peltata L., diferenciable únicamente por el tamaño notablemente menor de las espigas pistiladas y estaminadas (de 2 a 5 cm de largo). Standley P. (46) menciona además una Cecropia shiedeana K. en Papantla y otros lugares de Veracruz.

Nombres Comunes.- Guarumo (Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Chiapas)- Chancarro (Veracruz y Oaxaca); Hormiguillo (Veracruz, Tabasco y Oaxaca); Koochlé (Yucatán); Trompetillo (San Luis Potosí, Hidalgo y Veracruz); Chupacté (Tzetal, zona lacandona de Chiapas).

Morfología.- Es un árbol monopódico con el tronco hueco, copa irregular estratificada con pocas ramas gruesas saliendo horizontalmente del tronco. La corteza externa es lisa, gris-verdosa y marcada con escaras que dejan las hojas al caer; la corteza inter

-na es de color crema a crema claro, cambiando a crema oscuro, fibrosa y con un exudado que se vuelve negro al contacto con el aire. Las hojas tienen un largo peciolo y el limbo es áspero y profundamente lobulado, frecuentemente de color blanquecino en la cara inferior. Las flores masculinas se producen en una planta y las femeninas en otra, formando espigas protegidas por una bráctea. El fruto contiene una sola semilla. Las ramas jóvenes son pardo-verdosas muy gruesas con lenticelas morenas muy notables y cicatrices anulares de estípulas caídas, huecas y tabicadas que aloja a numerosas hormigas (género *Azteca*) y cubiertas por pelos cortos y rígidos. En la base del peciolo hay un ensanchamiento piramidal de textura acojinada y que contiene corpúsculos de sustancia protéica (Corpúsculos de Müller), se cree que estos corpúsculos sirven de alimento a las hormigas (43) La madera es blanquizca, suave y ligera, de fibras largas con un contenido de 53.6% de celulosa, muy útil en la fabricación de papel.

En la medicina popular se ha atribuido a *Cecropia obtusifolia* (hojas, corteza y raíz principalmente) las más diversas actividades terapéuticas. Así se dice que la corteza es astringente, que la raíz se usa como emenagogo, mientras que las hojas se han empleado en infecciones pulmonares agudas, como un antiasmático y como un sedativo en condiciones nerviosas como la corea (14). Grosourdy (14) describe que usando una cocción de las hojas como sedante, se produce un estado de depresión, relajamiento muscular y particularmente una disminución del ritmo cardíaco, así también se observa un notable efecto diurético. Se ha informado (11) que la infusión de 15 a 30 g de hojas por litro de agua no es tóxica a cobayos cuando se inyecta por vía subcutánea, se encontró que las preparaciones tienen un efecto diurético y laxante sobre los cobayos, así como una ligera somnolencia; In vitro estas infusiones no tienen efecto inhibitorio sobre las bacterias del tracto respiratorio.

Experimentando sobre el extracto acuoso de las hojas de *Cecropia obtusifolia* se ha encontrado un principio tóxico débil que puede administrarse clínicamente en cantidades regulares (23).

Su acción principal es sobre el corazón. Esta acción a dosis no-tóxicas determina un aumento considerable de la amplitud de las contracciones cardíacas, mientras que mayores dosis se observa una lentitud progresiva de las mismas siguiendo síncope del corazón hasta de tres cuartos de hora sin que sobrevenga la parálisis completa de este órgano. Por tanto, el principio activo de Cecropia obtusifolia aumenta notablemente la energía de la contracción ventricular, siendo esta una excelente condición para sus aplicaciones terapéuticas. Se ha notado también que dicho extracto actúa muy bien sobre el riñón, con propiedades diuréticas muy apreciables y aumentando la secreción urinaria hasta el triple, que puede llegar hasta 3, 500 g y más por día, normalizándose la respiración ansiosa en las diversas formas de la hidropesía y moderando y regulando las pulsaciones cardíacas.

En otros ensayos farmacológicos (17) se ha podido confirmar que las propiedades terapéuticas atribuidas a las hojas de C. obtusifolia concuerdan con los resultados, y aún se creó que debido a las ventajas que presenta puede sustituir a Digitalis purpurea como cardiotónico y diurético.

El interés que nos movió para realizar este trabajo, fue el de efectuar el estudio químico de esta planta, teniendo como principal objetivo el tratar de aislar, purificar e identificar el principio activo al que se atribuye una notable actividad cardiotónica.

El material para estudio nos fue proporcionado a través del Instituto de Biología de la UNAM, y venía procedente de la región de los Tuxtlas Veracruz.

Un examen de la literatura reveló que se han hecho pocas investigaciones químicas de Cecropia y en particular de la especie en estudio. Según Peckolt (29) la corteza fresca de Cecropia adnopus contiene cecropina, ácido resinoso, clorofila, azúcares, etc. La cecropina es un alcaloide que cristaliza en agujas incolores, soluble en agua, alcohol, éter, benceno, cloroformo e insoluble en éter de petróleo. Según Choav (5), la cecropina se encuentra combinada con el ácido cecroalánico, tal como ocurre en

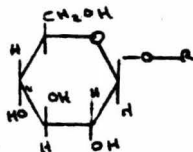
-re la cafeína con el ácido colatánico de la nuez de cola. El ácido cecronitánico es un líquido soluble en álcalis y tiene un sabor amargo (aún no se conocen las estructuras de estas sustancias).

El extracto acuoso de las hojas de varias especies de *Cecropia* contiene embeína, taninos, ceras, grasas, clorofila, etc. La embeína pertenece al grupo de las saponinas, es soluble en agua destilada y en alcohol absoluto e insoluble en éter y cloroformo: por hidrólisis produce glucosa y ácido embéico de un color rojo rubí. A pesar de ser una saponina, la embeína carece del efecto más común de estas sustancias, el cual es el de provocar la citólisis de los glóbulos rojos. Algunos investigadores (20, 58) creen haber aislado esta sustancia y que tiene propiedades farmacodinámicas bien marcadas, pero no dan a conocer su naturaleza química limitándose a exponer que dicho principio no es alcaloide, que posee función básica y que con el ácido sulfúrico precipita en aguijas incoloras. El Dr. Langon (23) supone en base a sus estudios realizados, que la embeína es el principio activo del extracto acuoso de las hojas de *Cecropia* que tiene la actividad cardiotónica.

En otros ensayos químicos, King y Haddock (20) estudiando las hojas de *C. peltata* L. pudieron aislar dos sustancias de naturaleza glucosídica, una amorfa de $mf = 214-215^{\circ}$ y otra cristalina cuyas características no indican. El informe de Nogueira y Correia (28) indica haber encontrado en las hojas de *C. peltata* una considerable cantidad de compuestos esteroidales; en el extracto obtenido con éter de petróleo ellos aislaron una sustancia cristalina de $mf = 50-55^{\circ}$ que presenta las características de un aldehído; en el extracto benzénico aislaron un compuesto que identifican como ácido ursólico, también llegan a aislar sustancias flavonoides tanto libres como combinadas con glucósidos.

PARTE TEORICA

Glucósidos.- Los glucósidos son derivados de las formas cíclicas de los azúcares en los que el grupo aldehído potencial o grupo reductor del azúcar es substituido por un grupo hemiacetal resultante de la condensación de aquel con un alcohol ó fenol.

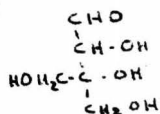


Los glucósidos se encuentran en bajas concentraciones en todas las plantas, especialmente en raíces, frutos, hojas y corteza. Muchos pigmentos de las plantas responsables del color de flores y frutos son glucósidos. La cantidad de glucósidos varía en diferentes especies de la misma planta y de acuerdo a la estación y condiciones climáticas, también varía con el sexo de la planta.- Generalmente los glucósidos son compuestos neutros, cristalinos e incoloros y que muestran actividad óptica. Con una o dos raras excepciones, como en el α -etil-galactósido del lupino, todos tienen configuración β . Usualmente son solubles en agua, alcohol o acetona e insolubles o poco solubles en éter. Los primeros disolventes se usan en su extracción. Como los glucósidos se encuentran en la planta junto con sus enzimas capaces de efectar su hidrólisis, estas enzimas se inactivan primero, para lograr este resultado la planta se extrae en caliente con agua o alcohol.

Como los glucósidos se hidrolizan fácilmente con los ácidos, se deben evitar las condiciones ácidas durante la extracción, es costumbre añadir carbonato de calcio durante la extracción para asegurar condiciones neutras. Cuando el extracto contiene proteínas u otros constituyentes no glucosídicos, se debe clarificar con la adición de acetato de plomo, con la subsecuente eliminación del plomo del filtrado por la adición de ácido sulfhídrico (el acetato de plomo no suele usarse para clarificar extractos de glucósidos flavonoides ya que son precipitados con este reac-

-tivo). El extracto neutro clarificado se concentra a vacío y de este concentrado se puede separar el glucósido en forma cristalina. Productos de hidrólisis de los glucósidos.- Los glucósidos se hidrolizan por el calentamiento con ácidos minerales diluidos ó por la acción de sus enzimas para dar un azúcar y un residuo orgánico llamado aglucón.

El componente de azúcar.- Las pentosas comunmente encontradas en los glucósidos son: D y L-arabinosa, D-xilosa y D-ribose. La ocurrencia de D-arabinosa en la naturaleza es rara, la barbaloina del álce de Barbados y la saponina del *Sapindus* parecen ser las únicas fuentes auténticas de D-arabinosa en los glucósidos de las plantas. La apiina, un glucósido de las semillas de perejil contiene una pentosa no usual, la epiosa, que tiene una cadena ramificada.



Apiosa

Mientras que la hexosa más frecuentemente encontrada en los glucósidos es la D-glucosa, también se han aislado las hexosas D- y L-galactosa, D-manosa y D-fructosa. Se ha informado que la pentosa L-rhannosa (ó-desoxi-hexosa) y la D-fucosa se encuentran frecuentemente en la jalapina y turpetina. Los glucósidos cardíacos, en la hidrólisis además de los azúcares D-glucosa y L-rhannosa, dan ciertos desoxiazúcares que no se encuentran en otra parte de la naturaleza. En la hidrólisis de los ácidos nucleicos de la levadura se obtiene D-ribose, mientras que en la hidrólisis enzimática de los ácidos nucleicos del timo se obtiene 2-desoxi-D-ribose. Los ácidos urónicos son constituyentes raros de los glucósidos, la baicalina y scutellarina, glucósidos flavonoides contienen ácido D-glucurónico; también está presente en la saponina escrina aislada de las semillas del castaño, en las saponinas de la corteza de Quillaia saponaria, en el muerdago

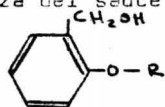
Cuando dos moléculas de carbohidrato se encuentran en el mismo glucósido, frecuentemente están como un disacárido, como en la gentibiosa (6-β-D-glucósido-D-glucosa) en la amidalina y cronina; la vicianosa (6-β-L-arabinósido-D-glucosa) en la vicianina, violutina y geina; la primeverosa (6-β-D-xilósido-D-glucosa) en la primeverina, orimulaverina y monotropitina; la rutinosa (6-β-L-rhamnósido-D-glucosa) en la rutina y detiscina.

Los glucósidos también contienen trisacáridos, hay evidencia de la estructura de un trisacárido (glucosa-rhamnosa-galactosa) en los alcaloides del Solanum.

La forma cíclica del azúcar generalmente es piranosa, con la excepción de la ribofurano y desoxi-ribofuranosa en los nucleósidos. En los glucósidos cardiacos aún no se ha establecido la estructura anular de los 2-desoxiazúcares, pero probablemente si son cíclicos pertenecen a la forma piranosa; los 2-desoxiazúcares exhiben mutarrotación pero dan positiva la prueba de Schiff.

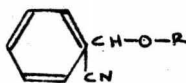
El componente aglucón.- El componente aglucón muestra gran diversidad y puede pertenecer a la siguiente clase de compuestos:

(a) Alcohol o fenol, como en la salicina (β-glucósido del alcohol salicílico) de la corteza del sauce.



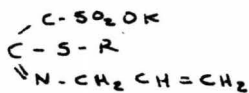
Salicina
(R = Residuo Glucosa)

(b) Nitrilo, como en la prunesina (glucósido del L-mendelonitrilo) en la corteza de las cerezas silvestres.



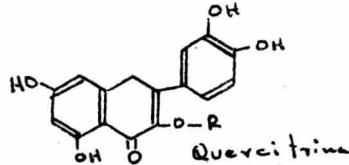
Prunesina

(c) Isotiocianato, como en la sinigrina, de las semillas de la mostaza negra.

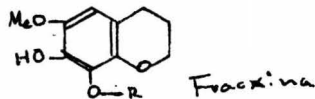


Sinigrina

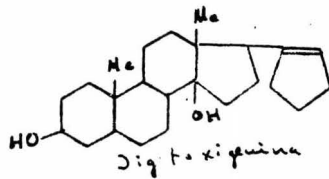
(d) Cromona (benzopirona), como en las bases de muchos pigmentos de plantas como la quercitrina (glucósido flavonol del Quercus - discolor). Las flavonas, isoflavón-flavonoles, flavanonas y los glucósidos de chalconas y antocianinas son derivados de la cromona.



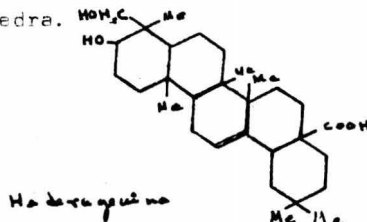
(e) Derivados de la comarina, constituyen un pequeño grupo de glucósidos, como la fraxina.



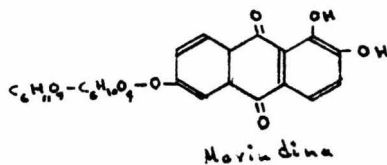
(f) Núcleo esteroidal, encontrado en ciertas saponinas, glucósidos cardíacos y alcaloides del Solanum.



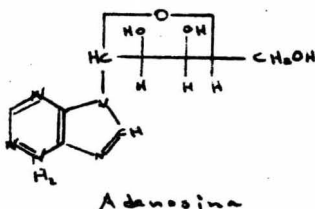
(g) De tipo triterpénico, como la hederagenina presente en las hederinas de la hiedra.



(h) Hidroxi-antraquinonas, como la morindina, aislada en varias especies de Morindus y Coprosma australis



(i) Las bases púricas y pirimídicas están presentes como N-glucósidos, como la adenosina de la levadura ó los ácidos nucleicos - del timo.



Funciones de los glucósidos.- Se han sugerido una variedad de funciones de los glucósidos en las plantas. Pueden servir como - (a) reserva de azúcares, (b) como productos de desecho del metabolismo vegetal, (c) como un medio de desintoxicación, (d) para regular la ósmosis ó (e) para estabilizar sustancias lábiles y - regular el suplemento de sustancias de importancia en el metabolismo.

Se ha sugerido que los glucósidos tienen un papel de defensa contra la invasión de los tejidos por los microorganismos subsecuente a una herida. Se ha señalado que muchos aglucones son anti-sépticos, como en el almendro cuando se hiere la semilla se hidroliza amígdalina y se libera ácido cianhídrico que previene toda acción bacteriana. Miller (27) ha postulado la teoría de que la formación de glucósidos en las plantas es un mecanismo de desintoxicación similar a la formación de glucurónidos en animales. Sen (41) ha mostrado que los pigmentos de antocianina influyen en la velocidad de fotosíntesis en las hojas de *Eranthemum off*, - aún con un bajo contenido en clorofila.

Efectos Fisiológicos.- Muchos glucósidos son fisiológicamente activos. Es bien conocido el efecto fisiológico de los glucósidos cardiacos, cuyas principales fuentes son las Apocinaceas y Escrophulareaceas. La administración de estos glucósidos, como la digitalina en dosis cuidadosamente reguladas en personas con función cardiaca dañada, conduce a un decremento en la velocidad y a un fortalecimiento de la contracción cardiaca. La sobredosis - puede ser fatal: los glucósidos cardiacos y las saponinas esteroi

-dadas son usados en Africa y Malaya como venenos de flechas.

Determinación de la Estructura de los glucósidos.

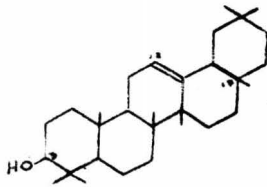
(a) Métodos químicos.- La hidrólisis del glucósido conduce a la identificación del azúcar y del aglucón, la naturaleza del anillo (piranosos o furanosos) en el azúcar y el modo de unión, se determina por metilación e hidrólisis del glucósido metilado; la estructura deducida de los productos de degradación se confirma por síntesis.

(b) Métodos bioquímicos.- El método biológico de Meulen (25) se basa en el hecho de que la hidrólisis enzimática es un proceso reversible y en la especificidad de las enzimas. Se investigó la velocidad de hidrólisis de un glucósido por una enzima apropiada en presencia de algunos azúcares simples, sólo uno de éstos azúcares retardó el cambio, los demás no cambiaron y se concluyó que el glucósido examinado era un derivado del azúcar que retardó la hidrólisis.

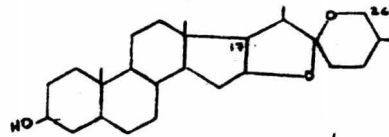
Saponinas.- Las saponinas son compuestos glucosídicos que se encuentran abundantemente en el reino vegetal. Su nombre deriva de su capacidad para formar espuma con el agua al agitarse el recipiente que las contiene. Cuando se ingieren oralmente son poco tóxicas, pero cuando se inyectan por vía intravenosa ejercen un poderoso efecto hemolítico, destruyendo los glóbulos rojos aún a extremas diluciones; tienen un sabor amargo e irritan la membrana mucosa. En las formas inferiores de vida, las saponinas son venenosas y se han usado para matar peces como un primitivo método de pesca.

Siendo sustancias de naturaleza glucosídica, las saponinas se componen de una sustancia principal (genina o saponina) y un componente variable de azúcar. Las saponinas se han clasificado (26) en tres grupos de acuerdo a la estructura de su genina:

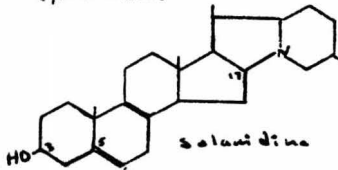
1. Saponinas triterpenoides
2. Saponinas esteroidales
3. Alcaloides esteroidales



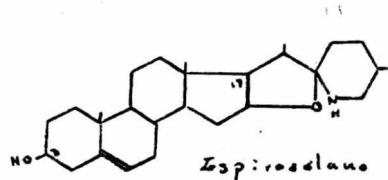
Tipo Triterpeno
(β -amirins)



Tipo Espirostano



salandina



Espirostano

Tipo Alcaloides Tetraterpénicos

Mientras que las saponinas del tipo espirostanol se han encontrado predominantemente en monocotiledóneas especialmente en los géneros *Smilax* y *Yucca* (familia Liliaceae), *Dioscorea* (familia Dioscoraceae), y *Acave* (familia Amaryllidaceae), las saponinas triterpenoides se encuentran principalmente en las dicotiledóneas (15, 55). Las saponinas de tipo alcaloide dominan en el género *Solanum* (familia Solanaceae).

El uso de las saponinas en medicina se ha diversificado ampliamente, mientras que en la Edad Media éstas drogas eran altamente valiosas en el tratamiento de la tos, gota y sífilis, hoy en día encuentran aplicación principalmente como expectorantes y diuréticos. En la actualidad se ha observado una variedad de efectos específicos de las saponinas, así, la actividad antiexudativa de las saponinas en las semillas de *Aescolum hippocastanum* L. y *Thea sinensis* (52), y del ácido glicyrrhizico de *Glycyrrhiza glabra* (7) se ha establecido. A las saponinas de *Panax ginseng* C.A. Mev. y de *Arelie manshurica* Rupt. y Max, se les atribuye una actividad tónica (22). Las saponinas de *Centelle asiatica* L. poseen actividad antileprosa (19); ahora se está investigando intensamente la actividad antibiótica de las saponinas, especialmente su inhibición a hongos patógenos, bacterias y virus (42), así como su

-de la aplicación en la inhibición de tumores (56). Las saponinas esteroideas sirven particularmente como valiosa materia prima en la síntesis de hormonas esteroideas.

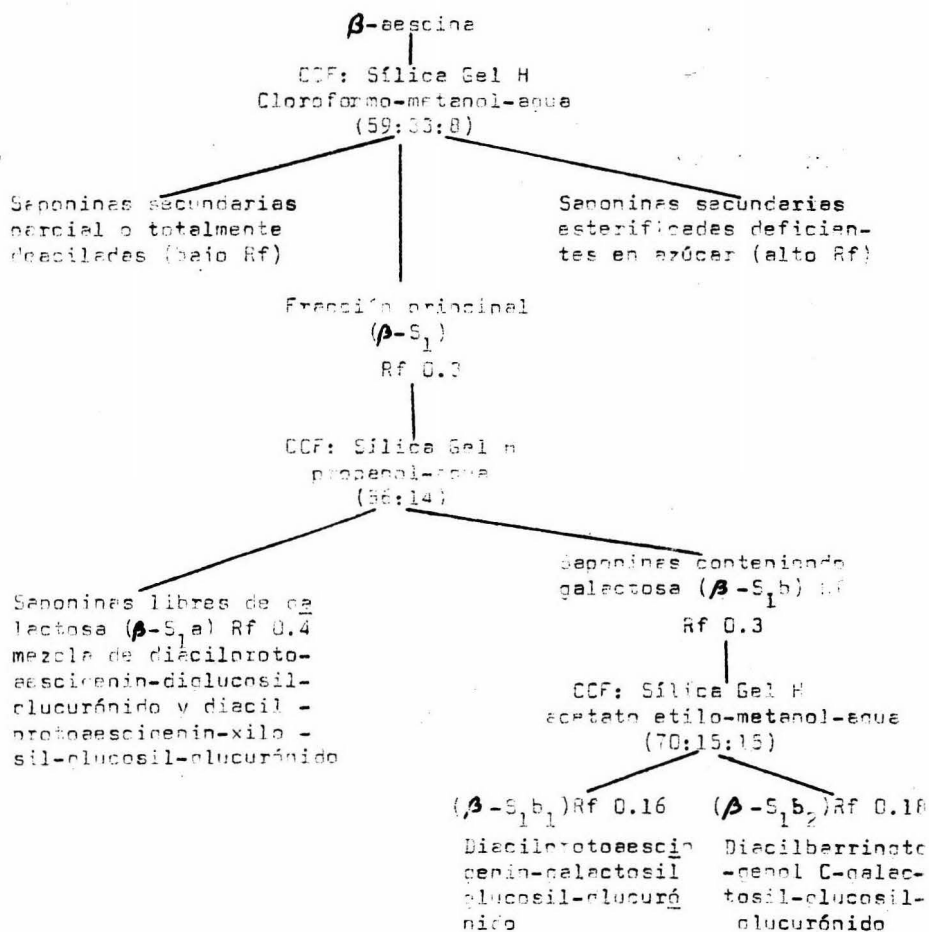
Métodos de Aislamiento y Purificación.- En general las saponinas sólo se encuentran en las plantas con mezclas muy complejas y debido a sus propiedades físicas es extremadamente difícil poder dilucidar su estructura. Las saponinas se aislan por extracción con un disolvente apropiado, generalmente el metanol diluido es el disolvente usado; ocasionalmente se añade una pequeña cantidad de piridina para evitar alteraciones de las saponinas debido a los componentes ácidos que pueden estar presentes. Los alcaloides esteroideas se extraen fácilmente con disolventes débilmente ácidos. La purificación preliminar se hace principalmente por precipitación del extracto concentrado, y si es necesario por la adición de un disolvente en el cual las saponinas sean insolubles ó extrayendo la capa acuosa previamente acidificada a pH 2-3 con disolventes orgánicos.

Actualmente se han usado una gran variedad de adsorbentes para aislar y purificar algunas saponinas en condiciones particularmente suaves (4, 16 y 57); recientemente se han usado adsorbentes como las poliamidas y el óxido de magnesio para separar saponinas de taninos (40).

Separación de las saponinas por métodos cromatográficos.- Generalmente la separación cromatográfica de las saponinas es muy difícil debido a su compleja naturaleza, por consiguiente, sólo la combinación de los más variados métodos cromatográficos puede conducir al resultado deseado. Especialmente en el caso de complejos éster-saponina se ha logrado una separación satisfactoria de los componentes aislados. Wanner J. (53, 54) ha logrado una separación limitada de la aescina en fracciones aisladas, pero cada una de las cuales es una mezcla compleja. Su técnica se ilustra en el siguiente esquema, que podría servir como una guía de la

-cantidad de trabajo investigado con tales métodos (Esquema #1)

Esquema # 1



Detección.- Los reactivos de detección más generalmente aplicados para todos los tipos de saponinas y sapogeninas son los reactivos de Carr-Price, Liebermann-Burchardt, Selkowsky y sulfato cérico. Generalmente los compuestos con diferente estructura de genina dan manchas de diferente color con estos reactivos. Las saponinas hemolíticas se detectan fácilmente con gelatina-sangre. Los alcaloides esteroidales dan pruebas de color específicas con solución de yodo, reactivo de Dragendorff y ácido fosfomolibdico. El reactivo de Carr-Price también distingue entre β -hidroxiespirostanoles Δ^5 -insaturados y α -saturados. Los β -hidroxicompuestos Δ^5 -insaturados son de color rojo a 20°C y rojo violeta después de calentar a 105°C, mientras que los compuestos 5- α -saturados permanecen de color rojo grisáceo a 105°C (2); los mismos compuestos se diferencian mejor con paraformaldehído-ácido fosfórico (6) ó con formaldehído-ácido sulfúrico (1); sólo los compuestos Δ^5 -insaturados reaccionan con estos reactivos (39).

Componentes de carbohidrato de las saponinas e identificación de monosacáridos.- En las saponinas se han encontrado los siguientes azúcares y ácidos urónicos: D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, L-rhamnosa, L-fucosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico. En contraste a los numerosos glicósidos cardiacos, las saponinas no contienen monosacáridos raros. Son variados el tipo y número de azúcares presentes en las saponinas, en forma piranosa ó furanosa; pueden estar unidos en cadena simples (mucenina y asiaticósido) ó ramificadas (gypsodido, cyclamina, aralosidos A, B y C). Frecuentemente el monosacárido terminal: es una pentosa; las saponinas también se nombran como mono-, di-, tri-, y tetra ósidos de acuerdo al número de residuos de sacáridos presente. Los ósidos conteniendo como mínimo de 4 a 5 residuos de sacáridos se llaman oligósidos (21). Los aralosidos A, B y C y gypsódido son típicos representantes de estos últimos.

Usualmente el azúcar esta unido a la genina por un enlace glucosídico o por un enlace C-acilglucosídico. Las saponinas con

teniendo una sola cadena de azúcar se llaman monodesmósidos y aquellas que contienen dos cadenas se llaman bidesmósidos (56). En todas las saponinas la unión se hace generalmente a través del grupo hidroxilo en C_3 , adicionalmente a través del grupo carboxilo en C_{17} en las saponinas triterpénicas bidesmosídicas y a través del grupo hidroxilo en C_{26} en las saponinas esteroidales bidesmosídicas.

Para identificar los azúcares generalmente las saponinas se rompen con hidrólisis ácida, usando ácidos a diferentes diluciones (57). Las soluciones hidrolizadas se observan por cromatografía, sin embargo es preferible neutralizar el hidrolizado antes de someterlo a dicho proceso. Para dilucidar la composición no solo del azúcar sino también de la genina es recomendable usar condiciones suaves para efectuar la ruptura, ya que se pueden formar productos secundarios durante el proceso de hidrólisis (58). La hidrólisis enzimática proporciona estas condiciones, generalmente se usan β -glucosidasa (emulsina de almendros) y β -glucuronidasa (de *Helix pomatia*).

Para detectar los azúcares generalmente se han usado los siguientes reactivos: ftalato de anilina, naftoresorcinol, ácido fosfórico, anilina difenilamina-ácido fosfórico y anisaldehído ácido sulfúrico.

A pesar de los numerosos métodos de cromatografía en capa fina que existen (16,37) para separar e identificar los azúcares presentes en las saponinas, se obtienen mejores resultados aplicando la cromatografía en papel (3,4,26,39).

Glucósidos cardiacos:- Los glucósidos cardiacos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores. La fuente más conocida de estos glucósidos es el género *Digitalis* del orden Scrophulariaceae, también se encuentran distribuidos en los ordenes Apocynaceae, Asplenidaceae, Moraceae, Ranunculaceae y Liliaceae.

De los 600 a 800 glucósidos cardiacos y geninas que se conocen en la actualidad, se han aislado más del 95% en los últimos 20 años debido a la introducción de los métodos cromatográficos (33).

Como la acción cardiotónica individual de los glucósidos cardiacos es similar, por lo general solo 10 de ellos se usan, ya que hay unida-

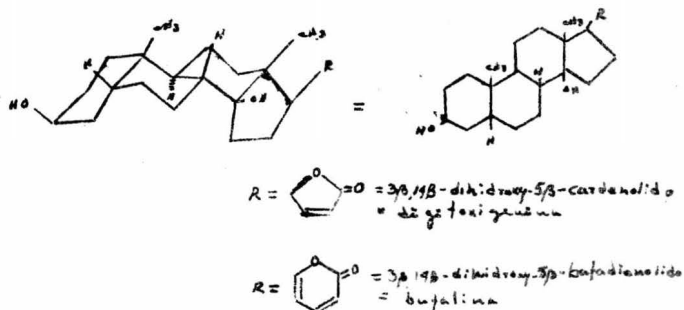
mente pequeñas diferencias en aspectos de resonancia, dosis, rapidez y duración de la digitalización, etc. Como la digitoxina, lanatosído A, acetil digitoxina- α , digoxina, lanatosído C, gitoxina de las hojas de Digitalis purpurea y D. lanata; convallatoxina y convallatoxol de las hojas de Convallaria majalis; K-estrofantina- β y K-estrofantósido de las semillas de S. kombe; oubeina de las semillas de S. pratense y escillareno A del bulbo de Scilla maritima.

Los aglucones de los glucósidos cardíacos, siendo química y biogenéticamente relacionados a las hormonas esteroidales, se distinguen de ellas por las siguientes características:

- Un anillo de lactona penta (cardenólido) ó hexa (bufadienólido) insaturado en la posición 17- β
- Un grupo oxhidrilo en la posición 14- β
- Una configuración cis-anti-trans-syn-cis del sistema ciclopentano perhidro-fenantreno.

El cardenólido más simple que reúne estas características estructurales es la digitoxigenina, que al mismo tiempo que es uno de los productos farmacéuticos de uso médico más común es también una de las genninas más importantes. Todos los demás aglucones de este tipo se pueden considerar estructuralmente derivados de ellos por cambios configuracionales y en los sustituyentes.

Los glucósidos cardíacos se caracterizan además por la estructura de la cadena de carbohidrato unido a su grupo oxhidrilo en la posición 3- β . En casi todos los casos están compuestos de azúcares encontrados en otra parte de la naturaleza, tales como antiarosa, digitalosa, theveltoza, D-allometilosa; L-talometilosa, cymarosa, digitinosa, oleandrosa, digitoxosa, y sarmentosa,



PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones sin corrección de temperatura.

Los espectros de ultravioleta se determinaron en la División de Estudios Superiores de esta facultad, en un aparato Perkin-Elmer 302, en las condiciones que el aparato indica.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en la División de Estudios Superiores de esta facultad, en un aparato Perkin-Elmer 337 en las condiciones que el espectro indica

Los espectros de resonancia magnética nuclear, se determinaron en la División de Estudios Superiores de esta facultad, en un aparato Varian EM- 36D, los valores se reportan en partes por millón (ppm) usando tetrametil silano como referencia.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas de alta resolución Hitachi-Perkin-Elmer RMV-6D.

1. Extracción

Materia Prima: hojas secas de Cecropia obtusifolia

Se procedió a extraer sucesivamente en un aparato Soxhlet 150 g de hojas de la planta en estudio con cada uno de los disolventes que se mencionan, hasta agotar el material soluble en cada disolvente; una vez concentrados los extractos se obtuvo el siguiente rendimiento:

Extracto en hexano (HSH)	0.13%
Extracto en cloroformo (HSCl).....	0.77%
Extracto en metanol (HSM)	1.4%

Se observó que en el extracto hexánico se depositaba un polvo amorfo blanquecino (HSH_1) que dió un $\text{pf} = 75^\circ\text{C}$.

Como se notaba la presencia de clorofila en estos extractos, se trató de separarla de ellos por medio de columnas de filtración y extracción. Se montaron columnas de filtración para los extractos hexánico y clorofórmico, y cada una se eluyó primero con benceno, el cual separó dos sustancias ($\text{HSH}_7\text{-B}$ y $\text{HSCl}_7\text{-B}$) y después se eluyeron con acetato de etilo el cual separó a la clorofila. La clorofila del extracto metanólico se separó extrayendo con acetato de etilo. En el esquema # 2 se resume el proceso.

2. Aislamiento

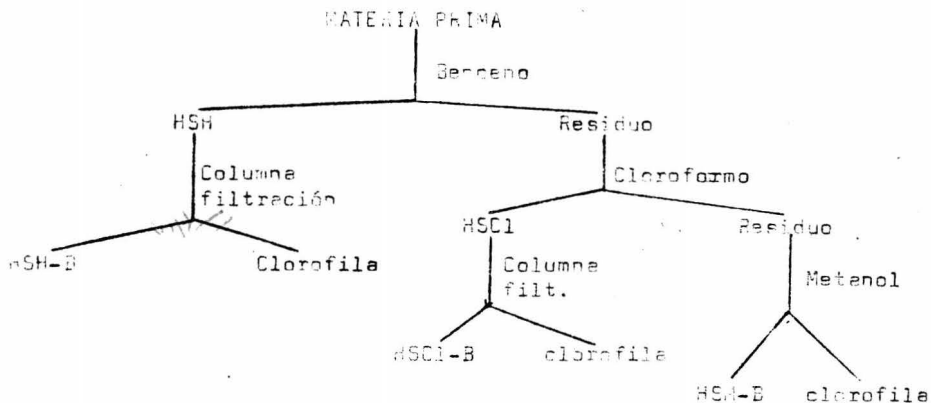
El fraccionamiento de los extractos se hizo por cromatografía en columna y cromatografía en capa fina.

En el extracto hexánico se lograron aislar 7 fracciones principales. Usando el sistema hexano-éter isopropílico 7:3

En el extracto clorofórmico se aislaron 6 fracciones principales, usando el sistema hexano-éter isopropílico 9,5:0.5

En el extracto metanólico el aislamiento se hizo extrayendo con varios disolventes, lográndose aislar 5 fracciones principales. En el esquema # 3 se resume este proceso.

Esquema # 2



Reacciones de Identificación.

Con las fracciones aisladas del extracto metanólico se efectuaron algunas reacciones de identificación, debido a que en este extracto se esperaba encontrar los compuestos más interesantes (glucósidos cardíacos, saponinas triterpénicas, etc.)

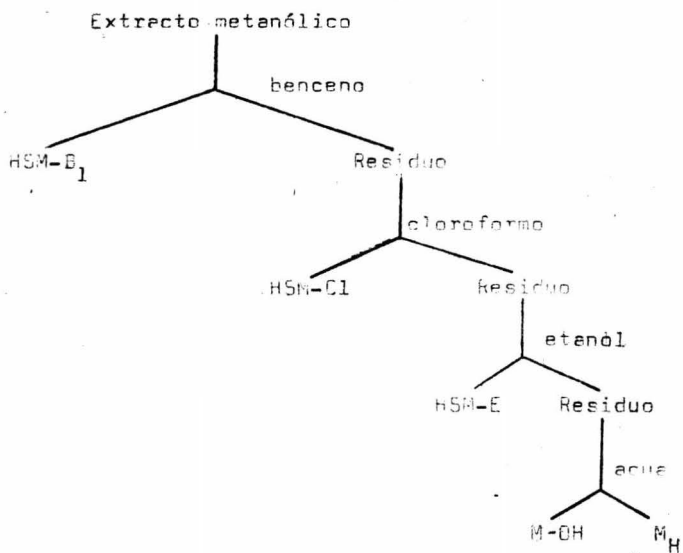
(a) Reacción de Rosenthaler (9). Para la identificación de saponinas triterpenoides. Esta reacción consiste en disolver de 2 a 3 mg de muestra por analizar en 2 a 3 gotas de vainillina en alcohol al 1%, se mezcla bien y se adicionan unas gotas de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico conc., se mezcla homogéneamente y se observa la reacción; en caso positivo aparece una coloración violeta.

(b) Reacción de Legal (24). Para la identificación de glucósidos cardíacos. En esta reacción la muestra por probar se disuelve en unas gotas de piridina, se adiciona después unas gotas de nitroprusiato de sodio al 5% y finalmente se adiciona unas gotas de hidróxido de sodio 2N, se mezcla homogéneamente y se deja reposar unos segundos, en caso positivo aparece una coloración que va de naranja a rojo.

Esquema # 3

Extracto hexánico
 |
 cromatografía
 columna
 hexano-éter isopropílico
 (7:3)
 |
 Siete fracciones
 principales

Extracto clorofórmico
 |
 cromatografía
 columna
 hexano-éter isopropílico
 (9.5:0.5)
 |
 Seis fracciones
 principales



(c) Reacción de Molish (45) Para la identificación de azúcares. Esta reacción consiste en disolver unos mg de muestra en 0.5 ml de α -naftol en etanol al 1%, se adiciona 1 ml de ácido sulfúrico conc., en caso positivo aparece un anillo de color violeta en la interfase.

Los resultados obtenidos en las reacciones ensayadas se muestran en el cuadro # 1.

Cuadro # 1

Fracción	Rosenthaler	Legal	Molish
HSM-a	violeta	amarillo	-
HSM-C1	"	"	-
HSM-E	"	"	-
HSM-DH	"	"	-
HSM-H	-	-	violeta

Por cromatografía en capa fina se encontró que cada una de estas fracciones correspondía a una mezcla muy compleja y difícil de separar por este método. Por lo cual se pensó en hidrolizar algunas de estas fracciones, una vez hidrolizadas ver si era más fácil separarlas. En la literatura se encontraron varias técnicas de hidrólisis (9) apropiadas para la planta en estudio, se efectuaron 3 métodos de hidrólisis diferentes con algunas de las fracciones descritas, obteniéndose en los 3 casos resultados semejantes:

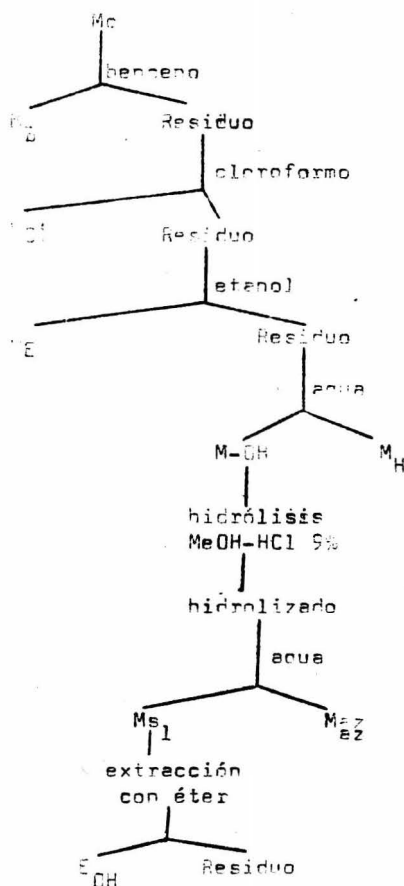
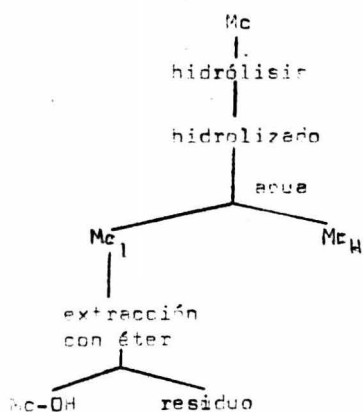
(a) Hidrólisis con Metanol-Acido clorhídrico al 9%. En este método la muestra se disuelve en una solución de metanol-HCl al 9% y se hierve a reflujo por dos hrs., se deja enfriar, y se adiciona agua destilada y se deja reposar por unas horas. En este punto se observó que precipitaba un polvo amorfo de color café-rojizo (Fracción Hs). Según la técnica esta fracción se extrae con varias porciones de éter etílico. el extracto etéreo se lava con solución al 5% de bicarbonato de sodio, se decolora con carbón ac-

ativado y se evapora el disolvente, obteniéndose en este caso un polvo de color blanco amorfo.

Esta técnica de hidrólisis se efectuó con las fracciones M-OH y Mc (extracto crudo); con la fracción M-OH se efectuó un tratamiento previo a este proceso, el cual consistía en extraer el extracto crudo con varias porciones de benceno, cloroformo, etanol y agua destilada.

Este proceso se resume en el esquema # 4

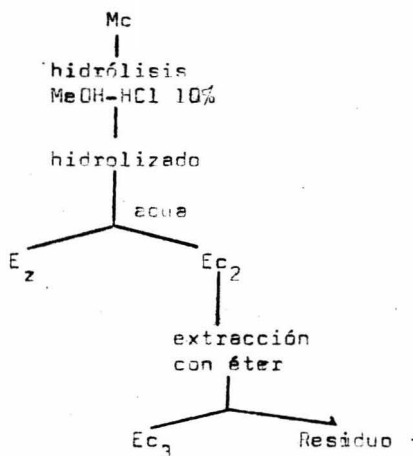
Esquema # 4



b) Hidrolisis con Metanol-HCl al 10%. - En esta técnica la muestra se disuelve en una solución de metanol-ácido clorhídrico al 10% y se hierve a reflujo por 6 horas, después se disuelve se adiciona agua destilada y se deja reposar, en este punto se observó que precipitaba un polvo amorfo similar al obtenido en el proceso anterior (fracción Ec₂). Este producto se lleva a hervir a reflujo por dos horas en éter etílico, el extracto etéreo se decolora con carbón activado y se evapora el disolvente y se obtuvo un producto de color amarillo y consistencia viscosa (fracción Ec₃).

Este metodo solo se efectue con el extracto crudo (Mc). En el siguiente esquema se resume el proceso.

Esquema # 5

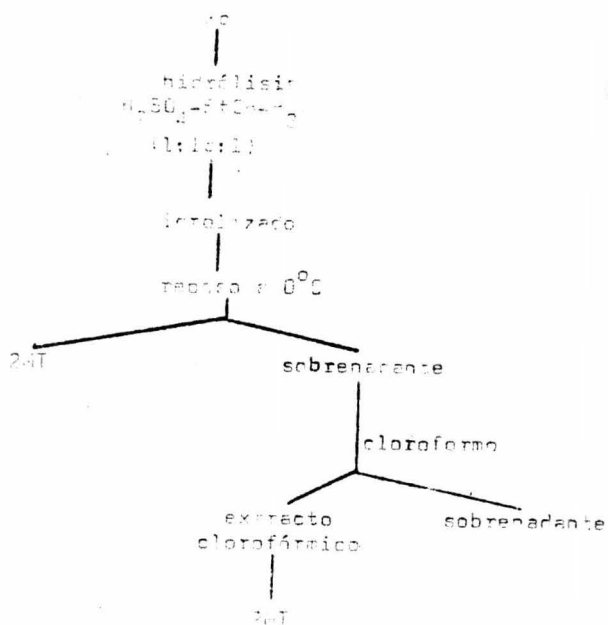


c) Hidrólisis con ácido sulfúrico etanol agua. - En este metodo la muestra se disuelve en una solución de ácido sulfúrico-etanol agua (1:18:1), y se hierve a reflujo durante 7 horas. Después el producto hidrolizado se deja reposar durante una hora a 60°C, - en este caso se observó que precipitaba un polvo de color café-

naliza (fracción 2MT). Las aguas madres se mezclan con agua destilada y se concentran en vacío a la temperatura ambiente para eliminar el etanol, el concentrado se extrae con varias porciones de cloroformo, la solución cloroformica se lava con solución de bicarbonato de sodio luego con agua salada y se evapora a sequedad, en este caso se obtiene un producto de color amarillo, olor acre y aspecto viscoso (fracción 2 KTp).

También con este método solo se hidrolizó la fracción Mo del extracto metanólico; este proceso se resume en el siguiente esquema:

Esquema # 6



Algunos de los productos obtenidos en estos procesos se ensayaron con las reacciones de identificación descritas anteriormente, los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro # 2

Fracción	Rosenthaler	Legal	Liebermann Burchardt	Molish
E-OH	amarillo	amarillo	-	-
Ec	"	"	amarillo	-
E ₃	-	"	naranja	-
Tr	amarillo	"	amarillo	-
P ₄	violeta	naranja amari- lento	naranja	-

aislamiento de Azúcares.- La fase acuosa del hidrolizado anterior se concentró a baño maría para eliminar los residuos de etanol y cloroformo. luego se hirvió a reflujo por tres horas con un poco de agua, la solución resultante que daba reacción ácida se neutralizó con carbonato de bario, después se decoloró con carbón activado y en seguida se adicionó metanol para eliminar inorgánico, el sobrenadante resultante se concentró a presión reducida, obteniéndose un compuesto de consistencia viscosa y olor agradable (fracción Az).

Por cromatografía en capa fina se identificaron los azúcares presentes en esta fracción. Se usaron placas de gel de sílice G impregnadas con ácido bórico 0.02 M, la muestra se corrió junto con algunos testigos de azúcares (glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, arabinosa, galactosa y rhamnosa); se usó el sistema etanol-ácido acético-agua (4:1:1). Como reactivos se usaron nafto-resorcinol y anisaldehído-ácido sulfúrico, con los cuales los azúcares dan colores característicos. (fig. 1)

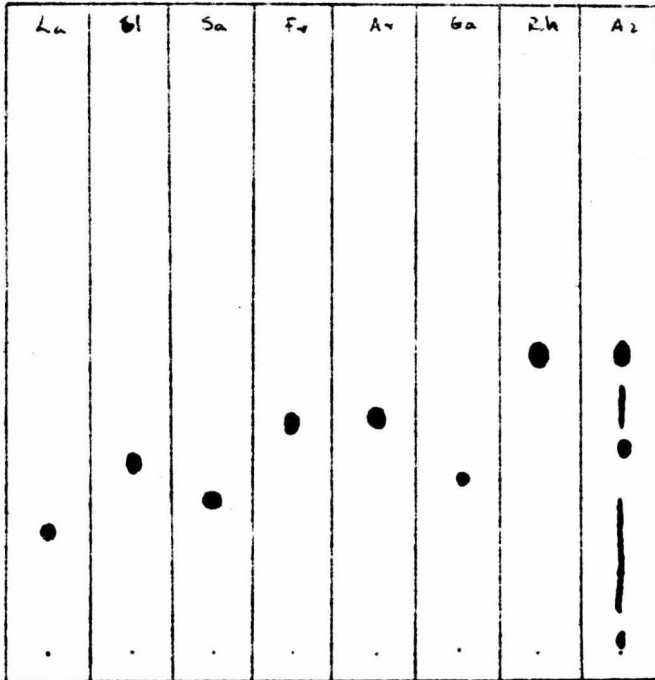


Fig. # 1

Ar arabinosa
 Fr fructosa
 Ga galactosa
 Gl glucose
 La lactosa
 Se sacarosa
 Rh rhamnosa
 Az fracción Az

Pruebas Biológicas.- Otro de los objetivos de este trabajo era el de aislar e identificar el ó los compuestos presentes en las hojas de C. obtusifolia que tienen actividad atrayente sobre las hormigas del género Azteca.

Para lo cual se prepararon una serie de muestras de los extractos obtenidos a lo largo del estudio; estas pruebas se realizaron en el ambiente natural de planta y hormigas (Estación de Biología Tropical UNAM, Los Tuxtlas Ver., a 35 km de Catemaco Ver.).

Esencialmente las pruebas biológicas consistían en ofrecer a las hormigas algunas de las fracciones seleccionadas y observar las reacciones en el transcurso del tiempo. Las pruebas se realizaron en dos formas principalmente, en una de ellas se usó un tubo de vidrio en forma de T, en el cual por un extremo se colocaba la muestra por probar, en otro extremo se colocaba agua y por el tercer orificio se dejaba que entren las hormigas, observándose la reacción en el transcurso del tiempo. En la otra forma ensayada se distribuían en una charola las muestras por probar, se ofrecían a las hormigas y se observaba la reacción.

Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro

Fracción	Reacción
HSH	(a)
TS ₁	(b)
TS ₂	(a)
HSC1	(a)
F ₁₂	(a, b)
F ₁₃	(a)
M-OH	(a)
HSM	(a)

(a) en charola

(b) en tubo T

3. Purificación

Finalmente este trabajo se concluyó con la purificación de algunas de las fracciones aisladas en los extractos que se prepararon.

En los extractos hexánico y cloroformico no se logró hacer una purificación satisfactoria, debido a que en las diferentes fracciones aisladas había una mezcla muy compleja difícil de separar por los métodos usuales.

Solo se pudo purificar por recristalización, la fracción - MSH_1 del extracto hexánico que presentaba una sola mancha por cromatografía en capa fina usando varios sistemas. además el producto final daba un n_D definido a $75^\circ C$

En el extracto metanólico, se presentaba un caso semejante a los anteriores, es decir que las fracciones aisladas de dicho extracto correspondían a una serie de mezclas difíciles de separar por los métodos usuales.

Sin embargo se logró purificar por placa preparativa la sub fracción P_4 aislada de este extracto, (que proviene de la fracción 2^{Mo} del segundo método de hidrólisis. En este caso se usó el método descrito por Iken R. (17).

4. Discusión y Resultados.

Sólo se dan los resultados de las fracciones más puras.

De la fracción HSH₁, el espectro infrarojo (en bromuro de potasio) y el espectro de resonancia magnética nuclear (en tetracloruro de carbono) revelaron que se trataba de un hidrocarburo, sin embargo el análisis del espectro de masas indicó que - en realidad se trataba de una mezcla de 3 hidrocarburos.

De la fracción P₄, se obtuvo espectroscopía completa, los resultados se indican a continuación:

El espectro de ultravioleta mostró:

$\lambda_{max. CHCl_3} = 285 \text{ nm}$

$\epsilon = (\text{coeficiente de extinción}) = 10,266$

El espectro de infrarojo (en bromuro de potasio) mostró las siguientes bandas principales:

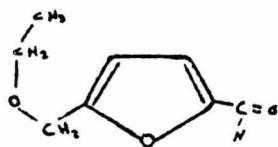
- a 3100 cm⁻¹ una banda ancha (w) de =CH st.
- a 2900 cm⁻¹ una banda ancha (w) de CH st.
- a 2850 cm⁻¹ una banda ancha (w) de CHD st.
- a 1695 cm⁻¹ una banda aguda (s) de C=O st.
- a 1475 cm⁻¹ una banda ancha (w) de CH₂, CH₃ def.
- a 1275 cm⁻¹ una banda ancha (w) de E-O st.
- a 1170 cm⁻¹ una banda ancha (w) de -C-O-C- st. es.
- a 1090 cm⁻¹ una banda ancha (w) de -C-O-C st.
- a 1040 cm⁻¹ una banda ancha (w) de E>O st.

El espectro de resonancia magnética nuclear (en cloroformo deuterado) mostró los siguientes picos:

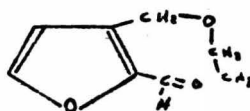
- a 1.29 ppm un triplete que integra para 3 H
- a 3.6 ppm un cuadruplete que integra para 2 H

- a 4.5 ppm un singlete que integra para 2 H
- a 6.5 ppm un doblete que integra para 1 H
- a 7.2 ppm un doblete que integra para 1 H
- a 9.6 ppm un singlete que integra para 1 H

El análisis de estos datos llevó a proponer alguna de las siguientes estructuras:

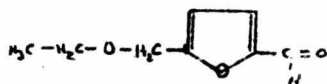


I

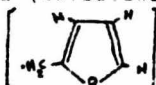



II

Finalmente el espectro de masas proporcionó la siguiente información:

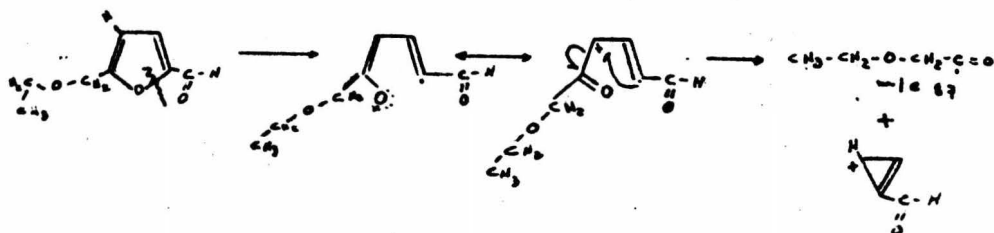


m/e 154

m/e	Interpretación
154 (M+) ⁺	95 con respecto a M como 100% por lo tanto hay 8 átomos de C ± 1
154 M ⁺	
126 M ⁺ - 28	M ⁺ - (CO)
125 M ⁺ - 29	M ⁺ - (C ₂ H ₅) y/o M ⁺ - (C ^{=O} -H), m ^e = 101.5 (calculado 101.4)
109	Pico base, M ⁺ - 45, M ⁺ - (OC ₂ H ₅)
97	125-28, 125-(CO), m ^e = 75.2 (calculado 75.27)
95	125-30, 125 - (OCH ₂)
87	154-67, m ^e = 49.2 (calculado 49.15)
81	109-28, 109- C=O,  m ^e = 60.4 (calc. 60.19)

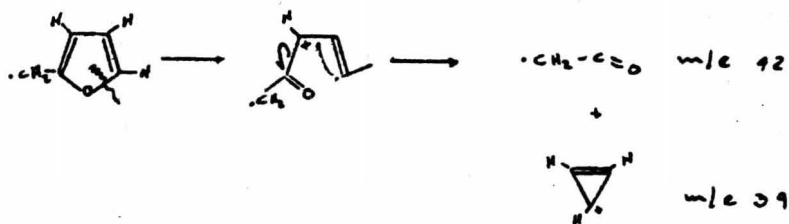
- 38 81-28, $m^+ = 34.9$ (calc. 34.67)
 41 $C_3H_5^+$
 39 81-42, 81-($CH_2C=O$), 
 29. $(HCO)^+$

La presencia del fragmento m/e 87 indice una substitución 2,5 en el anillo de furano de acuerdo con Dieresi (8)



En base a este hecho se descarta la estructura \dots y por tanto queda confirmada la estructura I

El fragmento de m/e 39 se forma del de m/e 81 de la siguiente manera:



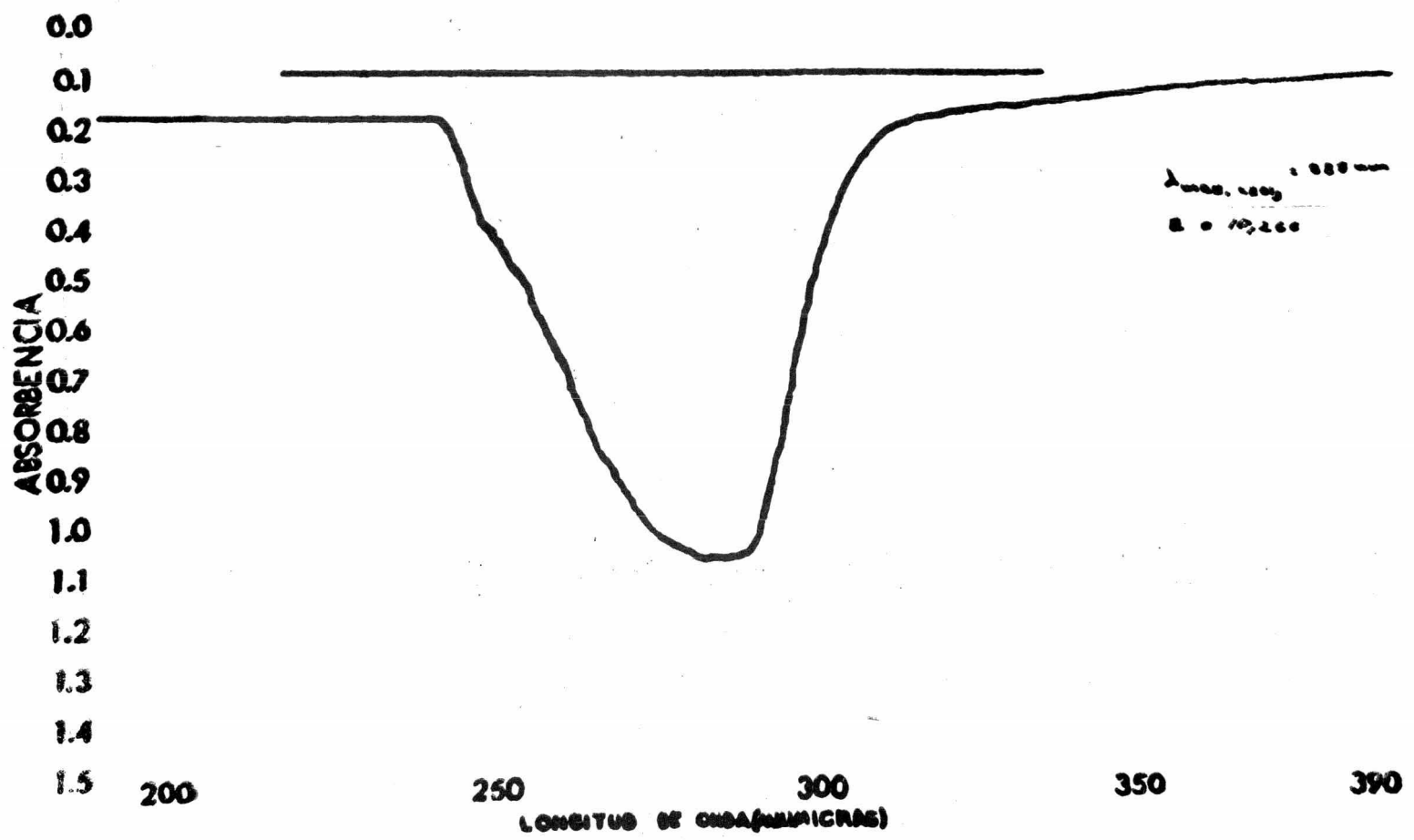
5. Conclusiones

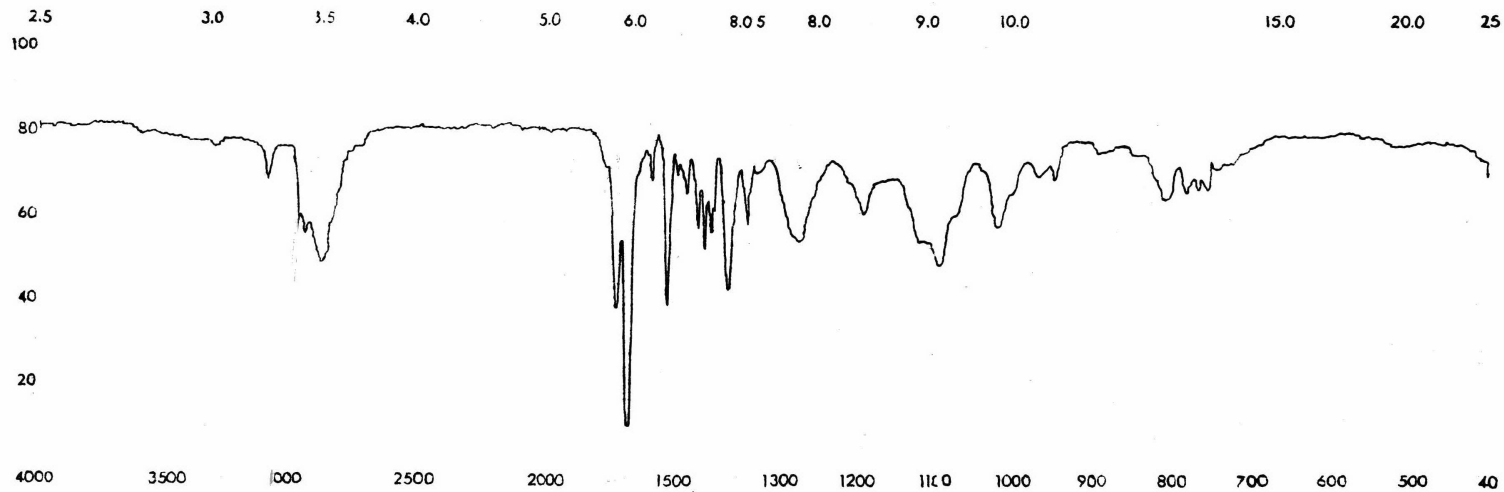
- a) Se diseñó el método para trabajar en el aislamiento del principio activo de Cecropia obtusifolia.
- b) Se identificó cualitativamente, por cromatografía en capa fina a los azúcares rhamnosa y glucosa como parte del glucósido del extracto metanólico.
- c) Se identificó el 5-(etoxi)-metil furfural, y se reporta la espectroscopía completa del compuesto. (infrarojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas).
- d) Se efectuaron pruebas biológicas para encontrar la fracción activa como atrayente de las hormigas del género Azteca.

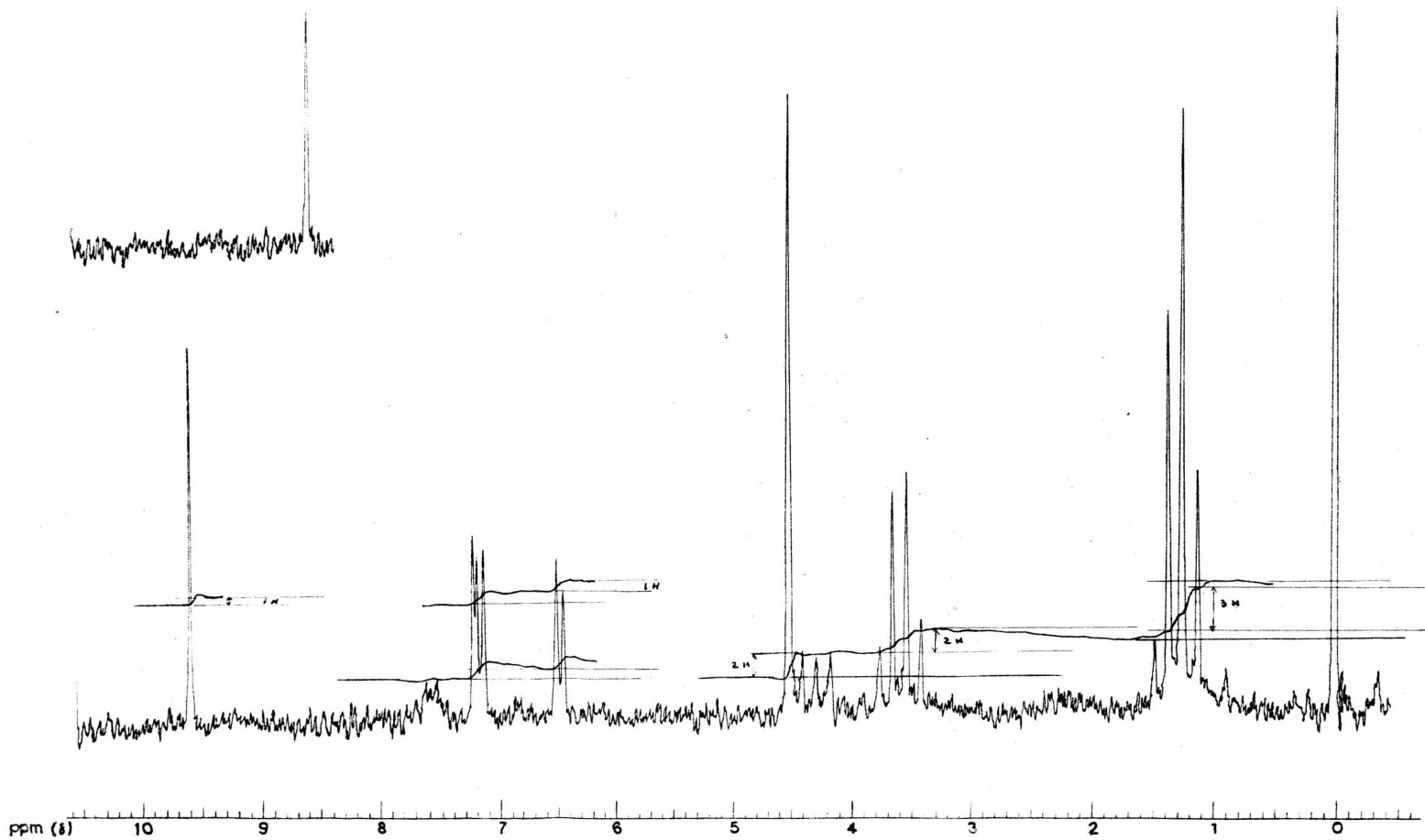
6. Espectroscopía

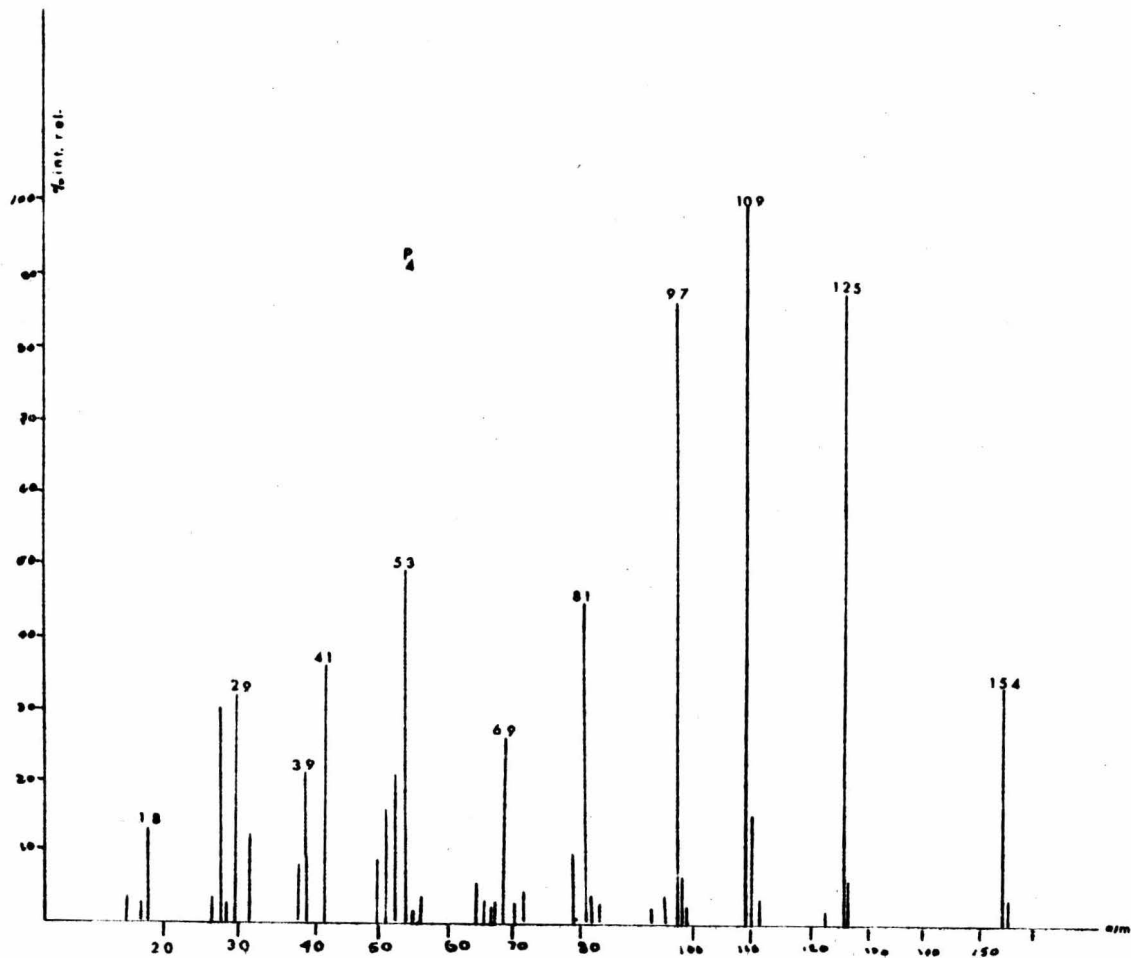
En esta parte se incluye la espectroscopía completa de la fracción P₄, la cual corresponde al 5-(etoxi)-metil furfural cuya estructura es conocida (10).

- a) Espectro de ultravioleta
- b) Espectro de infrarrojo
- c) Espectro de resonancia magnética nuclear
- d) Diagrama de líneas del espectro de masas









BIBLIOGRAFIA

1. Alberti, B., *Untersuch. Lebensmittel.*, 66, 260 (1932)
2. Boll, P., and Andersen, B., *Planta Med.*, 10, 421(1962)
3. Cambie, R. and Couch, R., *New Zealand J. Sci.*, 10, 1020 (1967)
4. Chirva, W., et al., *Khim. Prirodn. Soedin.*, Akad. Nauk Uz. SSR 4, 140 (1968)
5. Chojev, E., *Bull. Sci. Pharm.*, 11, 70 (1905)
6. Clarke, E., *Nature*, 181, 1152 (1958)
7. Conity, G., *Arzneimittel-Forsch.*, 18, 334 (1968)
8. Dierasi, C., Badzikiwicz, H., and Williams, A., *Mass Spectrometry*, Edit. Holden-Day Inc. San Francisco E.U., 616 (1967)
9. Domínguez, X. *Métodos de Investigación Fitocquímica*, Edit. Limusa-Willey México (1973)
10. Brechsler, G., Kopperschläger, G., *J. Prakt. Chem.*, 27, 5 v-258 (1965)
11. Floriani, L., *Rev. Cent. Est. Farm. y Bioquím.*, 29, 132 (1939)
12. Geissman, I., *Modern Methods of Plant Analysis*, Edit. Springer Verlag, III, 493 (1965)
13. Gilbert, A., Carnot, P., *Bull. Sci. Pharm.*, 11, 200 (1905)
14. Grouourdy, R., *El Médico Botánico Criollo*, 3a. ed. Paris 74 (1864)
15. Hiller, K., Linzer, B., Keibert, M., *Pharmazie*, 21, 713 (1966)
16. Hiller, K., et al., *Pharmazie*, 23, 376 (1968)
17. Iken, R., Kashnem, D., *J. Chromatog.*, 14, 278 (1964)
18. Kauffmann, H., et al., *Helv. Chim. Acta*, 50, 2287 (1967)
19. Kieseewetter, H., *Wien. Med. Wochschr.*, 114, 124 (1964)
20. King, N., Haddock, N., *J. Am. Pharm. Ass.*, 47, 129 (1959)
21. Kochetkov, N., Khorlin, A., *Arzneimittel-Forsch.*, 16, 101 (1966)
22. Kochetkov, N., et al., *Tetrahedron L.*, 713 (1962)
23. Langon, M., *Anal. Fac. Med. Montevideo*, 3, 829 (1923)
24. Macek, K., editor, *Pharmaceutical Applications of Thin Layer and Paper Chromatography*, Edit. Elsevier Pub. New York (1972)
25. Mc Ilroy, J., *The Plant Glycosids*, Edit. Arnold Londres (1951)

26. Mc Lenann, A., *Biochem. J.*, 82, 394 (1962)
27. Miller, B., *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 9, 425 (1938)
28. Nogueira, P., Correia, A., Garcia de Orta, 3, 615 (1960)
29. Peckolt, *Hist. des plant med. e uteis do Brasil, Rio de Janeiro, V*, 858 (1893)
30. Pennington, T., Serukan, J., *Arboles Tropicales de México, Inst. Nac. Inv. Forest., México*(1968)
31. Pérez, E., *Plantas Utiles de Colombia, 3a. ed., Madrid, 516* (1958)
32. Perrot, E., et al., *Bull. Sci. Pharm.*, 1, 10 (1905)
33. Reichstein, T., Euw, J., *Helv. Chim. Acta*, 21, 1181 (1938)
34. Reuter, L., *Traité de Matière Médicale. Paris, Edit. Bailliere et Fils*, 818 (1923)
35. Rickson, F., *Science*, 173, 344 (1971)
36. Rosenthaler, L., *The Chemical Investigation of Plants, Edit. G. Bells & Sons Ltd., Londres, 20*, (1930)
37. Schaub, F., et al., *Helv. Chim. Acta*, 51, 738 (1958)
38. Scheffer, F., Kickuth, R., *Anal. Chem.*, 191, 116 (1962)
39. Sheiber, K., et al., *J. Chromatog.*, 12, 63 (1968)
40. Segelman, B., Fensworth, N., *Lloydia*, 32, 59 (1969)
41. Sen, A., *J. Indian Bot. Soc.*, 19, 147 (1940)
42. Sinsheimer, J., et al., *Experientia*, 24, 302 (1968)
43. Skuth, A., *Sci. Month.*, 60, 5 (1945)
44. Stahl, E., Katenbelch, J., *J. Chromatog.*, 5, 458 (1961)
45. Stahl, E., editor, *Thin Layer Chromatography, Edit. Springer-Verlag New York*, (1955)
46. Standley, P., *Flore de Guatemala, Fieldiana Bot. Chicago Nat.-Hist. Mus.*, 24, IV (1959)
47. Steinmetz, E., *Quart. J. Res.*, 5, 714 (1965)
48. Stoll, A., *In Modern Methods of Plant Analysis, Edit. Springer-Verlag. Berlin*, 176 (1955)
49. Tschesche, R., Lampert, F., *J. Chrometog.*, 5, 217 (1961)
50. Tschesche, R., Wulff, G., *Planta Med.*, 12, 272 (1964)
51. Valeri, H., Narváez, P., *Rev. Med. Vet. y Parasitol.*, 10, 105 (1950)

52. Vogel, G., Marak, M. and Dertner, R. *Arzneimittel-Forsch.*, 18, 4666 (1968)
53. Wagner, J., et al., *Arzneimittel-Forsch.*, 1466 (1968)
54. Wagner, J., Hoffmen, H., *Physiol. Chem.*, 348, 1967((1967)
55. Woitke, H., et al., *Pharmazie*, 25, 133 (1970)
56. Wulff, G., *Deut. Apotheker-Ztg.*, 108, 797 (1968)
57. Wulff, G., Tschesche, R., *Tetrahedron L.*, 25, 415 (1969)
58. Zavela Muñiz, *Contribución al Tratamiento del Asma*, *El Día Médico Uruguayo*, Montevideo, 21, 37 (1936)