

30
207.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE
Jatropha dioica

ESTUDIO FITOQUIMICO DE Jatropha dioica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA ELENA CASTRO LARA



MEXICO, D. F.

1993

TEESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	4
Descripción Botánica de <i>Jatropha dioica</i>	7
Ecología y Principales Microorganismos de la Boca	9
Plantas Utilizadas en Problemas Odontológicos	12
COMPOSICION QUIMICA DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE	14
METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO <i>Jatropha</i>	24
PARTE EXPERIMENTAL	30
Extracción del Material Vegetal	31
Fraccionamiento "biodirigido" de los	34
Extractos Metanólico, Acuoso y Purificación	
de los Compuestos	
DISCUSION DE RESULTADOS	43
Parte Química	44
Parte Biológica	58
CONCLUSIONES	61
ESPECTROS	62
BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUCCION

Las plantas y flores han jugado un papel importante en la vida de los mexicanos, desde los tiempos prehispánicos hasta el presente. Han sido numerosos los autores que han escrito sobre los beneficios de diversos vegetales (1).

Actualmente es innegable la existencia de una medicina popular eminentemente herbolaria como una realidad cultural que requiere ser estudiada y valorada. La respuesta a tal circunstancia ha sido un "retorno" a los aspectos naturales del habitat; por lo que las grandes industrias farmacéuticas han invertido recursos económicos para la obtención de fármacos sintéticos, para iniciar una nueva era, que podría denominarse de los medicamentos naturales, promoviendo un adecuado desarrollo de los estudios científicos tendientes a impulsar un aprovechamiento nuevo y diferente aprovechamiento de nuestros recursos. Por lo que no es raro que los ya olvidados curanderos, brujos, y herbolarios, vuelvan a recibir la visita de los exploradores científicos que estudian sus costumbres y tradiciones, aprovechando el conocimiento acumulado de la medicina tradicional.

Hoy en día no menos de 100 principios activos de estructura definida derivados de plantas, son usados en el mundo. Menos de la mitad de éstos son aceptados como fármacos de uso generalizado y aún es más importante que menos de 10 de éstas drogas son producidas comercialmente por síntesis como la morfina, la atropina, entre otras (2).

Así las plantas permanecen como fuente potencial de compuestos activos, cuyo estudio además puede ayudar a comprender los procesos químicos y biológicos que ocurren en ellas. Esto requerirá de una colaboración multidisciplinaria, buena planeación, creatividad, dedicación, tacto y una gran paciencia, para obtener mejores resultados en el estudio de las plantas.

En realidad, hay un camino abierto para que los investigadores organicen, y realicen programas de investigación interdisciplinaria sobre la utilización de estas fuentes naturales de medicamentos. Dichas fuentes suelen ser abundantes y pueden proporcionar productos galénicos, seguros, estables y eficaces para su uso en la atención primaria de salud ó conducir al descubrimiento de nuevos principios biológicamente activos derivados de plantas, que a veces son apropiados para la elaboración de medicamentos.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo representa una contribución al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en la vegetación de nuestro país, y pretende ponderar la actividad biológica de los extractos y sustancias presentes en ellas.

Para llevar a cabo estos fines se recurrió al uso de métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos, cristalográficos y para la evaluación antimicrobiana se utilizó el método por difusión de discos.

OBJETIVOS

El presente trabajo, "Estudio Fitoquímico de *Jatropha dioica*" persigue los siguientes objetivos:

-Contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en la vegetación de nuestro país, específicamente en el estudio de las plantas mexicanas usadas en padecimientos de tipo odontológico, así como determinar la actividad biológica atribuida a dicha planta.

-Realizar el fraccionamiento "biodirigido" de los diferentes extractos (metanólico, acuoso, hexánico) obtenidos de la raíz de *Jatropha dioica*, y mediante bioensayos, determinar la fracción de la planta en la cual se encuentre el ó los componentes químicos causantes de su acción antimicrobiana.

-Paralelamente a la evaluación antimicrobiana, de la raíz de *Jatropha dioica*, intentar la identificación química ó estructural de los componentes con posible actividad antimicrobiana.

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

La familia Euphorbiaceae es una de las cinco familias de plantas más abundantes en cuanto a número de especies se refiere, después de la Compositae, Leguminosae, Orchidaceae, y Gramineae (3). Dicha familia se encuentra constituida por hierbas, arbustos ó árboles, a veces carnosos, a menudo lactíferos conteniendo generalmente un jugo lechoso de sabor astringente ó amargo (4).

A ésta familia la integran más de 7000 especies, las cuales están repartidas en aproximadamente 280 géneros (5) bien distribuidos en todo el mundo, pero principalmente en regiones tropicales (4), (5).

En la siguiente tabla se describen los géneros más importantes de ésta familia (7).

<u>No. de Especies</u>	<u>Género</u>
1600	<i>Euphorbia</i>
700	<i>Croton</i>
480	<i>Phyllanthus</i>
430	<i>Acalypha</i>
280	<i>Glochidon</i>
240	<i>Macaranga</i>
160	<i>Manihot</i>
150	<i>Jatropha</i>
140	<i>Tragia</i>

Muchos de éstos géneros se caracterizan por la presencia de látex en sus tejidos, es decir de una suspensión compuesta principalmente de sales minerales, proteínas, aminoácidos, terpenos, y caucho(5),(6). Algunas especies contienen sustancias que han sido probadas como las responsables de la actividad biológica específica para las que son utilizadas; entre estas

substancias se pueden mencionar alcaloides, terpenoides, lignanos, cumarinas, y flavonoides (Pieters y col. 1990).

De particular interés han resultado algunos diterpenos con propiedades anticancerígenas ó como promotores de tumores (7).

Esta familia incluye plantas de gran importancia económica, que son y han sido utilizadas desde tiempos antiguos (siglo XVI), hasta la fecha en diversos usos, como los que se mencionan a continuación.

Género	Usos	Referencia
<i>Jatropha curcas</i>	industrial	(59)
<i>Hevea brasiliensis</i>	industrial	(57)
<i>Euphorbia antisifilitica</i>	industrial	(57)
<i>Euphorbia prostata</i>	medicinal	(8)
<i>Croton tiglium</i>	medicinal	(8)
<i>Euphorbia graminea</i>	alimenticio	(55)
<i>Cnidioscolus chayamansa</i>	alimenticio	(56)
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	ornamental	(63)
<i>Ricinus communis</i>	insecticida	(63)
<i>Acalypha arvensis</i>	insecticida	(63)

Dentro de ésta familia botánica, el género *Jatropha* ocupa un lugar relevante, debido al número de especies que la conforman y además su importancia radica principalmente en el uso que la población hace de ella, ya que desde el siglo XVI, se encuentran datos con respecto a su uso (8).

Con respecto a los principales usos de las especies representativas de éste género, en la Tabla 1 se encuentran recopilados algunos de éstos, así como información adicional acerca de la evaluación farmacológica y parte usada de la planta (9).

Tabla 1: Especies representativas del género

Jatropha

Especie	Uso	Vía de administración	Parte usada	Evaluación				
				farmacológico		clinica	vulgar	
				s/n se confirma el uso de preparaciones en animales	se presenta una acción farmacológica diferente del uso vulgar o de los efectos clínicos	reporte de 1-5 casos tratados con mejoría de 20-50 % de los pacientes tratados	observación directa por persona e información oral de un observador directo	información oral de terceras personas uso popular
<i>J. caliculata</i>	Enfermedades Vendras	No hay información	Rafz	No	SI	SI	No	SI
<i>J. cardiophylla</i>	Astringente	No hay información	Rafz	No	SI	SI	No	SI
	Clontrante y regenerativo	No hay información	Rafz	No	SI	SI	No	SI
<i>J. cinerea</i>	Astringente	Local	Hoja	No	SI	SI	No	SI
	Tónico	No hay información	Hoja	No	SI	SI	No	SI
<i>J. cordata</i>	Llagas	Local	Hoja(jugo)	No	SI	SI	No	SI
	Tónico	Local	Hoja	No	SI	SI	No	SI
<i>J. curcas</i>	Calártico	Oral	Hoja Semilla	SI	No	SI	SI	No
	Emético	Oral	Semilla	No	SI	SI	No	SI
	Hemorroides	Local	Jugo	No	SI	SI	No	SI
	Humeros	No hay información	No hay información	No	SI	SI	No	SI
	Rubefaciente	No hay información	Hoja	No	SI	SI	No	SI
	Vesicante	No hay información	Hoja	No	SI	SI	No	SI

Especie	Uso	Vía de administración	Parte usada	Evaluación				
				farmacológica		cifosis	vulgar	
				s/n se confirma el uso de preparaciones en animales	se presenta una acción farmacológica diferente del uso vulgar o de los efectos cifoicos	reporte de 1-5 casos tratados con 20-50 X de los pacientes tratados	observación directa por persona e información oral de un observador directo	información oral de terceras personas uso popular
<i>J. dioica</i>	Antidiarréico	Oral	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Antiscombilitico	No hay información	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Antiséptico	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Astringente	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Dermatolico	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Hemorroides	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Piorrea	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
	Tónico capilar	Local	Rafé	SI	No	SI	SI	No
<i>J. gaumeri</i>	Abcesos	Local	Rafé	No	SI	SI	No	SI
	Antidiarréico	Local	Jugo	No	SI	SI	No	SI
	Llagas	Local	Rafé	No	SI	SI	No	SI
<i>J. gossypifolia</i>	Anticrotálico	Oral	Rafé	No	SI	SI	No	SI
	Antídoto del Manzanillo	Oral	Rafé	No	SI	SI	No	SI
	Emético	Oral	Hoja	No	SI	SI	No	SI
	Emetostático	Oral	Semilla	No	SI	SI	No	SI
	Enfermedades Venéreas	Oral	Hoja	No	SI	SI	No	SI
	Purificador de la sangre	Oral	Hoja	No	SI	SI	No	SI

Especie	Uso	Vía de administración	Parte usada	Evaluación				
				farmacológica		clínica	vulgar	
				a/n se confirma el uso de preparaciones en animales	se presenta una acción farmacológica diferente del uso vulgar o de los efectos clínicos	reporte de 1-6 casos tratados con mayoría de 20-50 X de los pacientes tratados	observación directa por persona u información oral de un observador directo	información oral de terceras personas uso popular
<i>J. multifida</i>	Catártico	Oral	Semilla	No	SI	SI	No	SI
	Emelocatórtico	Oral	Semilla	No	SI	SI	No	SI
<i>J. platyphylla</i>	Heridas	Local	Semilla	No	SI	SI	No	SI
<i>J. spathulata</i>	Amigdalitis	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Antiséptico	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Astringente	Local	Raíz	No	SI	SI	SI	No
	Coagulación renal	Oral	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Conjuntivitis	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Dermatitis	Local	Jugo	No	SI	SI	No	SI
	Enteritis	Rectal	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Estomatitis	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Gastroenteritis	Oral	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Gingivitis	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI
	Héridas	No hay información	Raíz	No	SI	SI	SI	No
	Vaginitis	Local	Raíz	No	SI	SI	No	SI

De la Tabla I se puede observar que es de suma importancia la recopilación y organización de esta información, ya que con ello podemos realizar un estudio detallado de éstas plantas, así como su desarrollo y aplicación tanto en sus regiones de origen como en otras. Además, también permite valorar las propiedades químicas, y poder así determinar su viabilidad como fuentes potenciales de fármacos.

Aún cuando no se hayan identificado los principios activos de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional, debe darse prioridad a la evaluación de su inocuidad, incluso a expensas de la determinación de la eficacia del preparado.

Cabe mencionar que por lo general es muy difícil reproducir muchos de los resultados registrados en la literatura sobre la actividad biológica de los extractos de las plantas. La incapacidad para reproducir los experimentos de la valoración biológica de los extractos de las plantas puede atribuirse a cambios en los constituyentes químicos debido a la edad de las plantas, época del año, estación ó área geográfica en que fueron recolectadas.

Debido a que la variabilidad química de las plantas es un hecho bien documentado, es importante señalar la dificultad en la reproducción y repetición exacta de los efectos biológicos de los extractos de los vegetales..

En el presente trabajo se tomó como objeto de estudio a la planta *Jatropha dioica* debido a la diversidad de usos que tiene, en la medicina tradicional en México, en especial el uso que se le adjudica contra la piorrea. Esta es una enfermedad inflamatoria de las encías, que ocupa un lugar importante dentro de los padecimientos odontológicos, ya que causa la pérdida de las piezas dentarias y comúnmente la padece. un alto porcentaje de la población la padece.

DESCRIPCION BOTANICA DE *Jatropha dioica*

Familia	Euphorbiaceae.
Nombre científico	<i>Jatropha dioica</i> var. <i>sessiliflora</i> (H.B.K.), Mc. Vaugh
Nombres vulgares	Sangregado, tacote prieto, telondilla, gualulo, matácora.
Descripción	Planta semileñosa, herbácea, de 30-60 cm. de altura, tallos de color negruzco, hojas en grupos sésiles y espatuladas, flores masculinas de corola monopétala, globosa, campanulada de color blanco, rojizo, con 13 estambres monodelfos, flores femeninas con cáliz mayor que la corola, raíces largas, tuberosas, rastreras.
Distribución	Hidalgo, Valle de México, Zacatecas, Coahuila, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí.
Uso popular	Antiséptico, astringente, antidermatítico, para afirmar los dientes, antidisentérico. En Oaxaca es usada contra el escorbuto y la piorrea.
Constituyentes químicos	Se ha reportado materia grasa sólida, aceite esencial, un principio ácido con propiedades glucosídicas, resina ácida soluble en éter, resina soluble en alcohol, principios pécticos, un alcaloide, glucosa, saponinas, dextrina, ácido oxálico, materia colorante roja (8). Además de riolozatriona, citlalitriona, jatrolona B, y β -sitosterol (10), (11).

Jatropha dioica var. sessiliflora (Hook, Mc. Vaugh) es conocida localmente como "sangregado" y fué llamada por los aztecas "tlapelextali".

Los extractos de la raíz de ésta planta han sido grandemente usados en la medicina tradicional para aliviar el dolor de muelas y tratamientos de cáncer en la piel (8).

Oscar Sánchez S. , en el libro "La flora en el Valle de México", menciona que la población emplea a la *Jatropha dioica* para endurecer las encías (12).

Aunque las propiedades curativas de la raíz de *Jatropha dioica* han sido conocidas por generaciones, pocos datos en literatura se encuentran disponibles sobre su composición química y a su vez de la relación que existe entre éstos y la actividad terapéutica asignada a la planta.

No se dispone de datos para precisar el valor ó la difusión del uso de plantas y de los principios activos de ellas. Sin embargo la Organización Mundial de la Salud, estima que quizá el 80% de los más de 4000 millones de habitantes en la Tierra confían en medicinas tradicionales para sus principales necesidades de salud, y se puede afirmar que gran parte de las terapias tradicionales entrañan el uso de extractos de plantas ó de sus principios activos (13).

ECOLOGIA Y PRINCIPALES MICROORGANISMOS DE LA BOCA

La cavidad bucal se encuentra expuesta desde el nacimiento a muchos y diferentes microorganismos presentes en nuestro entorno. El ambiente bucal posee estructuras suaves y duras. Algunas áreas, como por ejemplo la mucosa, presentan diferencias nutricionales, cantidad de oxígeno, y también en cuanto a propiedades fisicoquímicas diferentes en comparación con la lengua, las hendiduras gingivales, y las superficies de los dientes, favoreciendo así la adherencia y el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos (14).

Las asociaciones microbianas existen siempre, presentando marcadas variaciones y cambios individuales provocados por diversos factores como pueden ser los siguientes:

- a) La edad
- b) Las condiciones fisiológicas bucales.
- c) El transcurso del día.
- d) Los diferentes nichos (territorios) ecológicos de la boca.

Dichas asociaciones pueden encontrarse constituidas por diferentes especies, quizá dependiendo de un solo factor de influencia en el ambiente bucal (aunque sus nichos ó territorios se encuentren separados).

Así, podemos decir que la flora habitual de la boca se encuentra formada por microorganismos que encuentran condiciones convenientes para un buen crecimiento y que además pueden competir exitosamente con otras especies por las sustancias nutritivas brindadas. Su abundancia numérica es consecuencia de esa adaptación y ventaja competitiva (14).

La flora habitual se encuentra representada, principalmente por los siguientes microorganismos: (15).

<u>Tipo de microorganismo</u>	<u>Porcentaje</u>
1) Cocos gram positivos	
<i>Streptococcus salivarius</i>	(0.5%)
<i>Streptococcus mitis</i>	(15%)
<i>Streptococcus sanguis</i>	(15%)
<i>Streptococcus mutans</i>	(0-50%)
<i>Enterococos</i>	(0-19%)
2) Cocos gram negativos	
<i>Neisseria</i>	(0.25%)
<i>Vellonella</i>	(2%)
3) Bacilos y filamentos	
gram positivos	
<i>Lactobacilos</i>	(0.005%)
Los lactobacilos más abundantes son <i>L. casei</i> , <i>L. fermenti</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. buchneri</i> .	
4) Bacilos y filamentos	
gram negativos	
<i>Bacteroides oralis</i>	(5%)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	(1%)
<i>Vibrio sputoum</i>	(1%)
<i>Fusobacterium</i>	(4%)
<i>Spirochetas</i>	(0.1%)

Muchos miembros de la flora bucal habitual tienen propiedades patógenas y pueden causar infecciones y enfermedades en la cavidad bucal, así como en otros sitios del cuerpo. La caries, la enfermedad periodontal, la inflamación de las encías (gingivitis), y la endocarditis bacteriana subaguda,

son algunos ejemplos de infecciones relacionadas con la flora bucal habitual.

Actualmente se habla más, acerca de la asociación de bacterias gram negativas con la enfermedad periodontal y las infecciones orofaciales. Esto ha generado considerable interés, y ha producido modificaciones en la clasificación de dichos microorganismos.

En la tabla siguiente se muestra el tipo de bacterias gram negativas más importantes involucradas en éste tipo de infecciones (14).

<u>Grupo coliforme</u>	<u>Grupo no coliforme</u>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Providencia</i>	<i>Shigella</i>
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	<i>Salmonella typhi</i>

En las enfermedades periapicales se han aislado diversas especies de *Proteus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoneae*, y *Enterobacter*.

Se ha encontrado que un incremento en el número de bacterias gram negativas puede estar asociado con un aumento de la posibilidad de infecciones de la región orofacial por éste grupo de bacterias (14).

PLANTAS UTILIZADAS EN PROBLEMAS ODONTOLÓGICOS

El uso de las plantas en padecimientos odontológicos es muy antiguo.

Existen numerosas pruebas acerca de la presencia de caries con sus respectivas complicaciones, así como de padecimientos periodontales que confirman que en la población antigua también era conocida la atrofia alveolar con la pérdida de piezas dentarias, y una gran cantidad de infecciones, tan frecuentemente observadas en la población actual (16).

Tomando en cuenta las tradiciones culturales de diversos pueblos, y regiones, se han podido recopilar algunos datos acerca de plantas utilizadas en diversos padecimientos odontológicos, las cuales se citan en la Tabla 2 (17), (18), (19).

De los datos presentados en la Tabla 2 se puede ver que es de suma importancia agrupar la información, en base a la actividad terapéutica asignada a cada planta, ya que esto trae como consecuencia, poder asociar ó determinar propiedades químicas y así también, realizar un estudio más detallado de estas plantas.

Como un ejemplo, de el uso reciente de las plantas en padecimientos de tipo odontológicos se encuentra la sanguinarina, aislada de las raíces de *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) y también de cultivos celulares de *Papaver somniferum* (Papaveraceae). El extracto de ésta planta se encuentra constituido por una mezcla de alcaloides del grupo ó tipo de las alfa-naftanfenantridinas, pero el constituyente principal ó en mayor cantidad es la sanguinarina (20).

La estructura química de la sanguinarina (Fig. a) es similar a la de los alcaloides del tipo de las benzofenantridinas. Dichos alcaloides se encuentran como componentes principales de la *Fagara zanthoxyloides* (Rutaceae), la cual es utilizada en diferentes regiones de Africa para la limpieza de las piezas dentarias (21).

En la actualidad, se han realizado estudios en donde se ha probado la actividad antibiotica de la sanguinarina contra bacterias causantes de la formación de la placa dental y además ésta sanguinarina se ha venido utilizando como ingrediente activo de diversos productos comerciales dedicados a la higiene bucal (22).

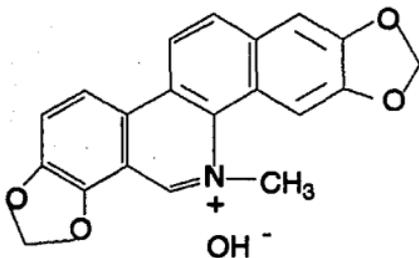


Fig. a : Sanguinarina

Tabla 2: plantas utilizadas en padecimientos odontológicos.

Familia	Género	Nombre Común	Uso	Parte Usada	Preparación	Vía de Administración
Apocynaceae	<i>Thevetia peruviana</i>	Catúe	Analgésico contra dientes	Látex	Sin/Prep.	Oral
Anacardiaceae	<i>Cyrtocarpa procera</i>	Chucumpuz	Para curar el dolor de muelas	Corteza del árbol	Sin/Prep.	Masticado
Dactilaceae	<i>Opuntia tomentosa</i>	Nopal silvestre Nopal cimarrón	Para malestares de la dentición	Flor del arbusto	Coccimiento	Oral
Cranitaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Tromador	Mal de boca	Hojas	Sin/Prep.	Oral (masticado)
Urticaceae	<i>Caria mexicana</i>	Borete	Analgésico en muelas picadas	Látex del árbol	Sin/Prep.	Oral (aplicada)
Cambretaceae	<i>Terminalia catappa</i>	Almendro	Para evitar hemorragias después de la extracción de muelas	Hojas	Coccimiento	Oral (bucal)
Cruciferas	<i>Leplidium virginicum</i>	Lentejilla	Apretar encías	Látex	Sin/Prep.	Local (gotas)
Euphorbiaceae	<i>Croton toxicaria</i> <i>Croton drago</i>	Ortiga Sangre de grado	Dolor de muelas Mal de boca	Látex	Sin/Prep.	Oral (frotado)
		Grado	Fuego	Látex	Resregado	Local (gotas)
	<i>Euphorbia prostrata</i>	Hierba de la galandrina china	Mal de boca	Toda la planta	Cocción	Oral (lavado)
	<i>Jatropha curcas</i>	Piñón	Mal de boca	Látex	Cocción	Frotado
Fagaceae	<i>Quercus macrocarpa</i>	Encino amarillo Encino	Para anastimar los dientes	Corteza del árbol	Cocción	Enjuague bucal
	<i>Quercus oleoides</i>	Tanzol	Para apretar encías	Corteza del árbol	Cocción	Oral (bucal)
	<i>Quercus elliptica</i>	Encino	Para apretar encías	Hojas ó Corteza	Cocción	Oral (bucal)
Geraniaceae	<i>Pilargonium graveolens</i>	Geranio de color	Analgésico en dolor de muelas	Hojas	Cocción	Oral (licuado)
Leguminosae	<i>Erythrina americana</i>	Pichoco	Para dolor de muelas	Corteza	Cocción	Local (tomentos y vaporizaciones)
	<i>Caesalpinia coriaria</i>	Cacalote	Para afirmar los dientes	Corteza y vaina	Cocción	Enjuague bucal

Familia	Género	Nombre Común	Uso	Parte Usada	Preparación	Vía de Administración
Leguminosae	<i>Cercidium praecox</i>	Obútinga	Añojar los dientes para su posterior extracción	Corteza del árbol	Sin/Prep.	Oral (masticado)
	<i>Lu piloma aca pulcorus</i>	Tepehuaje	Para amacchar la dentadura	Corteza del árbol	Cocción	Enjuague bucal
Liliaceae	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Dolor de muelas	fruto de la planta	Sin/Prep.	Oral (masticado)
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nanco Nanche Xocoanaco	Apretar las muelas	Corteza	Cocción	Oral (tuchos)
Melastomae	<i>Morus alba</i>	Mora Moral Morán	Dolor de muelas	Látex	Sin/Prep.	Local (gotas)
Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i>	Cavo	Dolor de muelas	Acolla	Sin/Prep.	Externo
Polygonaceae	<i>Rumex obtusifolium</i>	Lengua de vaca	Para disminuir los abscesos causados por muelas infectadas	Hojas	Sin/Prep.	Colaplasma
Rosaceae	<i>Pterocarya cordatus</i>	Minita de León Pala de León	Amacchar los dientes	Raíz	Cocción	Enjuague bucal
Rutaceae	<i>Citrus aurantium</i>	Naranja agria	Para calmar el dolor provocado por los dientes carados	Hojas	Infusión	Oral (tomado)
Rubiaceae	<i>Psychotria chilensis</i>	Cojon de Galo	Dolor de muelas	-----	-----	-----
Solanaceae	<i>Nicotiana tobacum</i>	Tobaco	Apretar los dientes	Hojas	Sin/Prep.	Oral (masticado)
	<i>Solanum verbosifolium</i>	Berejena	Dolor de muelas	Hojas	Cocción	Local (vaporizaciones)
	<i>Physalis ricandroides</i>	Tomatón	Analgésico en dolor de muelas	Raíz	Cocción	Enjuague bucal
	<i>Solanum americanum</i>	Hierba Mora	Evita el malestar de la dentición en niños pequeños	Hojas	Cocción	Oral (tomado)
Verbenaceae	<i>Lippia umbellata</i>	Salvia alla Tabaquillo	Dolor de muelas	Hojas	Cocción	Oral (tuchos)

COMPOSICION QUIMICA DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

La familia Euphorbiaceae ha atraído la atención por su abundancia y diversidad, ya que se encuentra compuesta por más de 7000 especies.

Uno de los procedimientos que ayuda a la clasificación de las especies y que va cobrando mayor importancia es la quimiotaxonomía, la cual se basa en la presencia de ciertos metabolitos secundarios como posibles marcadores para caracterizar géneros, y en algunas otras ocasiones especies.

Esta familia produce una amplia gama de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran frecuentemente sustancias terpenoides, particularmente lactonas sesquitérpenicas cuyo aislamiento ha contribuido a esclarecer su taxonomía.

Estas moléculas constan de 15 átomos de carbono y se ha propuesto un esquema biosintético para su formación, a través de la condensación de 3 unidades de isopreno con subsecuentes ciclizaciones y transformaciones oxidativas para formar un anillo de lactona cis, ó 1- trans. Estas sustancias han despertado mucho interés, debido a que un gran número de ellas presenta cierta actividad biológica como anticancerígenas, inhibidores de crecimiento microbiano y vegetal.

Los diterpenos tóxicos de la familia Euphorbiaceae poseen principalmente los esqueletos de tiglianos, dafnanos, e ingenanos. (Fig.1) (23).

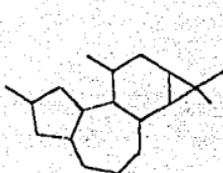
El primer compuesto aislado de ésta serie fue el forbol (24), él cual se encuentra en el grupo de los tiglianos. Los tiglianos se encuentran constituidos por un anillo de 5 miembros (A), normalmente enlazado en trans a un anillo de 7 miembros (B). El anillo C, es de 6 miembros y el anillo D, de ciclopropano se encuentra en posición cis. Los tiglianos se encuentran en las plantas como ésteres diterpenicos polihidroxilados. Los diterpenos dafnanos son compuestos tricíclicos, en los cuales el anillo D, del núcleo tigliano se encuentra abierto para formar una cadena lateral de isopropenilo.

Los diterpenos daftanos generalmente, se encuentran en las plantas como orto-ésteres, pero también pueden ser encontrados en forma orto-acilado.

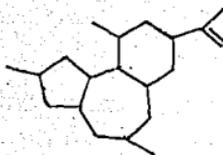
Los ingenanos son un grupo grande de diterpenos tetracíclicos relacionados a los tiglianos, solo que difieren en que el anillo C, es de 7 miembros, mostrando un centro cuaternario en el carbono 10 de la estructura (23).

Un gran número de diterpenos se encuentran muy relacionados estructuralmente a los compuestos tóxicos, encontrados en las plantas de la familia Euphorbiaceae. Estas sustancias se encuentran también en las plantas como derivados oxigenados esterificados en una ó más posiciones.

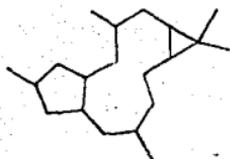
Muchos de éstos diterpenos son macrocíclicos (**Fig.1**) Estos diferentes tipos de diterpenos se encuentran estructuralmente relacionados a los casbanos, jatrolanos, latiranos, jatrolonas, crofolanos, y ramnofolanos (**Fig.1**) (25), (26),(27),(28),(29).



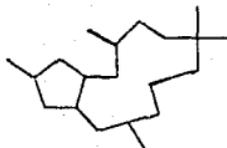
Tigliano



Dafnano



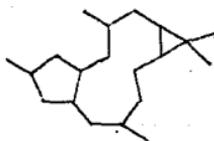
Latirano



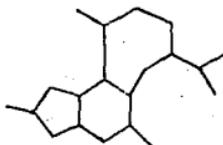
Jatrofano-A



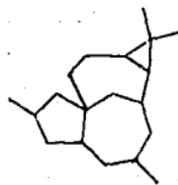
Jatrofano-B



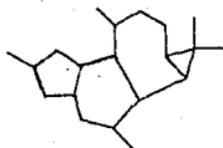
Casberno



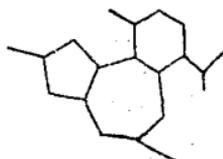
Crotofolano



Ingenano



Jatrofolona



Ramnofolona

Fig. 1. Tipos estructurales de diterpenos de la familia Euphorbiaceae

RELACION BIOSINTETICA

Recientemente se ha encontrado que el diterpeno macrocíclico, casbano (Fig.2) (30), fué producido de geranil-geranilo en cultivo de células de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae).

El casbano ha sido considerado como el precursor de los diterpenos policíclicos y polifuncionales del tigliano, dafnano, e ingenano.

Otros diterpenos macrocíclicos pueden ser intermedios en éste proceso de biosíntesis (31). Esto es posible, de acuerdo a Adolf y Hecker, ya que el tipo jatrofano puede ser formado en la planta a partir de un catión cembreno; ó alternativamente por apertura del anillo de ciclopropano de un precursor casbano (Fig.2).

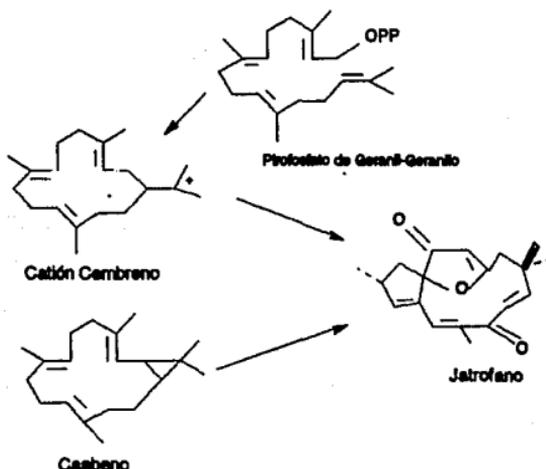


Fig. 2: Biosíntesis de Diterpenos Jatrofanos.

Los esqueletos hidrocarbonados de casbano y su análogo saturado casbano, pueden ser considerados como los precursores biogénicos de un gran número de diterpenos macrocíclicos, como los latiranos (Fig.3).

Algunos latiranos, pueden entonces, ser producidos oxidativamente de los jolkinoles (32).

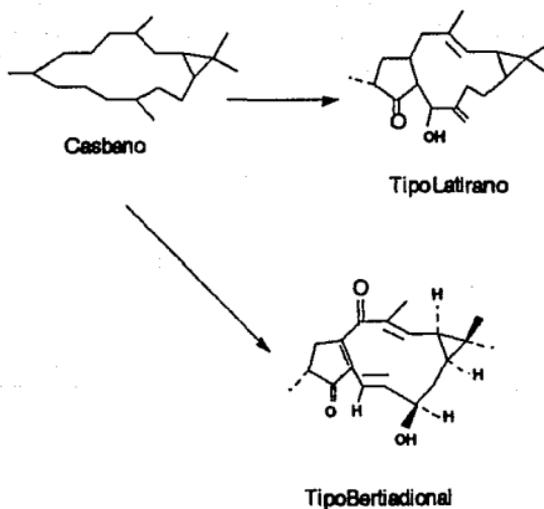


Fig. 3: Formación Biogénica de Diterpenos Tipo Macrocíclicos de la Forma Casbano.

La importancia toxicológica del grupo tigliano es derivada del esqueleto latirano (Fig.4).

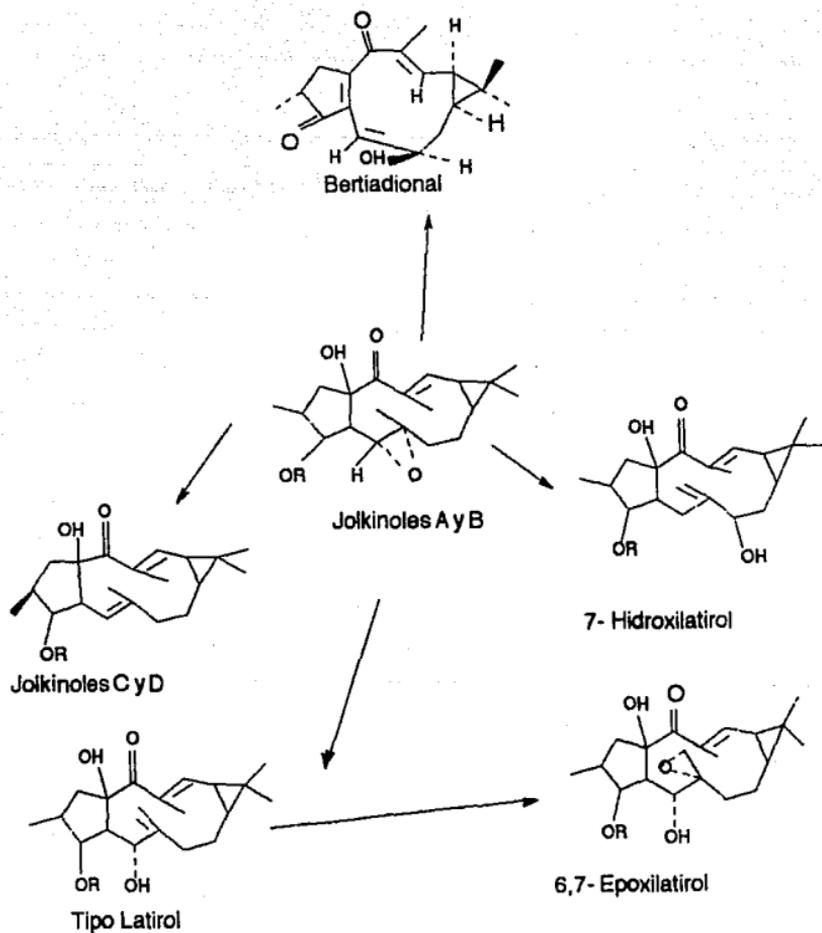


Fig. 4: Biosíntesis de diterpenos latiranos

DITERPENOS MACROCICLICOS

1) Tipo Jatrofano:

Los diterpenos macrociclicos del tipo jatrofano han sido aislados de un gran número de especies de euforbiaceas, como puede apreciarse en la siguiente tabla:

Diterpenos	Fuente Natural	Referencia
Jatrofona	<i>Jatropha gossypifolia</i>	(33)
Jatrofatriona	<i>Jatropha macrorhiza</i>	(34)
Eufornina	<i>Euphorbia maddenii</i>	(35)
Kansuinina A	<i>Euphorbia kansui</i>	(27), (36)
Kansuinina B	<i>Euphorbia kansui</i>	(27), (36)

Estos compuestos se caracterizan por la ausencia de el anillo ciclopropano, y también presentan una elevada actividad antitumoral. El primer miembro de éste grupo la Jatrofona, fué aislado de las raíces de *Jatropha gossypifolia*.

El análisis de rayos-X demostró que la jatrofona contiene un doble enlace cis-5,6 y una configuración trans para los dos dobles enlaces restantes en la estructura macrociclica (Fig. 5) (33). Un segundo compuesto antitumoral fué recientemente aislado de *Jatropha macrorhiza*. Este compuesto, es conocido como jatrofatriona (Fig. 5), el cual consiste de un anillo de 5 miembros y un anillo de 9 miembros. La configuración absoluta de la jatrofatriona se determinó por métodos de rayos-X (37).

Las kansuininas (Fig. 5), representan dos diterpenos altamente oxigenados de el tipo jatrofano, las cuales fueron aisladas de *Euphorbia kansui*. La estructura de la kansuinina B, se determinó por métodos de rayos-X (35).

La estructura de la kansuinina A se determinó por datos químicos y espectroscópicos (35).

La eufornina (Fig.5), y ambas kansuininas mostraron propiedades analgésicas y propiedades antitumorales en ratones (38).

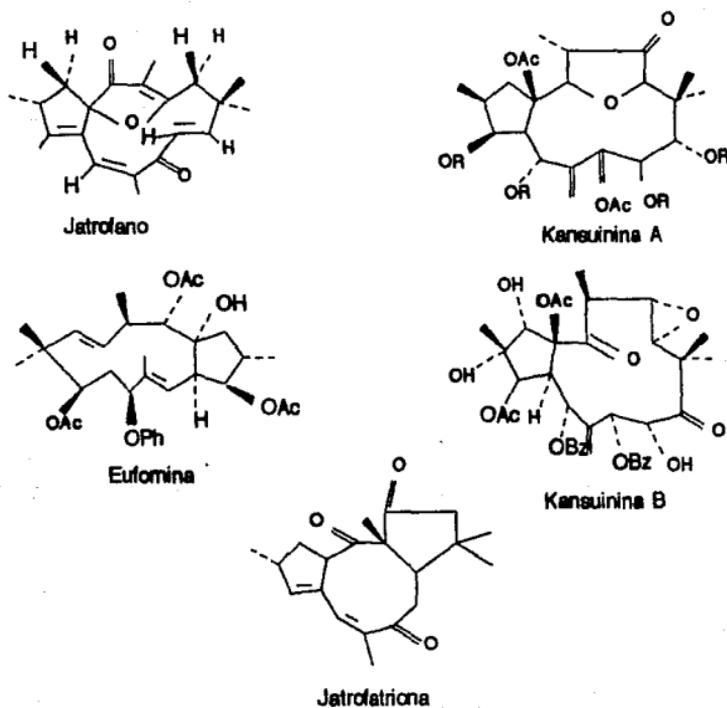


Fig. 5. Diterpenos jatrolanos

2) Tipo Latirano:

Los diterpenos latiranos son numéricamente el grupo más grande de compuestos macrocíclicos aislados de la familia Euphorbiaceae. Se han aislado tres sustancias, conocidas como L₁, L₂, L₃ de las semillas de *Euphorbia latiris* (1). El compuesto L₁, fué caracterizado como un éster del 6,17-epoxilatirol (Fig.6) (38).

El compuesto L₂, se identificó como un tetra éster del 7-hidroxiatirol (39), y el compuesto L₃ como un tri-éster de latirol (Fig.6) (36).

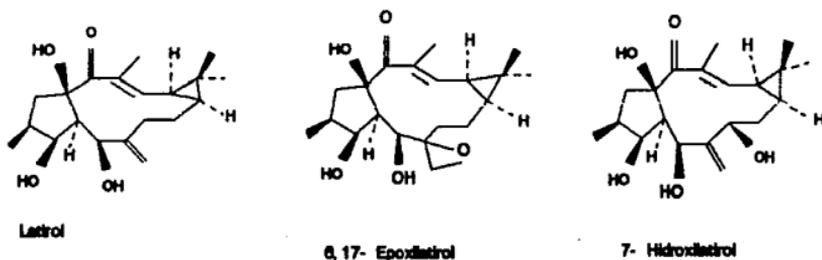


Fig. 6:Diterpenos latiranos

3) Tipo Jatrofolano y Crotofolano:

Los diterpenos jatrofolanos y crotofolanos se encuentran estrechamente relacionados y son obtenidos de las especies *Jatropha* y *Croton* (Euphorbiaceae). La diferencia entre ellos es que, en los crotofolanos el anillo ciclopropano del núcleo de jatrofolona ha sido abierto por un isopropileno en la cadena (Fig.7).

Las jatrolonas A y B se aislaron de las raíces de *Jatropha gossypifolia* (40).

La estructura de la jatrolona B, fué determinada por análisis de rayos-X del acetato correspondiente. La jatrolona A fué reconocida como el epímero C-2 de la jatrolona B, ya que el tratamiento con base débil de cualquiera de los dos compuestos proporciona una mezcla equimolar de ambos (Fig.7).

El núcleo de crotofolano esta representado por la crotofolina (Fig.7) aislada de *Croton corylifolius*. La estructura y configuración relativa de la crotofolina fué determinada por rayos-X. El anillo de ciclohexano se encuentra fusionado en trans al anillo de 7 miembros.

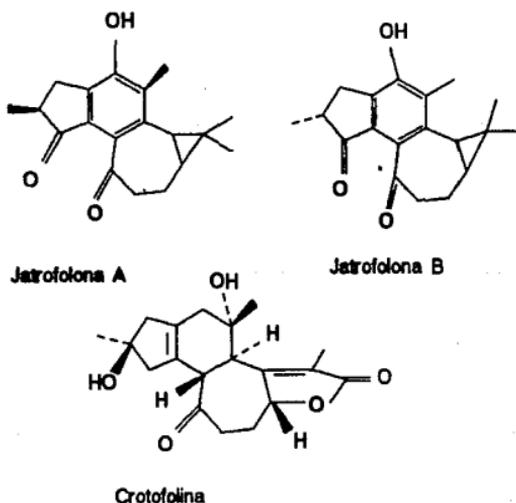


Fig. 7: Diterpenos Jatrolanos y Crotofolanos.

METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO *Jatropha*

De las diferentes especies que han sido descritas para el género *Jatropha*, se tienen muy pocos estudios fitoquímicos. Tomando en cuenta éste antecedente se mencionan los siguientes metabolitos secundarios para dicho género.

De las raíces de *Jatropha gossypifolia* se han aislado dos lignanos, el 2-piperonilideno-3-veratril-3R-butirolactona (1) y la gadaína (2), cuyas estructuras se han confirmado por análisis de rayos-X (41).

De las raíces de ésta planta se han aislado dos diterpenos, la jatrololona A (3) y su epímero en C-2, la jatrololona B (4) con su esqueleto de casbeno incorporando una sustitución total en el anillo de cresol (42) y la fraxetina (5) (43).

De el látex de *Jatropha multifida* se han aislado e identificado dos compuestos, el multifidol (6) (2-metilbutirilfloroglucinil) y el mutifidol glucósido (7) 1-(2-metilbutiril floroglucinil) - β -D-glucopiranosida, los cuales han mostrado actividad inmunológica en el extracto metanólico (44).

De *Jatropha macrohiza*, se ha aislado un alcaloide que presenta actividad antitumoral, el jatrofano (8) que es un alcaloide lactámico, un triterpeno pentacíclico, el ácido acetil aleurólico (9) el cual en diversas pruebas mostró propiedades antitumorales.

De *Jatropha podagrica* se aisló tetra metil-pirazina (10) (45).

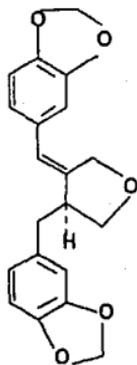
De las raíces de *Jatropha gossidentata*, se han aislado dos derivados epiméricos de ramnofolano (11),(12), cuyas estructuras químicas se han determinado por espectroscópia. (46).

Los diterpenos aislados de *Jatropha gossidentata* son el jatrogrossidiona (18) y el 2-epi-isojatrogrossidiona (19). Además de 2-hidróxi-isojatrogrossidiona y el 2-epi-hidróxi-isojatrogrossidiona (13-24).

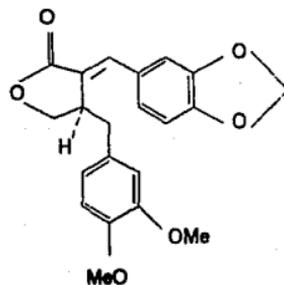
De las raíces de *Jatropha dioica* se ha aislado riolozatriona (25),

citlaltiriona (26), jatrololona B (4), β -sitosterol (27) (10), (11). De las cuales la riolozatriona, ha mostrado actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (Dominguez X.A. y Espinosa).

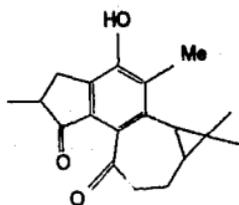
Además, algunos estudios realizados en la Universidad Autónoma de Zacatecas parecen indicar que los extractos hexánicos de la raíz de *Jatropha dioica* presentan cierta actividad antimicrobiana sobre microorganismos causantes de la placa dental (Comunicación personal con el M. en C. Ernesto Escareño) (47).

METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO *Jatropha*

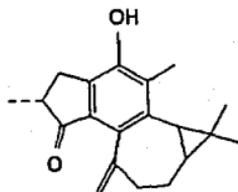
(2)



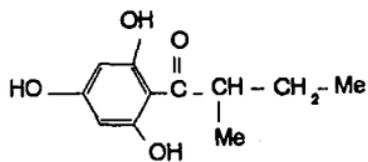
(1)



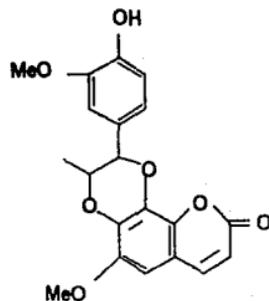
(3)



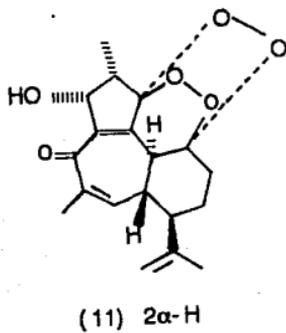
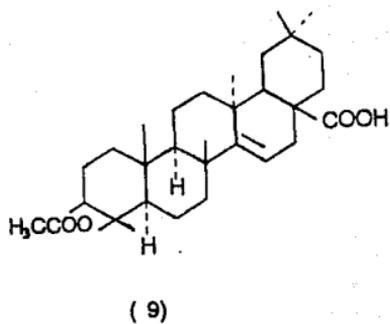
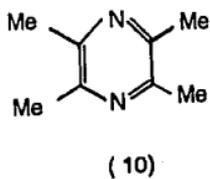
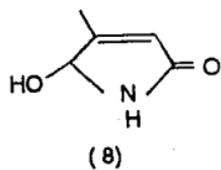
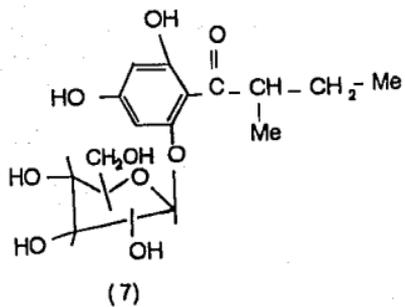
(4)

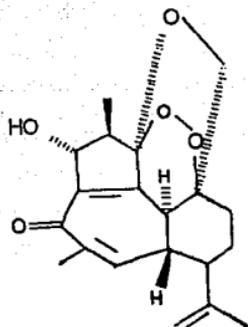
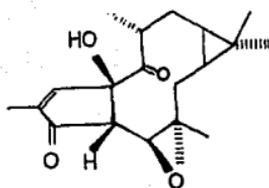


(6)

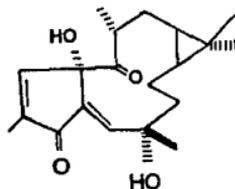
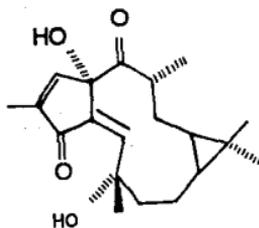
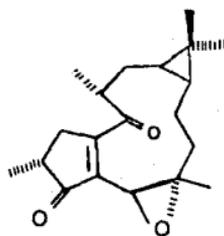


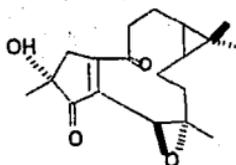
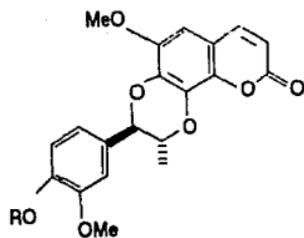
(5)



(12) 1,11- bis-*epi*

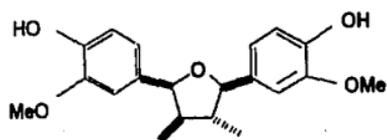
(13)

(14) 15 β -OH(15) 15 α -OH(16) 15 β -OH(17) 15 α -OH(18) 2 α -H(19) 2 β -H

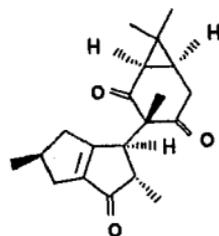
(20) R= 2 α -OH(21) 2 β -OH

(22) R= 14-H

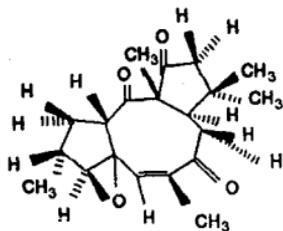
(23) 14-Ac



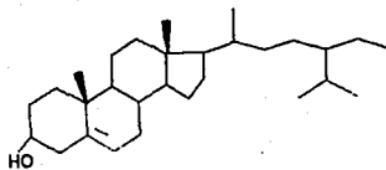
(24)



(25)



(26)



(27)

PARTE EXPERIMENTAL

La determinación de las constantes físicas y espectroscópicas se determinaron en los siguientes aparatos:

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Jones y se reportan sin corregir.

Los espectros de Infrarrojo (IR), se determinaron en un espectrómetro Perkin elmer 283 empleando la técnica de pastilla y en el espectrómetro Nicolet FT-IR5-SX, empleando la técnica de solución, las absorbancias máximas se dan en cm^{-1} .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN^1H), se realizaron en un aparato Varian Gemini-200 a 200 MHz en CDCl_3 , el desplazamiento químico δ se indica en ppm seguido por las interpretaciones entre paréntesis, hidrógenos para los que se integra, tipo de señal (singulete,s; doblete,d; triplete,t; etcétera) y la constante de acoplamiento en Hz. Como referencia interna se utilizó el tetrametil silano (TMS).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN^{13}C), se realizaron en un aparato Varian-300 S.

Los espectros de Espectrometría de Masas (EM), se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985 B, mediante la técnica de impacto electrónico.

El análisis de difracción de Rayos-X para los compuestos obtenidos, se llevó a cabo en un difractómetro de Rayos-X Nicolet modelo P3.

La separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se realizó en un cromatógrafo Varian 8500, sobre una columna de Si-10 de 2.5 cm. por 2.2 mm.

Para la determinación de la pureza de los productos y el desarrollo del fraccionamiento se emplearon cromatoplasmas de Sílica Gel SILG-UV 254 de

0.25 mm. de espesor, usando como reveladores, la lámpara de luz ultravioleta, solución de sulfato cérico al 1.0% en ácido sulfúrico 2N, y solución de 2,4 dinitro fenil hidrazina. Para la cromatografía en columna, se utilizó sílica gel 60 (35-70 mesh) ASTM y Sílica Gel 922 (200-325 mesh) ambas de marca Merck. Para la cromatografía en capa fina preparativa se utilizaron cromatofolios de Sílica Gel 60 F-254 de 2.0 mm. de espesor marca Merck.

Material Vegetal:

Para la realización de éste trabajo se utilizaron dos poblaciones de la raíz de *Jatropha dioica*, las cuales fueron colectadas en dos diferentes estados de la República Mexicana. Una de un lugar cercano a la ciudad de Zacatecas (Zacatecas) y la otra de San Miguel de Allende (Guanajuato) durante Febrero de 1991 y Enero de 1992, respectivamente. El material vegetal de ésta planta, se corto en pequeños trozos y se secó a temperatura ambiente.

Extracción del Material Vegetal:

Para realizar la extracción del material vegetal solo se utilizaron los disolventes metanol y agua. 3.5 kg. del material vegetal se extrajeron sucesivamente con metanol y agua. Se hicieron cuatro extracciones a temperatura ambiente, por períodos de 24 hrs., hasta un volumen total de 5.0 litros.

Extracto Metanólico:

El extracto metanólico se concentró a vacío, se obtuvieron aproximadamente 75.0 gramos de una pasta rojiza, inodora que posee un sabor característico (amargo-astringente), del que se hidrolizó una parte y otra se trabajó, en la separación de sus componentes.

La hidrólisis se realizó con 3.0 gramos de extracto metanólico, disueltos en metanol, ácido clorhídrico concentrado, se calentó en baño de vapor durante 2.5 hrs. dejándose enfriar, y posteriormente se extrajo con cloruro de metileno, la parte orgánica se concentró a vacío, obteniéndose un líquido de color amarillo.

Extracto Acuoso:

El extracto acuoso se evaporó a sequedad en un recipiente abierto, de vidrio, sobre baño de vapor, y se obtuvieron aproximadamente 250.0 gramos, de un sólido amorfo de color café-rojizo, el cual no presenta el sabor característico del extracto anterior.

Determinación de la Actividad Antimicrobiana:

A los extractos obtenidos, metanólico, acuoso, y el producto de hidrólisis del extracto metanólico, se les realizó el estudio de actividad antimicrobiana, utilizando para ello los diferentes microorganismos de prueba.

Para la detección de ésta actividad, se utilizaron los siguientes microorganismos:

Microorg. gram positivos	Levaduras	Microorg. gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>		<i>Salmonella typhi</i>
		<i>Pseudomona aeruginosa</i>

Los extractos, fracciones y compuestos aislados se analizaron de manera independiente, para determinar su potencial antimicrobiano.

Las muestras se ensayaron a diferentes concentraciones (50,25,20,10 μ g/ml) utilizando para ello el método por difusión de discos. Cada concentración se hizo por triplicado, y para cada muestra se preparó un testigo.

Las bacterias se cultivaron en un medio adecuado (en éste caso el medio utilizado fué agar Iso-Sensitest), y se incubaron de acuerdo con sus características, hasta obtener una densidad adecuada. Estos cultivos son utilizados para realizar la prueba de sensibilidad por difusión de discos.

Para ello se vierten en la caja Petri 14.0 ml. del medio anteriormente mencionado, y posteriormente se añaden 4.0 ml. del mismo medio, pero, inculados con los microorganismos de prueba. Se colocan los discos absorbentes (6 discos por cada caja), y se adiciona la concentración correspondiente a la dosis de trabajo (50,25,20,10 μ g/ ml.) de las diferentes fracciones obtenidas. Para realizar la prueba, las fracciones se disuelven en los diferentes disolventes utilizados, en éste caso se uso cloruro de metileno, metanol, y agua.

Las cajas Petri se incuban a 35 $^{\circ}$ C durante un período de tiempo adecuado (18-24 hrs.), después del cual se midió el halo de inhibición formado alrededor de los discos (Cuadro 1).

Cuadro I: Evaluación antimicrobiana de los extractos metanólico y acuoso

Extracto	Dosis (%/ml.)	Microorganismos				Levaduras <i>C. albicans</i>
		gram positivos		gram negativos		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Diámetros de inhibición (cm.)						
Metanólico	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	2.0	No hubo inhibición
Acuoso	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	2.0	No hubo inhibición
Testigo (Cloruro de metileno)	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.2	No hubo inhibición

FRACCIONAMIENTO "BIODIRIGIDO" DE LOS EXTRACTOS METANOLICO, ACUOSO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS

Para llevar a cabo dicho fraccionamiento se siguieron los procedimientos I y II para los diversos extractos.

Procedimiento I: Extracto Metanólico

Se realizó la separación de los componentes del extracto metanólico, empleando la metodología descrita por Villareal y colaboradores (11).

Una vez que se obtuvo el extracto metanólico de *Jatropha dioica* se pesaron 8.5 gramos, se colocaron en un embudo de separación y fueron extraídos con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (9:3). La solución color café claro de cloruro de metileno se secó, con sulfato de sodio anhidro y se evaporó. El residuo (2.2 gr.) fué sujeto a cromatografía en capa fina preparativa,

utilizando para ello hexano/acetato de etilo (8:2) como eluyentes, y sulfato cérico al 1.0% en ácido sulfúrico 2N como revelador, obteniéndose cinco diferentes fracciones (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5) las cuales se extrajeron de la sílica con acetato de etilo, se evaporaron y fueron evaluadas en su actividad antimicrobiana y también se procedió a su purificación química.

De éstas fracciones se determinó por cromatografía en capa fina que se trataba de por lo menos dos componentes, en cada una, por esta razón se realizó la separación de la F_1 por HPLC, (fase móvil hexano/ acetona (8:2)).

Se aisló una fracción F_1^* (28 mg.) y otra fracción F_1^{**} (en cantidad no suficiente).

Al realizar la comparación de F_1^* por CCF con F_1 se observó que tenían R_f s semejantes, por lo que no hubo buena separación por HPLC, y esto nos llevo a cambiar de método de separación.

Se realizó la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas, de manera independiente sobre microorganismos gram positivos y gram negativos, de acuerdo con la metodología citada anteriormente (Cuadro 2).

Cuadro 2: Evaluación antimicrobiana de las fracciones del extracto metanólico por procedimiento I

Fracción	Microorganismos				
	Dosis (µg/ml)	gram positivos			gram negativos
		<i>S. aureus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Diámetros de inhibición (cm.)					
Metanólica	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	2
Fracción 1	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.4
Fracción 2	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.4
Fracción 3	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.4
Fracción 4	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.4
Fracción 5	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.4
Testigo (Cloruro de metileno)	50	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	1.2

Procedimiento II: Extracto Metanólico

Para seguir este procedimiento se utilizaron las raíces de *Jatropha dioica* de las dos regiones de la República Mexicana en estudio, Zacatecas y Guanajuato.

El extracto metanólico, se separó empleando cromatografía relámpago, empacada con Silica Gel No. 200-325 mallas (Merck). 5.0 gramos del extracto metanólico se colocaron en la columna cromatográfica con un sistema de elución de hexano/acetona, con incremento de polaridad. Se colectaron volúmenes de aproximadamente 250.0 ml., obteniéndose 30 fracciones.

El seguimiento de la separación por cromatografía se realizó por CCF (hexano/acetona 7:3) y usando como revelador 2,4 dinitro fenil hidrazina.

En las fracciones eluidas con hexano/acetona (9:1), se aislaron dos compuestos cristalinos, uno en mayor cantidad que el otro.

El componente químico, aislado en mayor cantidad (compuesto A), se obtuvo como cristales en forma cúbica, transparentes, solubles en acetona con un Rf. de 0.41 (hexano/acetona 7:3) y un punto de fusión de 193⁰-195⁰C. A dicho compuesto se le realizaron los espectros correspondientes de IR, RMN¹H, RMN¹³C, espectrometría de masas, los cuales se describen en la parte de discusión de resultados.

El componente químico, obtenido en menor cantidad (compuesto B), se aisló como cristales en forma de aguja, transparentes, solubles en acetona, con un Rf. de 0.47 (hexano/ acetona 7:3) y un punto de fusión de 232⁰-235⁰C. A éste compuesto, también se le realizaron los espectros correspondientes de IR, RMN¹H, RMN¹³C, , y Espectrometría de Masas que se describen en la parte de discusión de resultados.

El producto de hidrólisis resulto ser un polvo amarillento, amorfo.

Se determinó la actividad antimicrobiana, a las diferentes fracciones obtenidas, a los compuestos cristalinos aislados, y al producto de hidrólisis.

Dicha evaluación se realizó de manera independiente sobre microorganismos gram negativos, de acuerdo con la metodología citada anteriormente (Cuadro 2A).

Cuadro 2a: Evaluación antimicrobiana de las fracciones del extracto metanólico por procedimiento II

Número de fracción	Dosis (µ/ml)	Microorganismos gram negativos		
		<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		Diámetro de inhibición (cm.)		
1	20	0.9	0.9	1.0
2	20	0.9	0.8	1.0
3	20	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición
4	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
5	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
6	20	No hubo inhibición	0.9	No hubo inhibición
7*	20	0.9	No hubo inhibición	No hubo inhibición
8**	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
9	20	No hubo inhibición	0.9	No hubo inhibición
10	20	0.9	No hubo inhibición	0.8
11	20	0.8	1.0	No hubo inhibición
12	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición

NOTAS

Las fracciones 1-23 corresponden a la planta de Guajuato.

Las fracciones 1a-10a corresponden a la planta de Zacatecas.

La fracción hidrolizada corresponde al extracto metanólico.

7*, 1a* corresponde a la Citlaltlitziona.

8**, 2a** corresponde a la mezcla epimérica de Jatrololona A y B.

Número de fracción	Dosis (µg/ml)	Microorganismos gram negativos		
		<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		Diámetro de inhibición (cm.)		
13	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
14	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
15	20	0.8	0.8	No hubo inhibición
16	20	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición
17	20	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición
18	20	No hubo inhibición	0.8 inhibición	No hubo inhibición
19	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
20	20	0.8	No hubo inhibición	No hubo inhibición
21	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	0.8
22	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
23	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición

NOTAS:

Las fracciones 1-23 corresponden a la planta de Guanajuato.

Las fracciones 1a-10a corresponden a la planta de Zacatecas.

La fracción hidrolizada corresponde al extracto metanólico.

7°, 1a° corresponde a la Citralitrona.

8°, 2a°° corresponde a la mezcla epimérica de Jatrolona A y B.

Número de fracción	Dosis (%/ml.)	Microorganismos gram negativos		
		<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		Diámetro de inhibición (cm.)		
1a*	20	0.8	No hubo inhibición	No hubo inhibición
2a**	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
3a	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
4a	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
5a	20	0.8	No hubo inhibición	0.8
6a	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
7a	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	0.8
8a	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
9a	20	0.8	0.9	No hubo inhibición
10a	20	0.8	No hubo inhibición	No hubo inhibición
Hidrolizada	20	No hubo inhibición	0.9	No hubo inhibición
Testigo (Cloruro de metileno)	20	0.7	0.7	0.7

NOTAS:

Las fracciones 1-23 corresponden a la planta de Guanajuato.

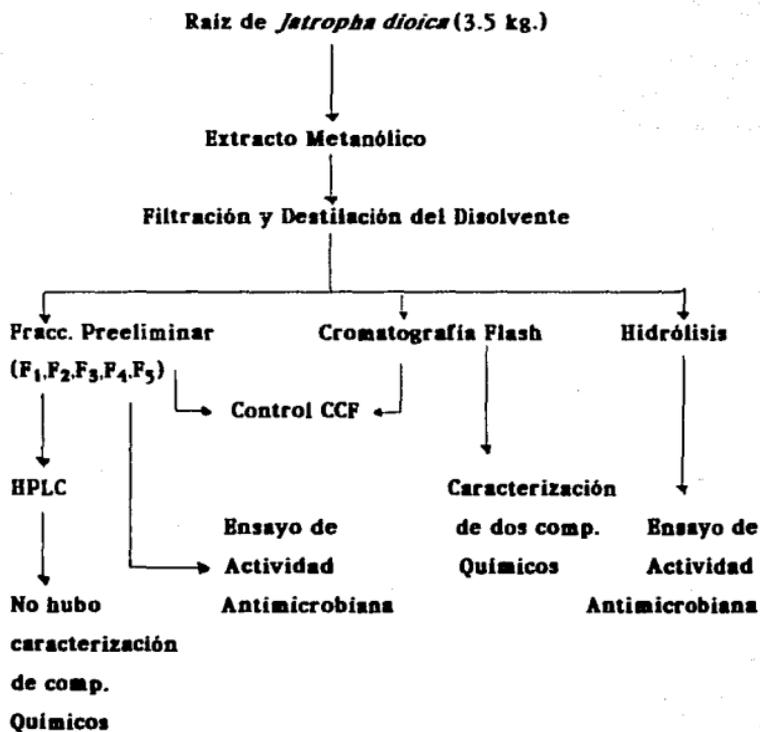
Las fracciones 1a-10a corresponden a la planta de Zacatecos.

La fracción hidrolizada corresponde al extracto metanólico.

7*, 1a* corresponde a la Citalitrona.

8**, 2a** corresponde a la mezcla epimérica de Jatrofona A y B.

Estrategia seguida para el estudio químico-biológico del extracto metanólico de *Jatropha dioica* por los Procedimientos I y II.



Procedimiento I: Extracto Acuoso

Una vez que se obtuvo el extracto acuoso de *Jatropha dioica* se realizó una cromatografía en columna empacada, con Carbón activado-Celita (5:2). Se eluyó primeramente con agua (con el objeto de eliminar carbohidratos), y luego con agua/ metanol (1:1), metanol, y acetato de etilo, respectivamente.

Las fracciones acuosas se evaporaron a sequedad, en un recipiente de vidrio abierto, sobre un baño de vapor, obteniéndose un polvo color café-rojizo, amorfo.

De las fracciones eluidas con agua/ metanol (1:1), se formó un precipitado de color amarillo, el cual se extrajo con acetato de etilo. Al evaporarse el disolvente orgánico quedó un polvo rojizo, el cual se trató de separar por CCF, utilizando como eluyentes CH_2Cl_2 / CH_3OH (9.5:0.5), encontrándose una mezcla de compuestos, no fáciles de separar (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5 , F_6) solubles en cloruro de metileno.

Las pruebas de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto acuoso, se realizaron de manera independiente, utilizando la metodología anteriormente descrita, pero en ésta ocasión solo contra microorganismos gram negativos (Cuadro 3 y Cuadro 3A).

Cuadro 3: Evaluación antimicrobiana de las fracciones del extracto acuoso por procedimiento I

Fracción	Dosis (μ g/ml)	Microorganismos gram negativos			
		<i>S. typhi</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
		Diámetros de inhibición (cm.)			
Acuosa	10	0.8	0.9	0.8	0.9
Fracción 1	10	0.8	No hubo inhibición	0.8	0.8
Fracción 2	10	0.8	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición
Fracción 3	10	0.8	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición
Fracción 4	10	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
pp. extr. AcOEt.	10	0.9	0.9	0.8	0.9
Testigo (metanol)	10	0.8	0.8	0.8	0.8

Cuadro 3A: Evaluación antimicrobiana de las fracciones
extraídas con ACOET y separadas por OCP preparativa

Fracción	Dosis (μ g/ml)	Microorganismos gram negativos			
		<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
		Diámetros de inhibición (cm.)			
pp.ext. ACOET	25	0.9	0.8	0.8	0.8
Fracción 1	25	0.7	0.7	0.65	0.7
Fracción 2	25	0.7	0.7	0.65	0.8
Fracción 3	25	0.65	No hubo inhibición	0.65	0.65
Fracción 4	25	No hubo inhibición	No hubo inhibición	0.7	No hubo inhibición
Fracción 5	25	No hubo inhibición	0.7	No hubo inhibición	No hubo inhibición
Fracción 6	25	No hubo inhibición	0.7	No hubo inhibición	No hubo inhibición
Testigo (Cloruro de metileno)	25	0.6	0.6	0.6	0.6

Procedimiento II: Extracto Acuoso

El extracto acuoso de *Jatropha dioica*, (polvo rojizo) se redisolvió en agua y se precipitó al adicionarle lentamente acetona, y a otra solución semejante etanol, resultando en cada caso un precipitado floculante, el cual se separó por filtración. Obteniéndose para cada uno, un polvo color café-rojizo, al cual se le realizó una reacción de tipo cualitativo para detectar taninos.

A cada precipitado y sobrenadantes correspondientes, se les hizo una separación por CCF preparativa eluyéndose con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (9.5:0.5). Y su respectiva prueba de actividad antimicrobiana, se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita sobre microorganismos gram negativos (Cuadro 4 y Cuadro 5).

Cuadro 4: Evaluación antimicrobiana de los precipitados del extracto acuoso por procedimiento II

Fracción	Dosis (µg/ml)	Microorganismos gram negativos			
		<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>
		Diámetros de inhibición (cm.)			
A	25	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
B	25	0.7	0.7	0.8	No hubo inhibición
A1	25	0.7	0.7	0.8	0.7
B1	25	0.7	0.8	No hubo inhibición	0.7
Ext. Acuoso (Original)	25	0.8	0.7	0.7	0.9

Cuadro 5: Evaluación antimicrobiana de precipitados y sobrenadantes del extracto acuoso y separado por CCF preparativa

Fracción	Dosis (μ /ml)	Microorganismos gram negativos			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		Diámetros de inhibición (cm.)			
B	20	0.7	0.65	0.8	0.7
B1	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
F1(B1)	20	0.7	0.7	0.8	0.7
F1(B)	20	0.7	0.65	0.65	No hubo inhibición
A	20	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición	No hubo inhibición
A1	20	0.7	0.7	0.8	0.7
F1(A)	20	No hubo inhibición	0.8	1.0	1.0
F1(A1)	20	No hubo inhibición	0.8	No hubo inhibición	No hubo inhibición

Prueba de Taninos: Reacción de Stiasny (48).

Mediante ésta método se detecta a que grupo de taninos pertenece el tanino contenido en el material vegetal. La forma de realizar la prueba es la siguiente:

Filtrar la solución, para evitar la interferencia de sólidos insolubles que puedan influir en la determinación.

Dentro de un matraz erlenmeyer de 50 ml., se adicionaron 5.0 ml. del extracto acuoso (filtrado), 15.0 ml. del reactivo de Stiasny, se tapó el matraz con una torunda de algodón y se llevó a baño maría durante 30.0 min. Se apreció la aparición de un precipitado flocculento rosado, que indicó la presencia de taninos condensables. La solución se dejó enfriar, se filtró y se saturó el líquido filtrado con acetato de sodio en polvo, luego se adicionó a éste unas gotas de cloruro férrico al 1,0%, dejándolas resbalar por las paredes del matraz.

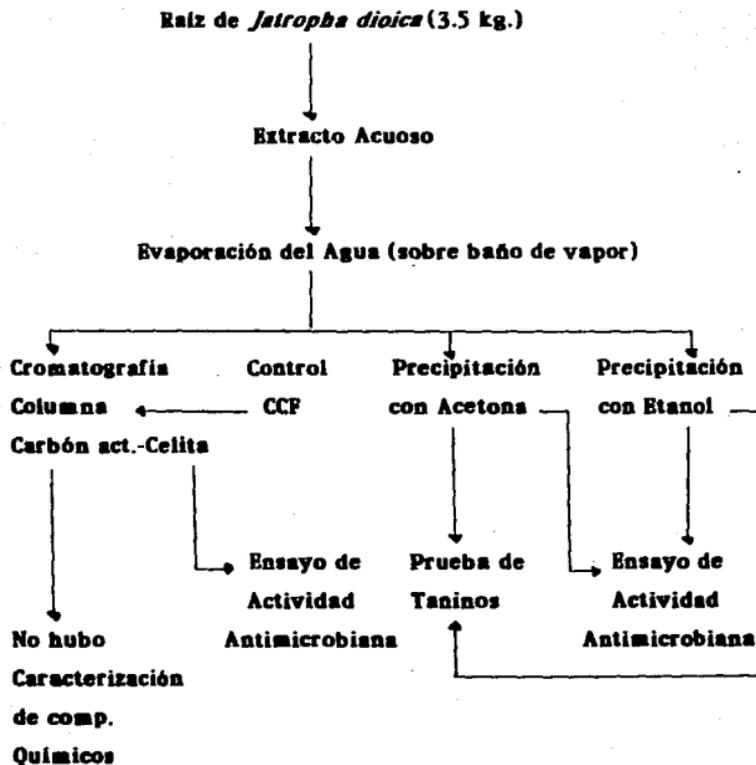
No se observó reacción alguna, por lo que se descartó la presencia de taninos hidrolizables.

Reactivo de Stiasny:

Solución de Formaldehído 40%100 ml.

Acido Clorhídrico concentrado50 ml.

Estrategia seguida para el estudio químico-biológico del extracto acuoso de *Jatropha dioica* por los Procedimientos I y II.



DISCUSION DE RESULTADOS

Los extractos de *Jatropha dioica* var. sessiliflora (Hook) han sido utilizados en la medicina tradicional de México, para el tratamiento de dolor de muelas y cáncer en la piel (8).

Recientemente se ha hecho énfasis en la detección de los metabolitos responsables de la actividad farmacológica de ésta planta y paralelamente a ellos se evaluaron los extractos como agentes antimicrobianos, obteniéndose buenos resultados, pero ésta no es una información completa ni reproducible por los mismos autores (11).

Por comunicación personal con el M. en C. Ernesto Escareño Piña (47), sabemos que en la Universidad Autónoma de Zacatecas, se han probado los extractos hexánicos de la raíz de *Jatropha dioica*, contra bacterias asociadas a la inflamación de las encías.

Estas investigaciones y resultados nos alentaron a realizar éste estudio químico-biológico, "biodirigido" de ésta planta, evaluando extractos y compuestos aislados, sobre diferentes microorganismos como los gram negativos, que actualmente se ha detectado, son los causantes en su mayoría de los casos de la gingivitis en la población adulta, además de otros padecimientos odontológicos.

Durante la revisión bibliográfica efectuada, se encontró que la actividad antimicrobiana de *Jatropha dioica* se concentra principalmente en la raíz, ésto hace pensar que al requerir de material vegetal en grandes cantidades se ponga en peligro de extinción ésta especie.

Estas observaciones nos llevan a reflexionar y a concientizarnos sobre el uso de nuestros recursos naturales, en tal forma que se evite la pérdida de la biota de nuestro país.

A continuación se describen cada uno de los fraccionamientos a que fueron sometidos los extractos, metanólico y acuoso de la raíz de *Jatropha dioica* así

como los resultados obtenidos en la determinación de la evaluación antimicrobiana de las fracciones más polares.

Parte Química: Extracto Metanólico

Se decidió cambiar el método inicial de separación de los extractos (Procedimiento I, en la parte experimental) porque no se obtuvieron los mejores resultados. Entonces se usó la separación por cromatografía relámpago. Con 5.0 gramos de extracto metanólico se obtuvieron dos productos puros, compuesto A y compuesto B.

El primer compuesto aislado, (A) se obtuvo en forma de cristales cúbicos, transparentes, solubles en acetona, con un Rf. de 0.41 (hexano/acetona 7:3) y un punto de fusión de 193^o-195^oC.

Su espectro de IR (espectro 1) mostró bandas características para grupo cetona de cinco miembros (C=O), en 1748 cm⁻¹, y para grupo carbonilo α,β no saturado (C=O), en 1696 cm⁻¹ además de las bandas características para doble ligadura.

El espectro de masas (espectro 2) muestra un pico a m/z 314 (M⁺) que se tomó como ión molecular.

A continuación se resumen los datos obtenidos por RMN¹H (espectro 3) y por RMN¹³C (espectro 4) para el compuesto A, que son idénticos a los de la Citlálitrona aislada por X. Domínguez (60).

Cabe señalar que las asignaciones hechas para los diferentes átomos, se realizaron en CDCl₃ a 200 MHz y los encontrados para Citlálitrona se obtuvieron en Me₂CO-d₆ para RMN¹H y C₆H₆-d₆ para RMN¹³C a 500 MHz.

Tabla de datos de RMN¹H para el compuesto A.

RMN ¹ H Asignado al Compuesto A (200 MHz CDCl ₃)		RMN ¹ H de Citralitrona (500 MHz Me ₂ CO-d ₆)	
Atomo	δ (ppm)	Atomo	δ (ppm)
H-5	5.5	H-5	5.48
H-15	3.65 J(1β,15)= 9	H-15	3.55 J(1β,15)= 9.4
H-3	3.29	H-3	3.09
H-9	2.95 J(8β,9)= 14.6	H-9	3.16 J(8β,9)= 14.1
H-8β	2.65(q)	H-8β	2.50 J(8α,8β)= -13.9
H-8α	2.34(q) J(8α,9)= 3.8	H-8α	2.47 J(8α,9)= 2.8
H-11β	2.37(q)	H-11β	2.37 J(11α,11β)= -17.4
H-11α	2.52	H-11α	2.30
H-2	2.05	H-2	2.23 J(2,3)= pequeña
Me-17	1.95 J(5,17)= 1.6	Me-17	1.94 J(5,17)= 1.8
H-1β	1.95	H-1β	1.85 J(1α,1β)= -13.7
Me-20	1.44	Me-20	1.37
Me-19	1.27	Me-19	1.30 J(11β,19)= pequeña
H-1α	1.34	H-1α	1.21 J(1β,16)= pequeña
Me-16	1.13	Me-16	1.10 J(1β,16)= pequeña
Me-18	0.97 J(2,16)= 7.6	Me-18	0.96 J(2,16)= 7.5

Tabla de datos de RMN¹³C para el compuesto A.

RMN ¹³ C Asignado al Compuesto A (200 MHz CDCl ₃)		RMN ¹³ C de Citralitriona (500 MHz C ₆ H ₆ -d ₆)	
Atomo	δ(ppm)	Atomo	δ(ppm)
12614	217.15	12614	216.8
12614	215.41	12614	215.1
7	208.31	7	208.1
6	145.46	6	144.9
5	128.13	5	128.9
3	72.82	3	72.5
4613	67.53	4613	67.9
4613	65.67	4613	65.7
11	55.71	11	55.5
9	52.86	9	52.9
15	46.61	15	46.8
8	37.94	8	38.1
10	37.51	10	37.1
1	35.22	1	35.0
2	34.88	2	34.3
18619	28.44	18619	27.8
18619	23.37	18619	23.3
17	20.29	17	20.3
16	16.27	16	16.2
20	14.73	20	14.9

Análisis Cristalográfico de Rayos-X para el Compuesto A

La estereoquímica del compuesto A fué establecida mediante difracción de Rayos-X de la siguiente manera.

Un cristal del compuesto A fué montado en un difractómetro automatizado NICOLET P3. Tamaño del cristal $0.2 \times 0.2 \times 0.3$ mm. Dimensiones de la celda unitaria: $a=10.92 \text{ \AA}$ (4), $b=12.132 \text{ \AA}$ (5), $c=13.59 \text{ \AA}$ (5), (ortorrómbico $P2(1)2(1)2(1)$) fué determinado por afinamiento de mínimos cuadrados de las mejores posiciones angulares para 25 reflexiones independientes en el rango $5^\circ < 2\theta < 14^\circ$ usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54178 \text{ \AA}$).

Los datos (115 reflexiones), fueron colectados a temperatura ambiente, usando un modo de escrutinio de $\theta / 2\theta$ a un valor máximo de 2θ de 100° .

Las intensidades de dos reflexiones estándar fueron medidas cada 48 reflexiones y como mostraron menos de 3.0% de variación (1.0537), las correcciones para decaimiento se consideraron innecesarias. Las intensidades fueron corregidas para efectos de Lorentz y polarización, pero no para absorción. Un total de 1060 reflexiones se consideraron observadas (1060F 3.0 σ para F).

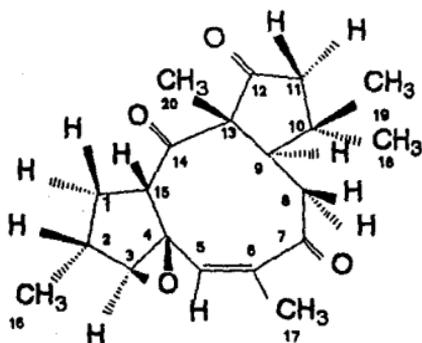
La estructura fué resuelta por métodos directos incluidos en SHELXTL para los 20 átomos diferentes de hidrógeno que tiene la estructura.

Ciclos sucesivos de afinamiento por mínimos cuadrados, seguidos por síntesis de Fourier, permitieron localizar los átomos diferentes de hidrógeno restantes. Los afinamientos de factor de escala, parámetros posicionales y térmicos anisotrópicos para todos los átomos diferentes de hidrógeno se llevaron a cabo por convergencia, minimizando la función, $\sum W|I/\sigma^2(F) + 0.005500^2 F^2|$. Todos los átomos de hidrógeno unidos a carbono fueron localizados a posiciones geométricas con $U=0.06 \text{ \AA}^2$ constante.

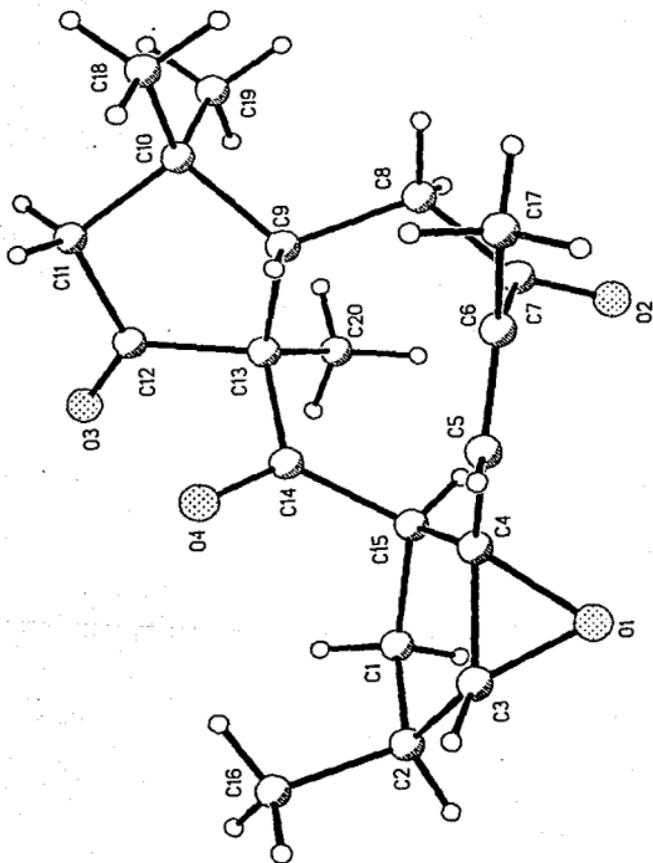
El átomo de hidrógeno hidroxílico se localizó por una síntesis de diferencia de Fourier a etapa avanzada y refinado isotrópicamente. El ciclo final de

afinaciones dió un factor de concordancia de $R=0.0714$ ($R_w=0.0774$) con densidad residual máxima en el mapa de diferencia final igual a ± 0.24 .

Comparando los datos espectroscópicos y el análisis de estudio de Rayos-X, de el compuesto A, con los obtenidos en la literatura para la Citlaltitrona (11) éste compuesto aislado quedó plenamente identificado como la Citlaltitrona.



Citlaltitrona



Vista estereoscópica del compuesto A (Citralitrona).

El compuesto B, que corresponde al aislado en menor cantidad, se obtuvo como cristales en forma de aguja, transparentes, solubles en acetona, con un Rf de 0.47 (hexano/ acetona 7:3) y un punto de fusión de 232^o-235^oC.

Su espectro de IR (espectro 5) presentó una banda en 3587 cm⁻¹ característica de los grupos hidroxilo (-OH), en 1704 cm⁻¹ una banda para enlaces del grupo carbonilo (C=O), y en 1601 cm⁻¹ presentó una banda de absorción para dobles enlaces.

El espectro de masas (espectro 6) muestra un pico a m/z 296 (M⁺) que se tomó como ión molecular.

A continuación se resumen los datos obtenidos por RMN¹H (espectro 7) y por RMN¹³C (espectro 8) para el compuesto B, que son idénticos a los de la mezcla epimérica de Jatrololona A y B aislada por X. Domínguez (60).

Es importante señalar que las propiedades espectroscópicas de Jatrololona A se encuentran estrechamente relacionadas con las de la Jatrololona B. La relación epimérica esta en C-2 seguida de la característica de que ambas se encuentran como una mezcla equimolecular. Por lo que la estructura de la Jatrololona B se ha establecido por análisis cristalográfico de rayos-X en la estructura correspondiente al acetato (26).

Tabla de datos de RMN¹H para el compuesto B.

RMN ¹ H Asignado al	
Compuesto B (200MHz CDCl ₃)	
Atomo	δ(ppm)
OH	5.3
H-17(A)	5.25
H-17(B)	5.18
H-17	4.69
m(1H), (H-2), (H-3)	3.25
m(3H), (H-1), (H-11)	2.60
(3H), Me-20	2.35
m(2H), (H-7)	1.81
d ancho (1H)	1.60
d, J-7, (3H), Me-16	1.30
d, J-7, (3H), Me-16	1.27
s,(3H), Me-19	1.24
m(H-2), (H-9), (H-8)	0.96
s(3H), Me-18	0.82
s(3H), Me-18	0.81

Tabla de datos de RMN¹³C para el compuesto B.

RMN ¹³ C Asignado al Compuesto B		RMN ¹³ C de la mezcla epimérica Jatrolona A y B	
Atomo	δ(ppm)	Atomo	δ(ppm)
3	208.347	3	208.2
14	150.175	14	150.2
6617	146.05	6617	145.6
15	137.384	15	137.5
13	136.727	13	137.2
5	134.59	5	134.4
12	131.737	4	131.8
4	131.118	12	131.1
1766	115.127	1766	115.2
11	30.34	11	29.4
20	28.29	20	28.3
9	21.404	9	21.5
10	19.44	10	19.5
18	17.042	18	17.1
19	16.092	19	16.1
16	13.265	16	13.3

Análisis Cristalográfico de Rayos-X para el Compuesto B

La esteereoquímica del compuesto B se estableció mediante difracción de Rayos-X de la siguiente manera:

Un cristal del compuesto B fué montado en un difractoro automatizado NICOLET P3. Tamaño del cristal $0.4 \times 0.2 \times 0.14$ mm. Dimensiones de la celda unitaria: $a=13.248 \text{ \AA}^0$ (3), $b=13.338 \text{ \AA}^0$ (3), $c=19.195 \text{ \AA}^0$ (4), (ortorrómbico $P2(1)2(1)2(1)$) fué determinado por afinamiento de mínimos cuadrados de las mejores posiciones angulares para 25 reflexiones independientes en el rango $5 < 2\theta < 14^\circ$ usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54178 \text{ \AA}^0$).

Los datos (115 reflexiones), fueron colectados a temperatura ambiente, usando un modo de escrutinio de $\theta / 2\theta$ a un valor máximo de 2θ de 100° .

Las intensidades de dos reflexiones estándar fueron medidas cada 48 reflexiones y como mostraron menos de 3.0% de variación, las correcciones para decaimiento se consideraron innecesarias. Las intensidades fueron corregidas para efectos de Lorentz y polarización, pero no para absorción. Un total de 1612 reflexiones se consideraron observadas (1612 F 3.0σ para F).

La estructura fué resuelta por métodos directos incluidos en SHELXTL para los 20 átomos diferentes de hidrógeno que tiene la estructura.

Ciclos sucesivos de afinamiento por mínimos cuadrados, seguidos por síntesis de Fourier, permitieron localizar los átomos diferentes de hidrógeno restantes. Los afinamientos de factor de escala, parámetros posicionales y térmicos anisotrópicos para todos los átomos diferentes de hidrógeno se llevaron a cabo por convergencia, minimizando la función,

$$W^{-1} = s(F)^2 + 0.0039 F^2$$
. Todos los átomos de hidrógeno unidos a carbono fueron localizados a posiciones geométricas con $U=0.06 \text{ \AA}^2$ constante.

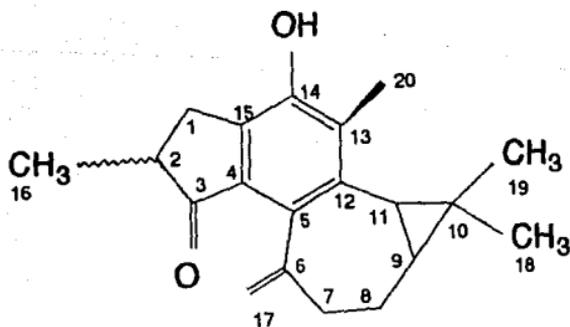
El átomo de hidrógeno hidroxílico se localizó por una síntesis de diferencia de Fourier a etapa avanzada y refinado isotrópicamente. El ciclo final de afinaciones dió un factor de concordancia de $R=0.0796$ ($R_w=0.1023$) con

densidad residual máxima en el mapa de diferencia final igual a ~ 0.24 .

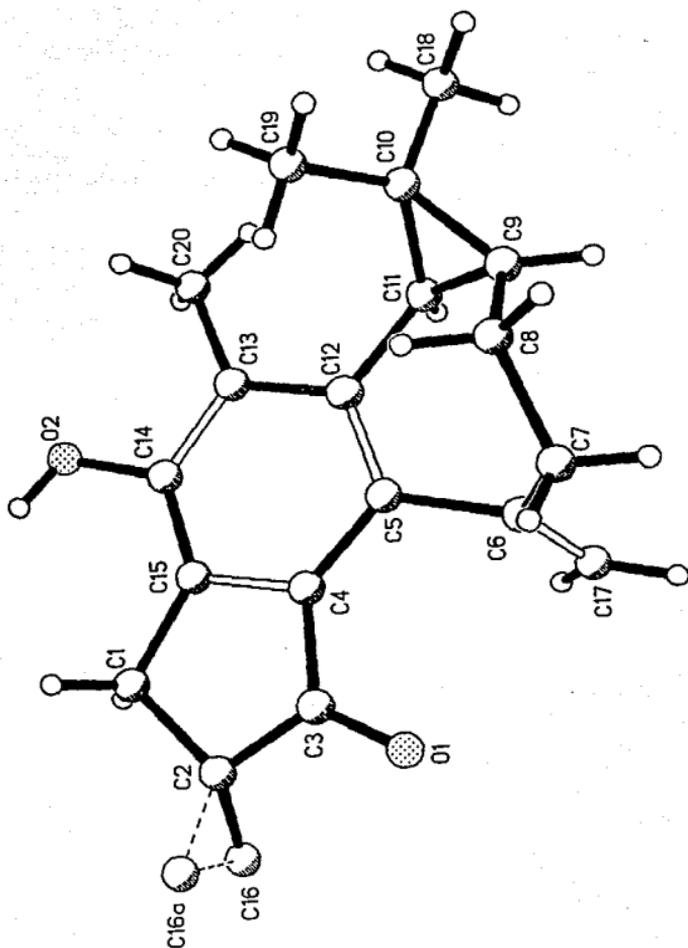
En éste estudio de Rayos-X, se pudo corroborar que en C-2 se encuentra la relación epimérica de las Jatrolonas A y B. Debido a que se observó un constante movimiento ó desorden de protones en éste átomo de carbono durante la determinación de la estructura.

Comparando los datos espectroscópicos, y el análisis de estudio de rayos-X, del Compuesto B con los obtenidos en la literatura para la mezcla epimérica de Jatrolonas A y B (40) éste compuesto quedó identificado como la mezcla epimérica de Jatrolonas A y B.

Con respecto a las cantidades obtenidas por cromatografía relámpago para cada uno de los compuestos A y B, podemos decir que se mejoró el rendimiento de obtención de éstos.



Jatrolona A y B



Vista estereoscópica del compuesto B (mezcla epimérica de Jatrofolonas A y B).

Extracto Acuoso

El análisis cualitativo del extracto acuoso y de los productos de precipitación con acetona y etanol, respectivamente (ver parte experimental) se encuentran constituidos por componentes muy similares entre sí. La prueba de Stiasny nos permitió establecer que los componentes que conforman dichos precipitados con acetona y etanol son del tipo de los denominados taninos condensables ó proantocianidinas (oligómeros de catequinas ó flavan-3,4-dioles). Se ha descrito que existen dos tipos de taninos, los cuales se reúnen en la siguiente tabla:

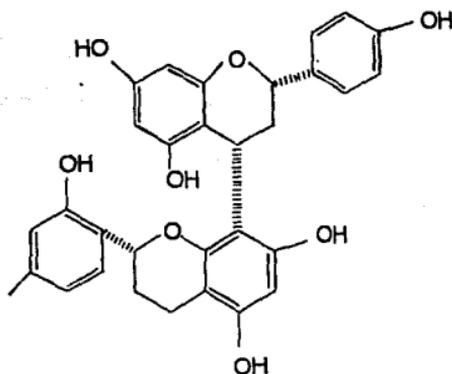
<u>Nomenclatura</u>	<u>Estructura</u>	<u>Peso Molecular</u>
1) Taninos Condensables		
Proantocianidinas	Oligómeros de Catequinas y flavan-3,4-dioles	1000-3000
2) Taninos Hidrolizables		
Galotaninos	Esteres de ácido gálico	1000-1500
Elagitaninos	Esteres de ácido hexahidro- difénico	1000-3000
<u>Prototaninos</u>	<u>Catequinas y Galocatequinas</u>	<u>200-600</u>

Estos taninos se encuentran distribuidos muy regularmente en el reino vegetal. Los taninos condensables se encuentran universalmente en angiospermas y gimnospermas, especialmente en las especies leñosas., y por el contrario, los taninos hidrolizables se limitan a plantas dicotiledoneas, y se localizan en unas cuantas familias.

Las proantocianidinas (taninos condensables), se forman biosintéticamente de la condensación de catequinas ó galocatequinas para formar oligómeros con enlaces carbono-carbono, uniendo una unidad flavonoide a otra por uniones 4-8 ó 6-8. La mayoría de los taninos tienen entre 2 y 20 unidades

flavonoides. El nombre de proantocianidinas se utiliza alternativamente para los taninos condensables, debido a que el tratamiento con ácidos en caliente rompe algunos enlaces carbono-carbono y los monómeros de antocianidina se liberan.

Las proantocianidinas se encuentran principalmente distribuidas, en las plantas leñosas y pueden ser una barrera importante contra la depredación de insectos, ésto sumado a sus propiedades astringentes.



Ejemplo de Proantocianidina

Parte Biológica.

Los resultados obtenidos con cada uno de los microorganismos de prueba, se reúnen en los cuadros que se encuentran en la parte experimental donde se indica el tipo de disolvente utilizado para cada caso (metanol, cloruro de metileno, y agua), la dosis empleada, el tipo de extracto utilizado, así como también el tipo de microorganismo empleado para la prueba.

A los extractos originales se les realizó la evaluación antimicrobiana con microorganismos gram negativos y gram positivos, como se puede observar en el cuadro 1, (en la parte experimental). Se encontró que a la dosis empleada (50 µg/ml.) éstos no presentan actividad sobre gram positivos y levaduras. En cambio para los gram negativos se observa una acción significativa.

Después, se realizaron las pruebas de evaluación para las fracciones obtenidas, del extracto metanólico con los mismos microorganismos gram positivos y gram negativos.(cuadro 2, en la parte experimental).

En éste cuadro 2, se puede ver que no existe actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones, y del extracto metanólico original contra gram positivos. En cambio para *P. aeruginosa*, que es un microorganismo gram negativo su acción es mayor en comparación con el testigo.

Las diferentes fracciones, obtenidas por cromatografía flash del extracto metanólico (hexano/acetona) de la planta de Guanajuato (1-23), cuadro 2A (en la parte experimental), presentan actividad antimicrobiana prometedora para los diferentes microorganismos gram negativos, de prueba. Siendo las fracciones más activas la 1 y 2, pero en las subsecuentes fracciones la actividad varía según el microorganismo. Sin embargo, *P. aeruginosa* mostró ser la más afectada, en general.

En el caso, de la planta de Zacatecas (1a-10a) se observa una actividad

antimicrobiana significativa en comparación con el testigo, pero en una forma no tan uniforme como ocurre en la planta de Guanajuato, siendo en éste caso más afectado el microorganismo gram negativo *S. typhi*.

Con respecto a la actividad biológica de los compuestos puros aislados e identificados como Citralitrona y Jatrololona A y B, ninguno de ellos mostró actividad relevante sobre los microorganismos de prueba, en nuestras condiciones, lo que concuerda con los resultados obtenidos por X. Domínguez, y colaboradores (11) pero, según éste autor, la riolozatriona posee actividad antimicrobiana. En éste trabajo no se aisló dicho compuesto.

En el cuadro 3 (en parte experimental), se reúnen los resultados de la prueba antimicrobiana del extracto acuoso, que se fraccionó siguiendo el Procedimiento I (en parte experimental). Se encontró que la actividad en estudio, podría estar en éste extracto, ya que se conserva con mayor constancia la actividad, comparándola sobre las otras fracciones eluidas por cromatografía en columna con Carbón activado-Celita. Siendo más activa y de mayor espectro el pp. ext. AcOEt.

Se decidió hacer una separación por CCF preparativa del pp. ext. AcOEt, obteniéndose fracciones muy mezcladas pero con buena actividad antimicrobiana. Los resultados de éstas fracciones se encuentran en el cuadro 3A (parte experimental).

De los resultados se puede ver que, el pp. ext. AcOEt y las fracciones 1,2, 3 son las que presentan más actividad y de mayor espectro.

Como los mejores resultados de actividad se obtuvieron del extracto acuoso, se hizo la redisolución de éste en agua destilada (5 gr. en 10 ml.), y se precipitó al agregar poco a poco acetona en exceso (1000 ml.). Lo mismo se hizo con etanol. Los precipitados obtenidos se filtraron y se evaluaron biológicamente, cuadro 4 (en parte experimental).

En éste cuadro se ve, que la mayor actividad antimicrobiana y de mayor

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

espectro se encontró en el precipitado con acetona (B), el sobrenadante de etanol (A_1) y el sobrenadante de acetona (B_1).

En un intento de fraccionar éstas mezclas, se cromatógrafió cada precipitado y el sobrenadante (previamente evaporados) por CCF preparativa y cada fracción se evaluó biológicamente, reuniéndose los resultados en el cuadro 5 (en parte experimental).

Con respecto a éstos resultados, se puede decir que la actividad antimicrobiana se encuentra en el precipitado de acetona (B). La fracción del precipitado de acetona (B), que queda en la placa preparativa, prácticamente en la línea de aplicación y que llamamos $F_1(B)$, mantiene la actividad.

Curiosamente el sobrenadante de acetona (B_1) en ésta ocasión no mostró la misma actividad que en el experimento anterior (cuadro 4), pero al fraccionarla, la franja de casi el punto de aplicación $F_1(B_1)$, ya mostró actividad semejante. Igualmente, el precipitado con etanol (A) no inhibe el crecimiento, pero al fraccionarlo $F_1(A)$ muestra acción antimicrobiana.

El sobrenadante de etanol (A_1) mostró la misma actividad que en el experimento anterior (cuadro 4), pero en cambio la franja extraída de la sílice no es tan activa $F_1(A_1)$. Estos comportamientos se pueden explicar, muy probablemente, debido a que los taninos ó la mezcla de ellos se ve modificada por la acción de la sílice. Sabemos que ésta, tiene características ácidas que pueden provocar hidrólisis parciales, lo que complica aún más la caracterización de los principios activos.

De los resultados observados en los cuadros 4 y 5, se puede llegar a concluir, que el ó los principios activos contra microorganismos gram negativos se encuentran en el extracto acuoso de ésta planta. Pero en ésta ocasión no fué posible aislarlos. Se sigue buscando la forma de obtenerlos, ya que, como puede observarse dicha planta, *Jatropha dioica* presenta una marcada actividad antimicrobiana contra gram negativos.

CONCLUSIONES

De el estudio químico-biológico "biodirigido" de los diferentes extractos de la raíz de *Jatropha dioica* se llegó a las siguientes conclusiones:

1) Se mejoró el rendimiento y método de obtención de los dos compuestos aislados (Citlalintriona y Jatrololona A y B) de la raíz de *Jatropha dioica*, utilizando para ello la cromatografía flash.

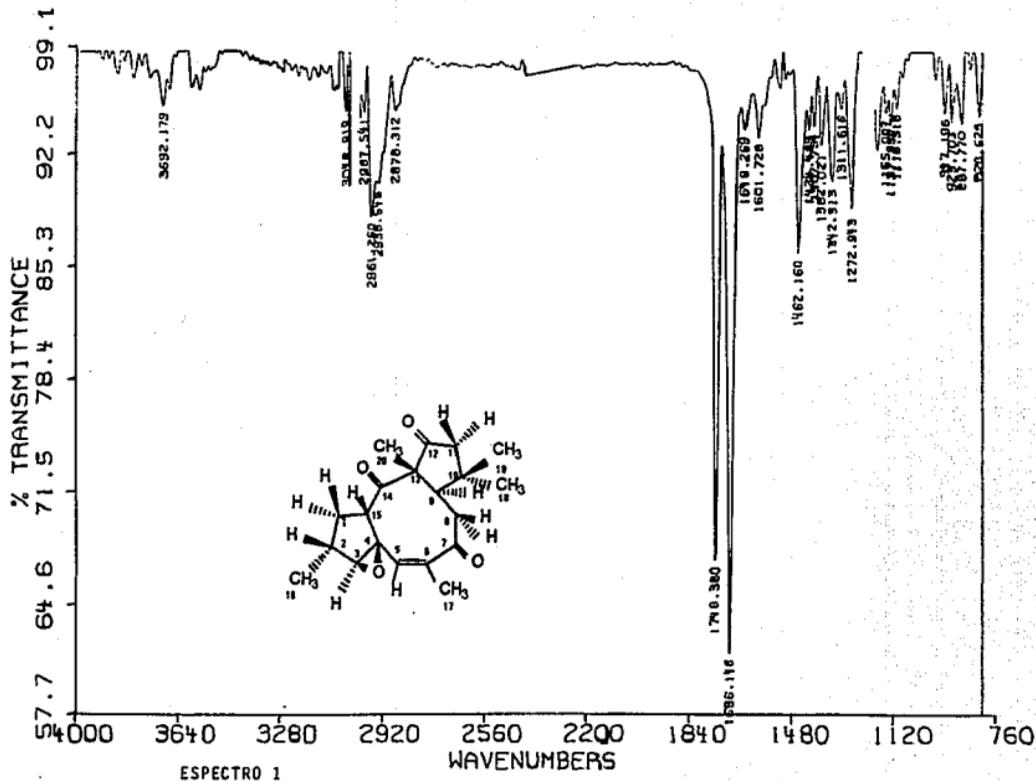
2) Se logró establecer, que los extractos más polares de la raíz de *Jatropha dioica* son los más activos sobre los diferentes microorganismos gram negativos, utilizados para las pruebas de evaluación antimicrobiana (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *K. pneumoneae*).

3) También se observa una notable actividad antimicrobiana según las diferentes dosis empleadas en las pruebas de evaluación antimicrobiana

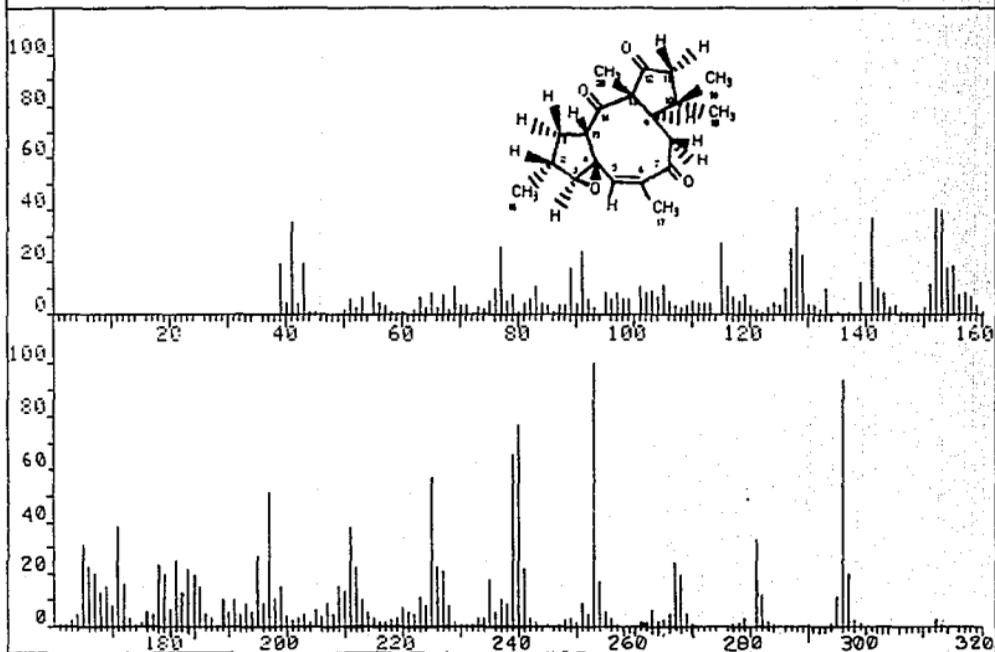
4) Podemos evidenciar que, muy probablemente, los principios activos involucrados en la actividad antimicrobiana de la raíz de *Jatropha dioica* son del tipo de los taninos condensables.

5) Se continúa con éste estudio para llegar a establecer la naturaleza química del ó los principios activos de ésta planta.

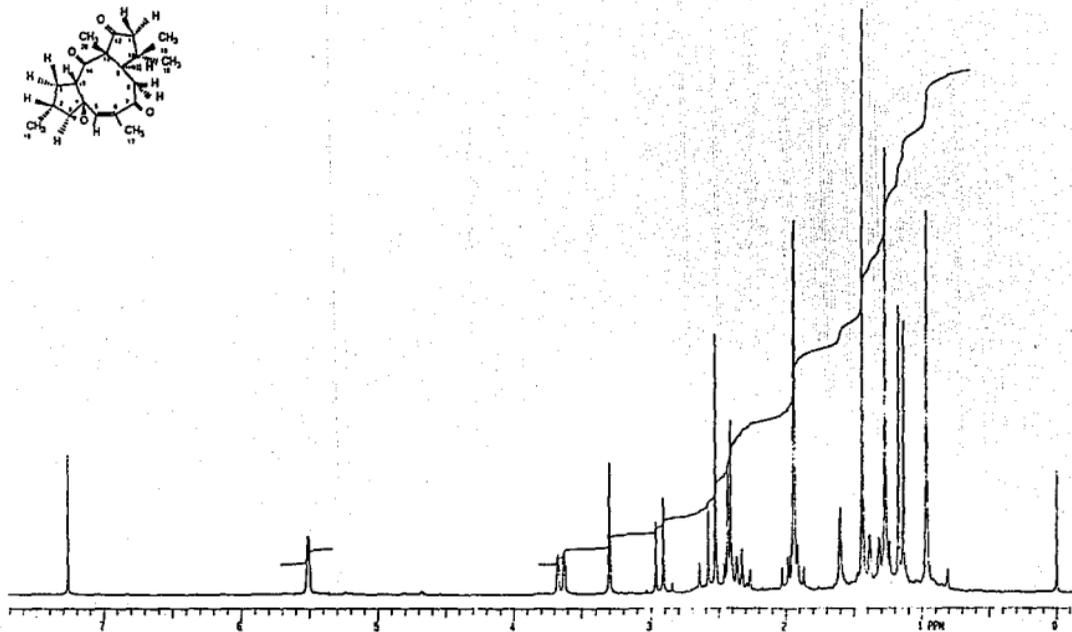
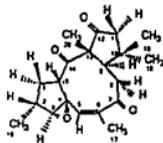
ESPECTROS



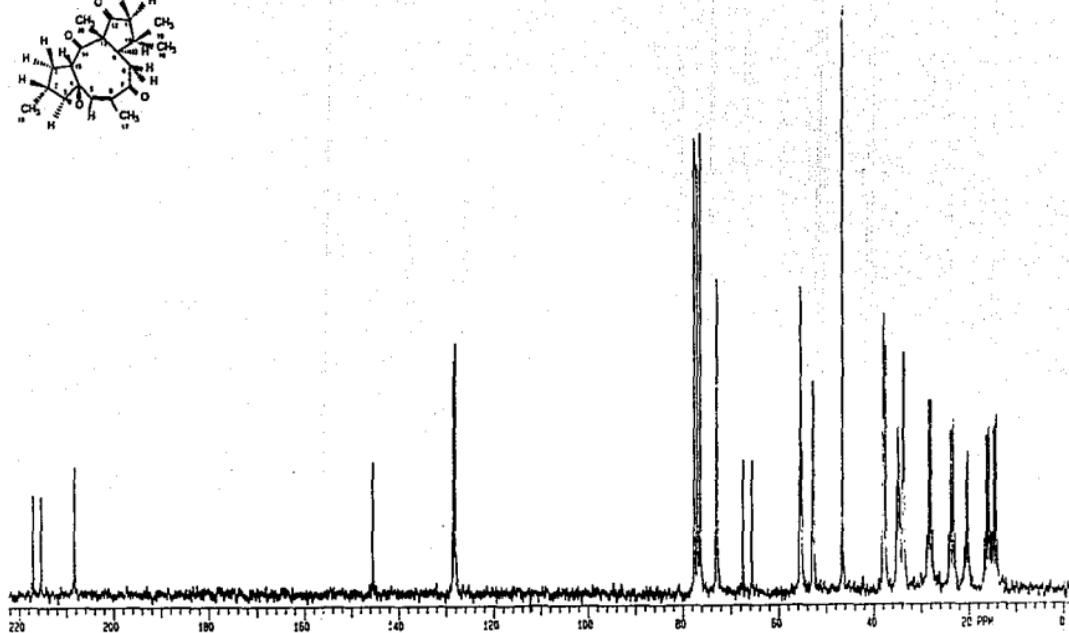
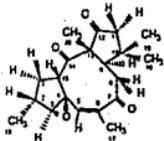
FRN 9027	SPECTRUM 46		RETENTION TIME 3.2	
LARGST 4:	253.2, 100.0	296.1, 93.7	240.2, 77.1	239.2, 65.5
LAST 4:	298.1, 2.4	299.1, .4	312.2, 2.1	313.2, .7
PAGE 1 Y = 1.00				



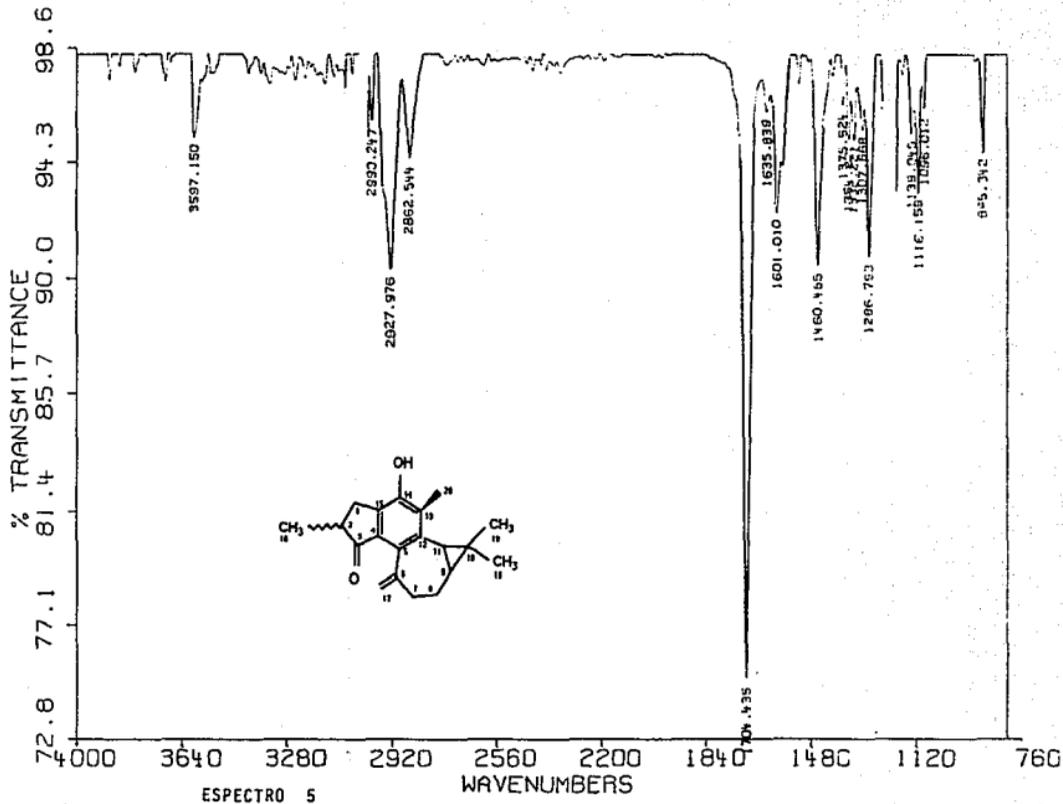
ESPECTRO 2



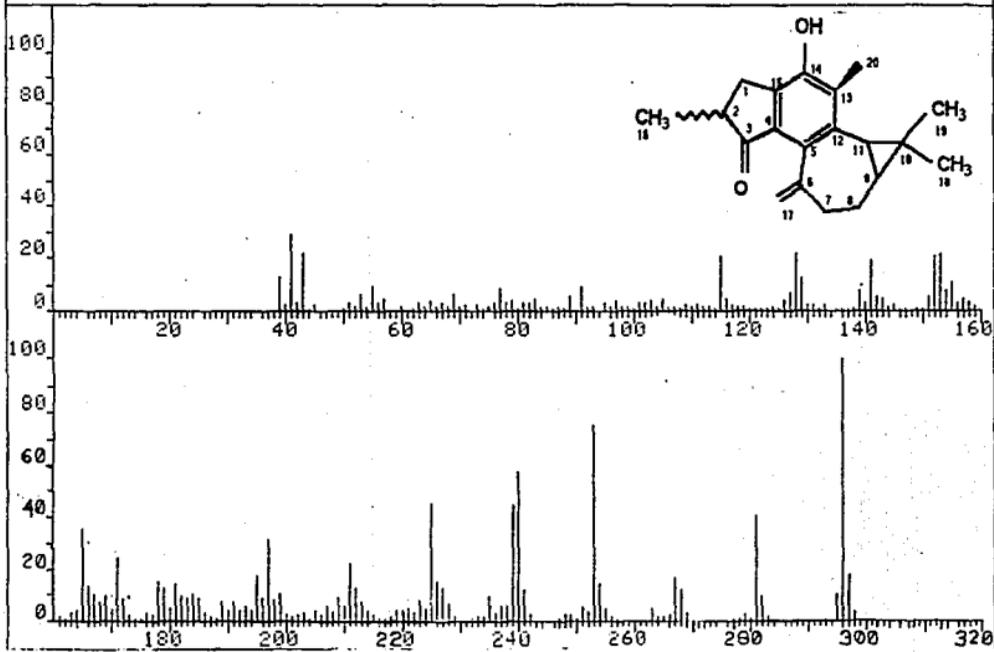
ESPECTRO 3



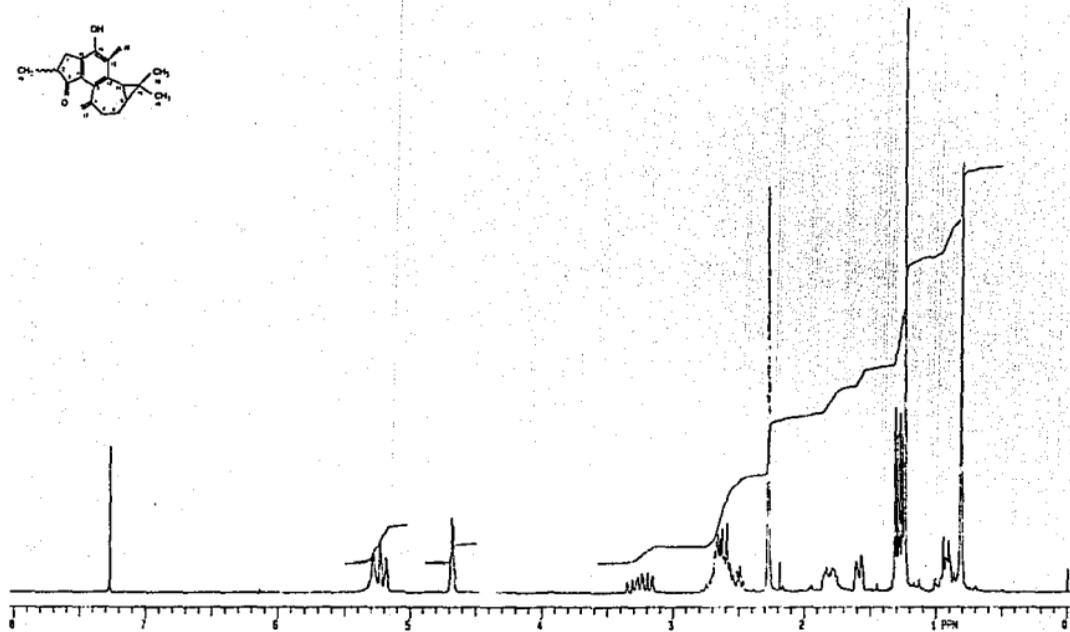
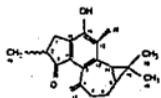
ESPECTRO 4



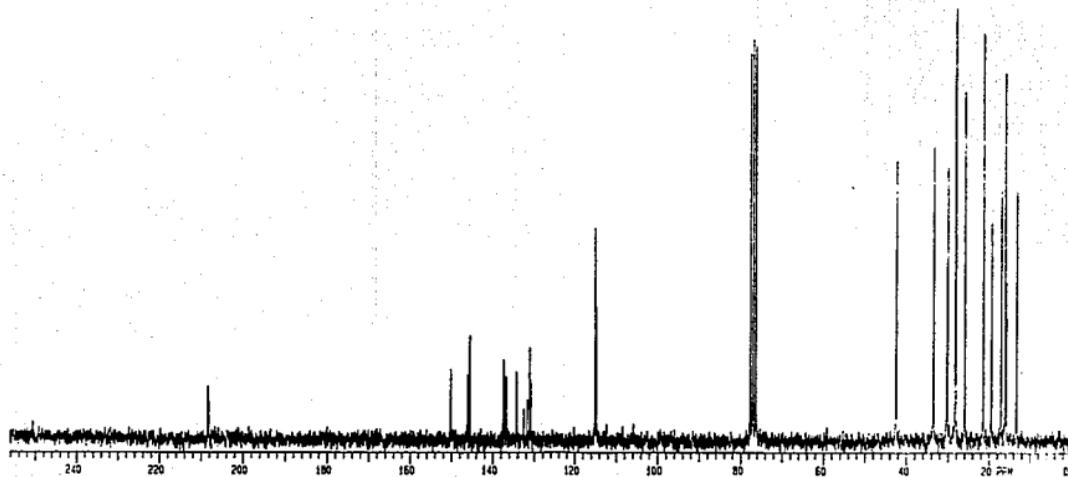
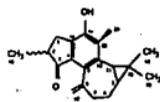
FRN 9028	SPECTRUM 62		RETENTION TIME 4.2	
LARGST 4:	296.1, 100.0	253.1, 75.5	240.1, 57.5	225.1, 45.3
LAST 4:	297.1, 18.0	298.1, 2.7	312.0, .5	368.3, .7
PAGE 1 Y = 1.00				



SPECTRO 6



ESPECTRO 7



ESPECTRO 8

BIBLIOGRAFIA

- 1) Anzures y Bolaños, M. del C., *La Medicina Tradicional en México*, U.N.A.M., México, pp 214, 1989.
- 2) O'Gorman H., *Plantas y Flores de México*, Dirección General de Publicaciones, U. N. A. M., México, pp 220, 1963.
- 3) Cronquist A., *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, Thomas Nelson, London, pp 525, 1968.
- 4) Benson L., *Plant Classification*, D.C. Heath & Co., Boston, pp 300, 1957.
- 5) Hernández J., *Estudio Fitoquímico de Algunas Euphorbiaceae Medicinales Mexicanas*, Tesis Maestría, Fac. Química, U. N. A. M., México, pp 97, 1990.
- 6) Met Calfe C. R., and Chalk., *Anatomy of the Dicotyledons Vol II*, Oxford University Press., London, pp 1500, 1950.
- 7) Evans F. J. and Soper C. J., *The Tiglane, Daphnane and Ingenane Diterpenes, their Chemistry, Distribution and Biological Activities*, J. Nat. Prod., 41, 193, 1978.
- 8) Martínez M., *Las Plantas Medicinales de México*, Editorial Botas, México, pp 656, 1992.
- 9) Díaz J., *Monografías Científicas Vol. II*, Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales A. C., México, pp 200, 1977.
- 10) Dominguéz X. A., Cano G., Franco R., Villareal A. M. Watson W. H. and Zabel V., *Riolozatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *sessiliflora**. Phytochemistry, 19, 2478, 1980.
- 11) Villareal A. M., Dominguéz X. A., *Citalitione a new diterpene from *Jatropha dioica* var. *sessiliflora**, J. Nat. Prod., 51, 749, 1988.
- 12) Sánchez S. O., *La Flora del Valle de México*, Editorial Herrero, México, pp 550, 1980.

- 13) Farnsworth N. R., Morris R. W., *Higher Plants-The Sleeping Giant of Drug Development.*, Am. J. Pharm., 148, 46, 1976.
- 14) Frías P. M., *Evaluación de Enterobacterias en la Boca*, Tesis Maestría, Fac. Odontología, U. N. A. M., México, pp 75, 1989.
- 15) Siqueiros V. Ma. de L., *Evaluación Microbiológica de Pacientes con Periodontitis Adulta*, Tesis Maestría, Fac. Odontología, U. N. A. M., México, pp 90, 1985.
- 16) López A. A., Viezca T. C., *Historia General de la Medicina en México*, Tomo I, Facultad de Medicina, U. N. A. M., México, pp 395, 1984.
- 17) López Villafranco M. E., *Contribución Etnobotánica en Plantas Medicinales Utilizadas por dos Grupos Etnicos de Mecapala, Municipio de Pantepec, Puebla*, Tesis Biología, Fac. Ciencias, U. N. A. M., México, pp 349, 1988.
- 18) Morales G. G., y Toledo O. Gpe., *Contribución al Estudio de la Flora Medicinal y Medicina Tradicional del Municipio de Coxquihui, Veracruz*, Tesis Biología, Fac. Ciencias, U. N. A. M., México, pp 394, 1987.
- 19) Soto N. J. C., *Las Plantas Medicinales y su Uso Tradicional en la Cuenca del Río Balsas*, Tesis Biología, Fac. Ciencias, U. N. A. M., México, pp 231, 1987.
- 20) Ellert U., Kurz W. G. W., Constabel F., *J. Plant. Physiol.*, 119, 65, 1985.
- 21) Odebuji O. O., and Sofowara E. A., *Antimicrobial alkaloids from Nigerian chewing stick (Fagara zanthoxyloides)*, *Planta Medica*, 36, 204, 1979.
- 22) Southard G. L., Boulware R. T., Walborn D. R., Groznik W. J., Thorne E. E., Yankell S. L., *Sanguinarine, a new antiplaque agent: retention and plaque specificity.*, *J. Am. Dent. Assoc.*, 108, 338, 1984.
- 23) Evans F. J. y Taylor S. E., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Cap. 44, 1983.
- 24) Hecker E., *Co-carcinogenic principles from the seed oil of Croton tiglium and from others Euphorbiaceae.* *Cancer Res.*, 28, 2338, 1968.

- 25) Burke B. A., Chan W. R., Pascoe K. O., Blount J. F. and Mauchand P. S., *The Structure of Crotonitenone, a Novel Casbane Diterpene from Croton niteus S W. (Euphorbiaceae)*, J. Chem. Soc. Pekin, 1, 2666, 1981
- 26) Kupchan S. M., Siegel C. W., Matz M. J., Gilmore C. J., Bryan R. F., *Structure and stereochemistry of jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumour inhibitor*, J. Amer. Chem. Soc., 98, 2295, 1976.
- 27) Adolf W. and Hecker E., *Further new diterpenes from the irritant and co-carcinogenic seed oil and latex of the Caper spurge (E. lathyris L.)*. Experientia 27, 1393, 1971.
- 28) Chan W. R., Prince E. C., Manchar P. S., Clardy J., *The structure of Crotofolin-A, a new Diterpene with a new skeleton*. J. Amer. Chem. Soc., 97, 4437, 1975.
- 29) Stuart K. L., Barrett M., *A phorbol derivative from Croton rhamnifolius*, Tetrahedron Letters, 2399, 1969.
- 30) Robinson D. R., and West C. A., *Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of Ricinus communis L.*, Biochemistry, 9, 70, 1970.
- 31) Adolf W. and Hecker E., *Diterpenoid irritants and co-carcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae, structural relationships in view of their biogenesis*. J. Chem. 16, 75, 1977.
- 32) Uemura D. C., Nobuhara Y., Herata Y., *The structure of new lathyranes diterpenes, jolkinols A, B, C and D from E. jolkinii Boiss.*, Tetrahedron Letters, 4593, 1976.
- 33) Kupchan S. M., Siegel C. W., Matz M. J., Renaud J. A., Haltiwanger R. C., and Bryan R. F., *Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumour inhibitor from Jatropha gossypifolia* J. Amer. Chem. Soc., 92, 4476, 1970.
- 34) Hut W. H. and K. K. Ng., *Terpenoids and Steroids from Macaranga tanarius* Phytochemistry, 14, 816, 1975.

- 35) Uemura D. C., Hirata Y., *Stereochemistry of kansuinine A*, Tetrahedron Letters, 1701, 1975.
- 36) Narayanan P. M., Zechmeister K., Eugel D. W., Hecker E., and Adolf W., *Structure of 7-hydroxy lathyrol: A further diterpene from E. lathyris*, Tetrahedron Letters, 1325, 1971.
- 37) Torrance S. J., Wiedhop R. M., Cole J. R., and Cutler R. S., *Anti-tumour agents from Jatropha macrohiza (Euphorbiaceae) II. Isolation and characterisation of jatrophatriene*, J. Org. Chem., 41, 1855, 1976.
- 38) Sahai R. R., Rastogi R. P., Jakupovic J., and Bohlmann F., *A diterpene from E. maddenii*, Phytochemistry, 20, 1665, 1981.
- 39) Zechmeister K., Rohrl M., Brandl F., Hoppe W., Hecker E., and Kubinyi H., *Röntgenstrukturanalyse eines neuen makrozyklischen Diterpen-Ester aus der springwolfsmilch (E. lathyris)*, Tetrahedron Letters, 3071, 1970.
- 40) Puroshathaman K. K., Chandrasekharen S., Canaeron A. F., *Jatropholones A and B, new diterpenoids from the roots of the Jatropha gossypifolia: Cristal structure analysis of Jatropholone B*, Tetrahedron Letters, 979, 1979.
- 41) Chaterjee A., Pascard C. and Prauge T., *Crystal Structure of a Lignan from Jatropha gossypifolia*, Phytochemistry, 20, 2047, 1981.
- 42) Kozhiparambil K., Purushothaman, and Sundaram Chandrasekharan., *Jatropholones A and B, new diterpenoids from the roots of Jatropha gossypifolia (Euphorbiaceae)-Crystal structure analysis of jatropholone B*, Tetrahedron Letters, 979, 1979.
- 43) Parthasarathy M. R., and Pardha K. S., *A cumarino-lignan from Jatropha glandulifera*, Phytochemistry, 23, 867, 1984.
- 44) Kosasi S., Vander Sluis W. G., and Labadie R. P., *Multifidol and Multifidol glucoside from the latex of Jatropha multifida*, Phytochemistry, 28, 2439, 1989.

- 45) Jakupovic M. G. and Schmeda-Hirschmann G., *Rhamnolane and derivatives from Jatropha grossidentata* Phytochemistry, 27, 2997, 1988.
- 46) Schmeda-Hirschmann G., Tschristz F., Jakupovic J., *Diterpenes and Lignan from Jatropha grossidentata*, Phytochemistry, 31, 1731, 1992.
- 47) Comunicacion personal con el M. en C. Ernesto Escareño Piña de la Facultad de Odontología de la Universidad Autonoma de Zacatecas (1992).
- 48) Veloz R., *Extracción de Taninos de la Flora Mexicana y su aplicacion en la Industria Curtidora*. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias Químicas e Industriales, U.E.Mor., Cuernavaca, Morelos, pp 116, 1993.
- 49) Bianchini F., & Carrara A., *Guía de Plantas y Flores*, Ed. Grijalbo, Barcelona, España, pp 521, 1975.
- 50) Elvin-Lewis M. and others., *The dental health of chewing stick users of southern Ghana : Preliminary findings* J. Prevent Dent., 6, 151, 1980.
- 51) Hecker E., Balmain A., Lohmme M. F., et. al., *Euphorbiasteroid (epoxylathyrol), a new tricyclic diterpene from Euphorbia lathyris*, Tetrahedron Letters, 2241, 1970.
- 52) Hergenhanu M. W. and Hecker E., *Resiniferatoxin and other Novel Polyfuntional Diterpenes from Euphorbia resinifera and Euphorbia unispina*, Tetrahedrom Letters, 1595, 1975.
- 53) Krogsgaard L. P., *Natural Products and Drugs Development Foundation*, Alfred Benzon, Copenhagen, pp 567, 1984.
- 54) Lozoya X., *Plantas y Luces en México*, Editorial Serbal, Barcelona, España, pp 225, 1984.
- 55) Ramos M. D., *Determinación de la Composición Nutricional y Toxicológica de los Quelites: Anoda cristata, Crotalaria pumila, Euphorbia graminea, Leucaena macrophylla*, Tesis Biología, Fac. Ciencias, U. N. A. M., México, pp 150, 1989.

- 56) Rojas R. T. and Sanders W. T., *Historia de la Agricultura Vol. I, Epoca Prehispánica-Siglo XVI*, I. N. A., México, pp 266, 1985.
- 57) Rzedowski J., Rzedowski G. C., *Flora Fanerogámica del Valle de México Vol. II: Dicotyledoneaceae (Euphorbiaceae-Compositae)*, E. N. C. B., I. P. N., e Instituto de Ecología, México, pp 674, 1985.
- 58) Schuster S. G., *Oral Microbiology & Infections Disease*, Editorial Interamericana / Mc. Graw Hill, México, pp 1500, 1990.
- 59) Souza N., *El Zicilte*, Instituto Técnico Agrícola Henequenero, Chaczclkin, Yucatán, pp 10, 1939.
- 60) Thomas Anderson Henry, *The Plant Alkaloids*, The Blakiston Company, Philadelphia, Toronto, Cánada, pp 800, 1949.
- 61) Uemura D. C., Hirata Y., *The structure of kansuinine A, a new multi-oxygenated diterpene*, Tetrahedron Letters, 1697, 1975.
- 62) Uemura D. C., Uno E., Sasaki K., Herata Y., *Kansuinine B: A novel multi-oxygenated diterpene from E. kansui Liou*, Tetrahedron Letters, 21, 1703, 1975.
- 63) Vidales D. P., *Estudio Químico-Biológico de Hyptis urticoides y Senecio toluccanus*, Tesis Biología, Fac. Ciencias, U. N. A. M., México, pp 97, 1990.