



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Chamaesyce*
prostrata (AIT.) MILLSP. (EUPHORBIACEAE)"



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS MANCOMUNADA

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

- 1- MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA
- 2- IRMA SUSANA ROJAS TOME

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1994





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).

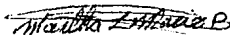
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO
VOCAL: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
SECRETARIO: M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
1er. SUPLENTE: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA-MIRANDA
2do. SUPLENTE: M. en C. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES.

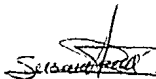
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO E
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.



MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA

SUSTENTANTES:



IRMA SUSANA ROJAS TOME



ASESOR:

M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

DIOS:

Gracias por la oportunidad que nos has dado de vivir, de pensar, de soñar y de creer en Tí; gracias porque podemos sentir Tu amor en cada latido de nuestro corazón y porque gracias a Tí hemos alcanzado este gran anhelo.

Gracias, Señor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rachel Mata, por su colaboración y recomendaciones en la elaboración de esta Tesis, con profunda admiración y respeto por su gran profesionalismo.

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, por proporcionar e identificar el material vegetal.

Al M. en C. Atilano Gutiérrez del Instituto de Química, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q. F. B. Graciela Chávez y a la Q. Maricela Gutiérrez de la Facultad de Química, por el registro de los espectros de UV, IR y rotación óptica.

A la Dra. Ana Luisa Anaya y a la Bióloga Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular por la realización de los ensayos biológicos para determinar potencia alelopática y antifúngica.

Al Dr. Rogelio Pereda-Miranda de la Facultad de Química y a la Dra. Lydia Rodríguez Hahn del Instituto de Química, por proporcionar algunas muestras auténticas.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por su apoyo a través del Proyecto IN202493 otorgado a los doctores Rachel Mata y Rogelio Pereda, por la beca proporcionada para la realización de esta Tesis.

A todos nuestros Amigos y Compañeros del Laboratorio 124: Ade, Daniel, Fausto, Federico, Fernando, José Luis, Laura, Leda, Lupita, Mari, Perla, Tere, Tomi, y Samuel, por su ayuda desinteresada.

Y finalmente, queremos expresar de manera especial nuestro agradecimiento a la M. en C. Perla Carolina Castañeda, ya que gracias a sus sabios consejos, su profesionalismo, paciencia, motivación y asesoría se logró llevar a cabo este trabajo.

DEDICATORIAS

De manera muy especial, queremos dedicarte esta tesis a tí, Perlita, pues más que una maestra y asesora, has sido una queridísima Amiga para nosotras.

Queremos agradecerte el habernos dado la oportunidad de trabajar contigo. Gracias a tu paciencia y comprensión hemos logrado alcanzar esta importante meta.

Deseamos sinceramente que Dios te llene de bendiciones a tí, a Fernando y al bebé.

Mil gracias, Perlita.

A la Dra. Rachel Mata, por darnos la oportunidad de pertenecer a su extraordinario grupo de investigación, por su paciencia y por la confianza que ha depositado en nosotras. Esperamos no defraudarla nunca.

A nuestros latosos, loquísimos y queridos amigos: Agustín, Claudia, Dea, Euclídez, Liz, Luis Jesús, Lupita, Mónica, Paty, Pili, Ricardo, Vero A. y Vero R., por la ayuda que nos brindaron y por los inolvidables momentos que hemos disfrutado y que hicieron de la carrera algo diferente y especial.

A Ade, por sus valiosos consejos y sincera amistad.

A quienes colaboraron en este trabajo, ya que esta tesis no habría sido posible sin su invaluable contribución.

A mis Padres Alberto y Martha Lydia:

Por todo el cariño, amor y comprensión que siempre me han brindado; por sus desvelos y esfuerzos; por ser un maravilloso ejemplo de honestidad y responsabilidad; por su paciencia e impaciencia; por su infinita humanidad; por permanecer a mi lado en los momentos más importantes, más hermosos y en los más difíciles de mi vida; por la tenacidad y fuerza que me han dado con sus palabras; por darme la libertad de ser lo que soy; por haberme dado una educación y una formación que constituye la herencia más valiosa que pudieron haberme dado; por sus valiosos consejos, sincero cariño e incondicional apoyo para la realización de este hermoso sueño.

A mis hermanos Norma Angélica, Adriana Leticia y Jesús Alberto:

Por todo lo que hemos compartido. Con mucho cariño, esperando que logren sus metas en la vida. Los quiero mucho.

A Mami Marthita:

Por el cariño, amor, confianza y comprensión que siempre me has dado.

A mis Amigos y Compañeros:

Alicia, Armando, Gil, Guillermo, Héctor, Janet, Maribel, Mauricio, Rafa, Ricardo y Tere, por todos los momentos que hemos compartido y por su valiosa amistad.

A mis queridas Amigas Lulú y Paty:

Por el apoyo, confianza e invaluable amistad que me han brindado, por los inolvidables momentos que hemos compartido. Les deseo lo mejor en la vida.

A mis amigas:

Adriana, Caty, Ivonne y Olivia, por la amistad que hemos compartido.

A una gran amiga Susi "Gusanita"

Por todo lo que hemos compartido, por todo lo que hemos realizado juntas; por ser una excelente compañera de trabajo y estudio; por el cariño, comprensión y confianza incondicional que me has brindado; por permanecer en los momentos más difíciles y más importantes; y por que hay cosas en este mundo que simplemente forman parte de un tesoro invaluable. Gracias por tu amistad.

A todas aquellas personas especiales cuyos nombres no necesito escribir ya que a lo largo del tiempo han compartido conmigo diferentes etapas de mi vida quedando un recuerdo de cada detalle y cada palabra compartida.

Martha Lydia

A mi Mamá Lupita:

Por ser la mujer que más admiro en la vida, por el ejemplo, el apoyo, la comprensión, la confianza y el amor infinito que siempre me ha dado, y porque gracias a ella sé que no existen imposibles ni metas inalcanzables. Mil gracias, Mamá.

A mi Papá Felipe:

Por todo el apoyo y el amor que me ha dado bajo cualquier circunstancia; por la confianza que siempre me has tenido y por permitirme ser lo que soy. Mil gracias, Papá.

A mis Hermanos Alberto y Alejandro:

A quienes admiro y agradezco profundamente todo lo que han hecho por mí durante mi vida, y deseo que logren a alcanzar todas sus metas y su camino esté lleno de triunfos.

A mi Familia:

Por toda la ayuda y el cariño que me han brindado y porque siempre han confiado en mí.

A tí, Magüi:

Por la amistad y el cariño que nos ha mantenido unidas durante tantos años. Gracias por estar a mi lado cuando que te he necesitado, por escucharme, por tener siempre las palabras que me reconfortan y me orientan. Deseo de todo corazón que puedas realizar todos tus sueños.

A mis Entrañables amigos:

Claudia S. R., Laura F. M., Willy, Fermín, Lucy, Yola, Juan, Ivonne, Caty, Olivia, Laura A. A., Mirsa, Pablo, Luisa y Angélica, por haber compartido conmigo tantos gratos y hermosos momentos, por su invaluable amistad y por que gracias a ellos sé que nunca me sentiré sola ni me faltará una palabra de aliento.

Para tí, Dany:

Porque haces de mi vida algo nuevo y diferente cada día, por tu comprensión, tu apoyo, por las cosas maravillosas que me has enseñado; por la alegría y la tristeza, por todas las locuras y los sueños que hemos compartido y por todo lo que falta...

A tí, Marthita:

Porque además de una excelente compañera de estudios y de trabajo, has sido una AMIGA sin igual. No tengo palabras para agradecerte el que estés conmigo en los momentos felices y en los difíciles de mi vida, por los consejos, la comprensión y el cariño que me has dado siempre. Dios quiera que todos los días de tu vida sean "días de estar contentos", que logres alcanzar todas tus metas y que estemos juntas para seguir compartiendo nuestras alegrías y nuestras tristezas. Recuerda siempre:

"Escala cada montaña, vadea cada arroyo, sigue cada arco iris, hasta alcanzar tu sueño. Ese sueño que requerirá de todo el amor que puedas dar todos los días de tu vida mientras vivas".

Mil gracias por compartir conmigo este sueño.

Irma Susana

CONTENIDO

	Página
Lista de cuadros	i
Lista de espectros	iii
Lista de figuras	v
Lista de gráficas	vi
Lista de abreviaturas	vii
	Página
I. ANTECEDENTES	1
1. Antecedentes de la familia Euphorbiaceae	2
2. Antecedentes de <i>Chamaesyce prostrata</i>	13
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	23
III. PARTE EXPERIMENTAL	26
1. Material vegetal	27
2. Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar	27
3. Análisis cromatográficos	29
4. Ensayos biológicos	30
4.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.	30
4.2 Determinación de la actividad alelopática y antifúngica del material vegetal, del extracto total y de algunos de los compuestos puros.	31
5. Aislamiento y purificación de los compuestos	31
5.1 Obtención del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).	31
5.2 Obtención del β -sitosterol (22).	32
5.3 Obtención del 3,6-éter dimetillico del camperol (23).	32
5.4 Obtención del β -D-glucositolsterol (24).	33

5.5 Obtención del 7-O- β -D-glucosil-camperol (25).	34
5.6 Obtención del polialcohol (26).	35
6. Caracterización de los compuestos aislados	35
6.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.	35
6.2 Preparación de los derivados acetilados.	36
6.3 Preparación del derivado metilado.	36
6.4 Prueba de Molisch.	37
6.5 Hidrólisis ácida.	37
6.6 Determinación de azúcares.	
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	38
1. Identificación del acetyl derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).	42
2. Identificación del β -sitosterol (22).	54
3. Identificación del 3-6-éter dimetilico del camperol (23).	56
4. Identificación del β -D-glucositolsterol (24).	79
5. Identificación del 7-O- β -D-glucosil-camperol (25).	81
6. Evaluación de la actividad biológica del compuesto (26).	93
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	95
VI. BIBLIOGRAFIA	98

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Principales géneros de la familia Euphorbiaceae.	2
Cuadro 2	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de <i>Chamaesyce prostrata</i> .	28
Cuadro 3	Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.	29
Cuadro 4	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	29
Cuadro 5	Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción X (Cuadro 2).	32
Cuadro 6	Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria XVII (Cuadro 2).	33
Cuadro 7	Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción XIX (Cuadro 2).	34
Cuadro 8	Rendimiento de los derivados acetilados.	36
Cuadro 9	Efecto del extracto cloroformo-metanólico de <i>Chamaesyce prostrata</i> sobre el crecimiento radicular de las malezas <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	39
Cuadro 10	Rendimiento de los compuestos aislados del extracto cloroformo-metanólico de <i>Chamaesyce prostrata</i> .	41
Cuadro 11	Constantes espectroscópicas del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).	47
Cuadro 12	Constantes espectroscópicas del 3,6-éter dimetilico del camperol (23).	60
Cuadro 13	Constantes espectroscópicas del derivado acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	68

Cuadro 14	Efecto de compuesto (23) sobre el crecimiento radicular de las malezas <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	77
Cuadro 15	Comparación de los desplazamientos químicos de los protones del producto (25) y el 6- β -acetil-3-gluco-camperol.	82
Cuadro 16	Constantes espectroscópicas del 7-O- β -D-glucosil-camperol (25).	84
Cuadro 17	Constantes espectroscópicas del 3,4',7'-éter trimetilico del camperol.	90
Cuadro 18	Efecto de compuesto (26) sobre el crecimiento radicular de las malezas <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	93

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1	Espectro de IR del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 48
Espectro 2	Espectro de RMN- ¹ H del acetil del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 49
Espectro 3	Espectro de RMN- ¹ H bidimensional COSY del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 50
Espectro 3a	Espectro de RMN- ¹ H bidimensional COSY del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 51
Espectro 4	Espectro de RMN- ¹³ C del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 52
Espectro 5	Espectro DEPT del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 53
Espectro 6	Espectro de IR comparativo del β -sitosterol (22). 55
Espectro 7	Espectro de IR del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 61
Espectro 8	Espectro de UV del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 62
Espectro 9	Espectro de RMN- ¹ H del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 63
Espectro 10	Espectro de RMN- ¹³ C del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 64
Espectro 11	Espectro de DEPT del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 65
Espectro 12	Espectro de HETCOR del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 66
Espectro 12a	Espectro de HETCOR del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 67
Espectro 13	Espectro de IR del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a). 69
Espectro 14	Espectro de RMN- ¹ H del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a). 70

Espectro 15	Espectro de RMN- ¹ H bidimensional COSY del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	71
Espectro 16	Espectro de RMN- ¹ H bidimensional NOESY del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	72
Espectro 17	Espectro de RMN- ¹³ C del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	73
Espectro 18	Espectro DEPT del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	74
Espectro 19	Espectro NOEDIF del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	75
Espectro 20	Espectro NOEDIF del acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (23a).	76
Espectro 21	Espectro de IR comparativo del β-D-glucositolsterol (24).	80
Espectro 22	Espectro de IR del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).	85
Espectro 23	Espectro de RMN- ¹ H del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).	86
Espectro 24	Espectro de RMN- ¹ H bidimensional COSY del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).	87
Espectro 25	Espectro de RMN- ¹³ C del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).	88
Espectro 26	Espectro DEPT del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).	89
Espectro 27	Espectro de IR del 3,4',7-éter trimetilico del camperol.	91
Espectro 28	Espectro de RMN- ¹ H del 3,4',7-éter trimetilico del camperol.	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Ejemplos de triterpenoides aislados de la familia Euphorbiaceae. 3
Figura 2	Flavonoides aislados de la familia Euphorbiaceae. 5
Figura 3	Ejemplos de cumarinas aisladas de Euphorbiaceae. 6
Figura 4	Algunos lignanos aislados de la familia Euphorbiaceae. 7
Figura 5	Compuestos fenólicos aislados de la familia Euphorbiaceae. 8
Figura 6	Fenantrenos y quinonas aislados de la familia Euphorbiaceae. 9
Figura 7	Alcaloides de la familia Euphorbiaceae. 10
Figura 8	Glucósidos cianogenéticos de Euphorbiaceae. 11
Figura 9	Glucosinolatos aislados de la familia Euphorbiaceae. 12
Figura 10	Hierba de la golondrina (<i>Chamaesyce prostrata</i>). 14
Figura 11	Metabolitos aislados de <i>Chamaesyce prostrata</i> . 15
Figura 12	Compuestos aislados recientemente de <i>Chamaesyce prostrata</i> . 17
Figura 13	Estructuras posibles del compuesto (21a). 44
Figura 14	Comparación de los desplazamientos químicos observados para núcleos de triterpenoides descritos previamente y el compuesto (21a). 45
Figura 15	Ubicación del grupo β -acetoxi en el compuesto (21a). 46
Figura 16	Estructura del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a). 46
Figura 17	Estructura del β -sitosterol (22). 54
Figura 18	Posibles estructuras del compuesto (23). 57
Figura 19	Comparación de los espectros de RMN-1H del compuesto (23) y su derivado acetilado. 58
Figura 20	Estructura del 3,6-éter dimetilico del camperol (23). 59
Figura 21	Estructura del β -D-glucositolsterol (24). 79
Figura 22	Estructura del 7-O- β -D-glucosil-camperol (25). 83

LISTA DE GRAFICAS

	Página
GRAFICA 1 Efecto del extracto $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de <i>Chamaesyce prostrata</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	40
GRAFICA 2 Efecto del compuesto (23) sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	78
GRAFICA 3 Efecto del compuesto (26) sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	94

LISTA DE ABREVIATURAS.

AgNO₃:	Nitrato de plata
ACOEt:	Acetato de etilo
CHCl₃:	Cloroformo
CDCl₃:	Cloroformo deuterado
HCl:	Acido clorhídrico
IsopOH:	Isopropanol
MeOH:	Metanol
Hex:	Hexano
d:	Doblete
dd:	Doblete dobleteado
s:	Singulete
J:	Constante de acoplamiento
δ:	Desplazamiento químico
Hz:	Hertz
TMS:	Tetrametilsilano
RMN-¹H:	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN-¹³C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
IR:	Infrarrojo
UV:	Ultravioleta
mg:	Miligramos
g:	Gramos
μg:	Microgramos
°C:	Grados centígrados

CL₅₀:	Concentración letal media
KBr:	Bromuro de potasio
pf:	Punto de fusión
ml:	Mililitros
DMSO-d₆:	Dimetil sulfóxido deuterado
MeOD:	Metanol deuterado
ppm:	Partes por millón
hrs.:	Horas

I. ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

La familia Euphorbiaceae está constituida por más de 7 000 especies, las cuales están incluidas en aproximadamente 280 géneros, mismos que se encuentran distribuidos en todo el mundo (Ponsinet y Ourisson, 1965). Los géneros más numerosos de esta familia se muestran en el Cuadro 1 (Evans y Taylor, 1983).

Cuadro 1. Principales géneros de la familia Euphorbiaceae.

GENERO	No. DE ESPECIES
<i>Euphorbia</i>	1600
<i>Croton</i>	700
<i>Phyllanthus</i>	480
<i>Acalypha</i>	430
<i>Glochidion</i>	280
<i>Macaranga</i>	240
<i>Manihot</i>	160
<i>Jatropha</i>	150
<i>Traqia</i>	140

Muchas de estas especies han sido objeto de estudios fitoquímicos, los cuales han mostrado que esta familia se caracteriza por la presencia de látex (Ponsinet y Ourisson, 1965), así como también, de un gran número de compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentran: alcaloides (Bhakuni *et al.*, 1970), terpenoides (Monte *et al.*, 1984; Chavez *et al.*, 1982; Burke *et al.*, 1981), lignanos (Pieters *et al.*, 1990), cumarinas (Craveiro *et al.*, 1982), flavonoides (Wagner *et al.*, 1970), etc.

A continuación se hace una breve revisión de los tipos de metabolitos aislados de esta familia (Rizk, 1987).

TRITERPENOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Dentro de la familia, se han aislado e identificado más de 55 triterpenoides (tetra y pentacíclicos), tanto del látex como de diferentes partes de la planta (corteza, flores, hojas, raíces y tallos) (Rizk y El-Missiri, 1986). Algunos de estos triterpenoides (como las α - y β -amirinas), se han encontrado en forma libre o como sus ésteres (acetatos), mientras que otros, como la geniculatina, se encuentran presentes como glicósidos (Tipathi y Tiwari, 1980). En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos de triterpenoides descritos en la familia.

Por otra parte, en diferentes especies de Euphorbiaceas se ha identificado el β -sitosterol, además de otros esteroides que se encuentran en cantidades relativamente pequeñas, como estigmasterol, campesterol, dihidrobrassicasterol y colesterol (Rizk y El-Missiry, 1986).

ACIDOS GRASOS

La composición y caracterización de ácidos grasos ha sido reportada para relativamente pocas especies de las Euphorbiaceas. Además de los ácidos grasos saturados e insaturados más comunes, se han obtenido algunos otros de aceites de semillas, por ejemplo, el ácido ricinoleico ($C_{18}H_{34}O_3$) (Vickery y Vickery, 1979) y el ácido α -eleosteárico ($C_{18}H_{30}O_2$) (Sarkar y Chakrabarty, 1956a).

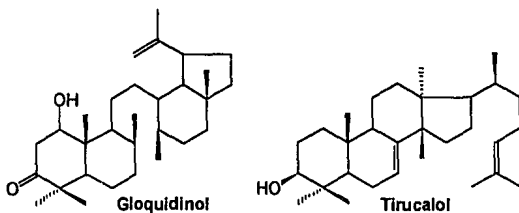


Figura 1. Ejemplos de triterpenoides aislados de la familia Euphorbiaceae.

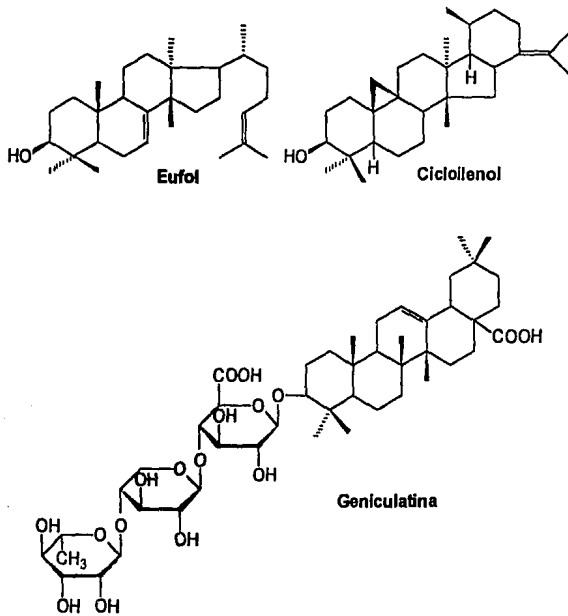


Figura 1. Ejemplos de triterpenoides aislados de la familia Euphorbiaceae (continuación).

FLAVONOIDES

La familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides, particularmente flavonas, flavonoles y flavanonas, siendo el camperol y la quercetina (así como sus glicósidos), los flavonoides más ampliamente distribuidos en los diferentes géneros de la familia (Rizk y El-Missiry, 1986; Rizk *et al.*, 1980a, b; Sahai *et al.*, 1981; Rizk *et al.*, 1976; Rizk *et al.*, 1979; Rizk *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1979; Pohl *et al.*, 1975; Ismail *et al.*, 1977). En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de flavonoides aislados de la familia.

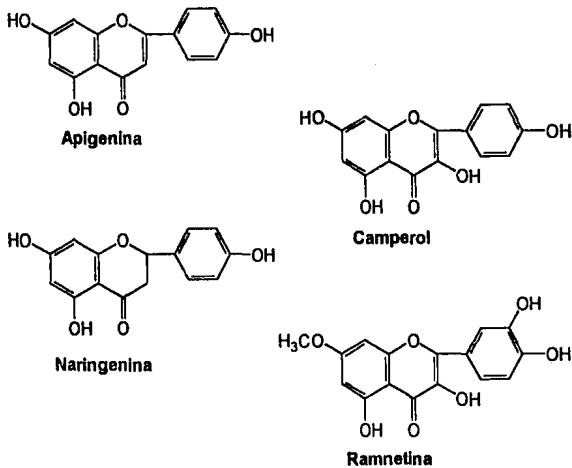


Figura 2. Flavonoides aislados de la familia Euphorbiaceae.

CUMARINAS

Estos compuestos han sido aislados de un número relativamente pequeño de plantas de esta familia. En la Figura 3 se presentan algunos de ellos (Dutta *et al.*, 1972; Dutta *et al.*, 1975; Shang *et al.*, 1979).

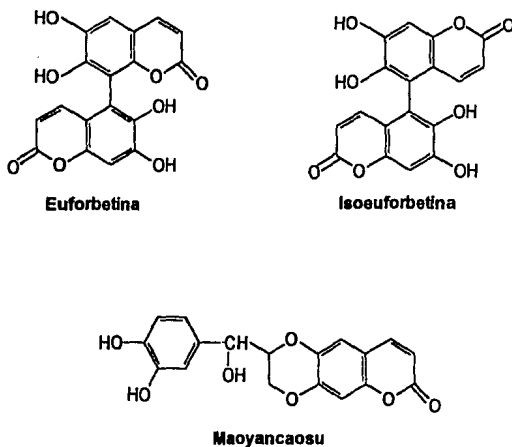


Figura 3. Ejemplos de cumarinas aisladas de Euphorbiaceas.

LIGNANOS

Los lignanos han sido identificados únicamente en los géneros *Jatropha* y *Phyllanthus*, en los cuales se han encontrado metabolitos como 2-piperonilideno-3-veratril-3-*R*-*o*-butirolactona (Chatterjee *et al.*, 1981), gadaína (Banerji *et al.*, 1984), filantina e hipofilantina (Rizk y El-Missiry, 1986). Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 4.

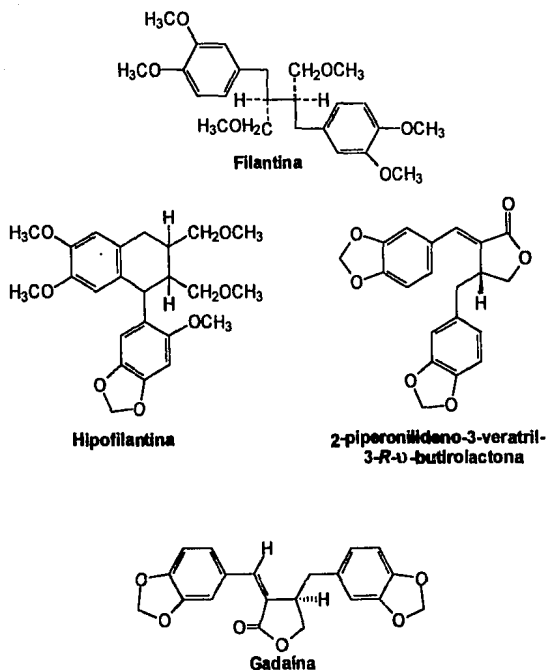


Figura 4. Algunos lignanos aislados de la familia Euphorbiaceae.

TANINOS

Se han detectado taninos hidrolizables en diversas especies de las Euphorbiaceas (Rizk y El-Missiry, 1986), algunos de los cuales se muestran en la Figura 5.

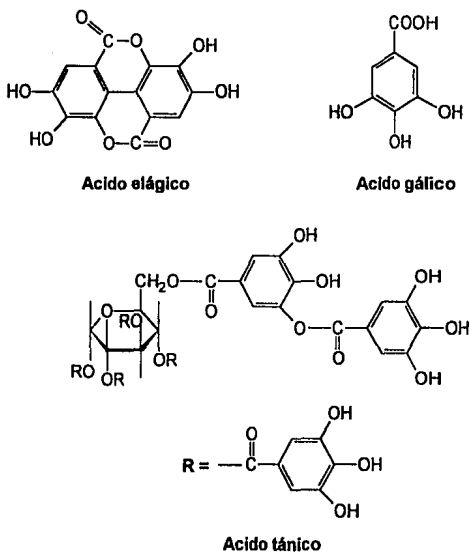


Figura 5. Compuestos fenólicos aislados de la familia Euphorbiaceae.

FENANTRENOS Y QUINONAS

En algunas especies de esta familia han sido identificados fenantrenos tales como los micrandroles E y F (de Alvarenga *et al.*, 1976). Por otra parte, también se han aislado quinonas como la 2-metilantraquinona (Talapatra *et al* 1981) y diversas ubiquinonas (Law *et al.*, 1970). Las estructuras de estos metabolitos se muestran en la Figura 6.

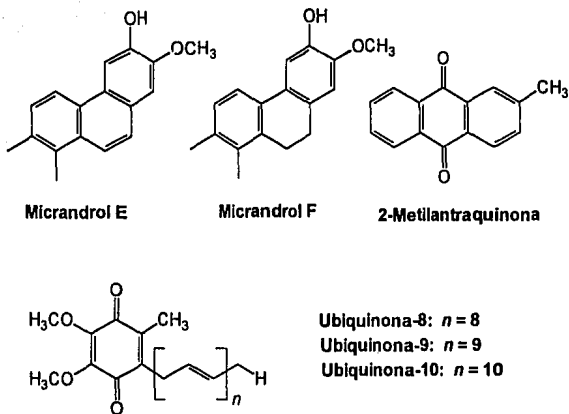
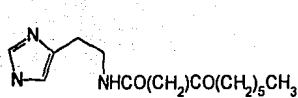


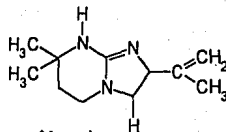
Figura 6. Fenantrenos y quinonas aislados de la familia Euphorbiaceae.

ALCALOIDES

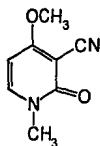
En ciertos géneros de esta familia, están presentes diversas clases de alcaloides, entre los cuales se pueden mencionar, alcaloides de tipo imidazólicos (Jhons y Lamberton, 1967), pirimidínicos (Hart *et al.*, 1969, 1970), piperidínicos (Ponsinet y Ourisson, 1965), piridínicos (Rizk y El-Missiry, 1986), piperidínicos (Manske, 1968), quinolizidínicos (Ponsinet y Ourisson, 1965; Rizk y El-Missiry, 1986), quinazolidínicos (Ponsinet y Ourisson, 1965), isoquinolínicos (Ponsinet y Ourisson, 1965; Bhakuni *et al.*, 1970), morfandienonas (Yamaguchi, 1970), indólicos (Ponsinet y Ourisson, 1965), guanidínicos (Hart *et al.*, 1970), entre otros. En la Figura 7 se presentan algunos ejemplos de estos metabolitos.



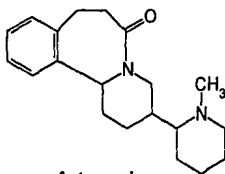
N-4'-oxododecanol-histamina



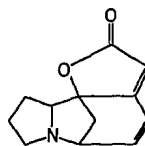
Alcomina



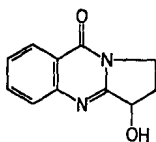
Ricinina



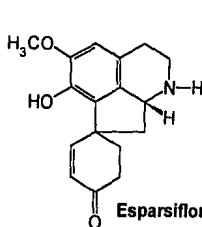
Astrocasina



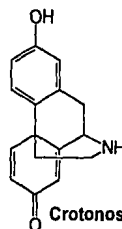
Norsecurinina



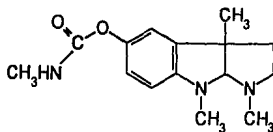
Vasicina



Esparsiflorina



Crotonosina



Fisostigmina

Figura 7. Alcaloides de la familia Euphorbiaceae

GLUCOSIDOS CIANOGENETICOS

Varias especies de Euphorbiaceas se han reportado como cianofóricas, sin embargo, relativamente pocos glucósidos cianogenéticos se han identificado de las mismas (Nahrstedt *et al.*, 1982; Valen, 1978; Rizk y El-Missiry, 1986). En la Figura 8 se muestran algunos ejemplos de estos compuestos.

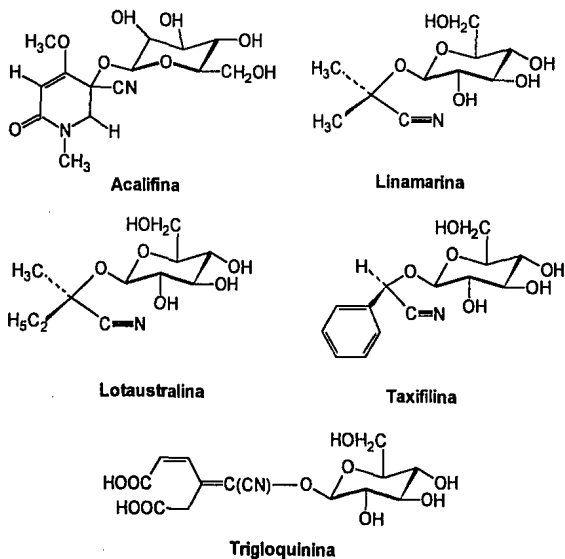


Figura 8. Glucósidos cianogenéticos de Euphorbiaceas.

GLUCOSINOLATOS

Se ha identificado sólo un pequeño número de glucosinolatos en algunas especies de esta familia (Kjaer y Friis, 1962; Rizk y El-Missiry, 1986). En la Figura 9 se muestran algunos de estos metabolitos.

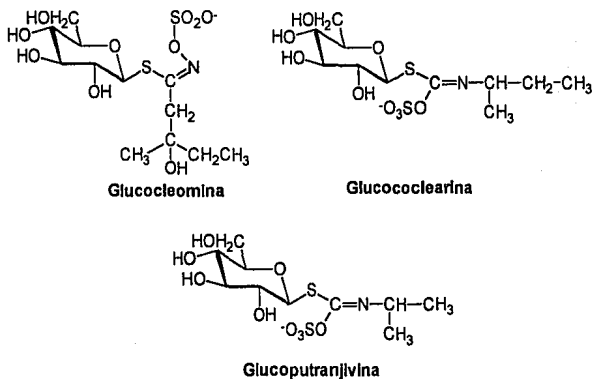


Figura 9. Glucosinolatos aislados de la familia Euphorbiaceae.

2. ANTECEDENTES DE *Chamaesyce prostrata*

La especie *Chamaesyce prostrata* (Ait.) Millsp. (Sinonimia: *Euphorbia prostrata*), pertenece a la familia de las Euphorbiaceas, y es conocida popularmente en México con los nombres de "golondrina", "hierba de la golondrina" y "cilidonia" (Bye y Linares, 1994) (Figura 10).

Esta planta se encuentra distribuida en el valle de México, San Luis Potosí, Durango, Guanajuato, Veracruz, Sonora y Jalisco.

Es una hierba que alcanza a lo sumo 45 cm. de altura, de tallos erectos, muy ramosos y vellosos; hojas redondeadas, opuestas, de aproximadamente un centímetro de largo, con pecíolos cortos, de borde entero, lampiñas en la cara superior y con pelos en la inferior; semillas ovaladas, de cuatro ángulos y rugosas; florece de julio a agosto (Martínez, 1989).

En la medicina tradicional mexicana, se le atribuyen numerosas propiedades medicinales. Así por ejemplo, la hierba seca o fresca, combinada con cabello de elote, lante, hoja de chayote y hoja de nispero, se prepara como té y se toma como agua de tiempo durante un mes, para tratar el mal funcionamiento renal (Azpiri, 1973; López e Hinojosa, 1988; Souza, 1943).

La infusión de la planta entera se toma para aliviar la diarrea (Azpiri, 1973; López e Hinojosa, 1988; Souza, 1943), especialmente si está acompañada por cólicos (Martínez, 1979) o enteritis aguda (Martínez, 1990).

Popularmente se le atribuyen propiedades diuréticas a la infusión de la hierba, así como al látex (Azpiri, 1973; Pulido y Serralta, 1993; Souza, 1943), lo cual explica su uso en afecciones de las vías urinarias.

Adicionalmente, el látex y la infusión se emplean para el tratamiento de furúnculos, heridas, erupciones, decoloraciones de la piel y para el ennubecimiento de la córnea (López e Hinojosa, 1988; Martínez, 1990; Souza, 1943).

Por otra parte, se describe el uso de la planta para el alivio de la constipación, así como sus propiedades astringentes (Souza, 1943).

En Sonora, los indígenas Mayo, Opatá y Yaqui, tratan las picaduras de escorpión y las mordeduras de serpientes con una infusión basada en esta hierba (López e Hinojosa, 1988).

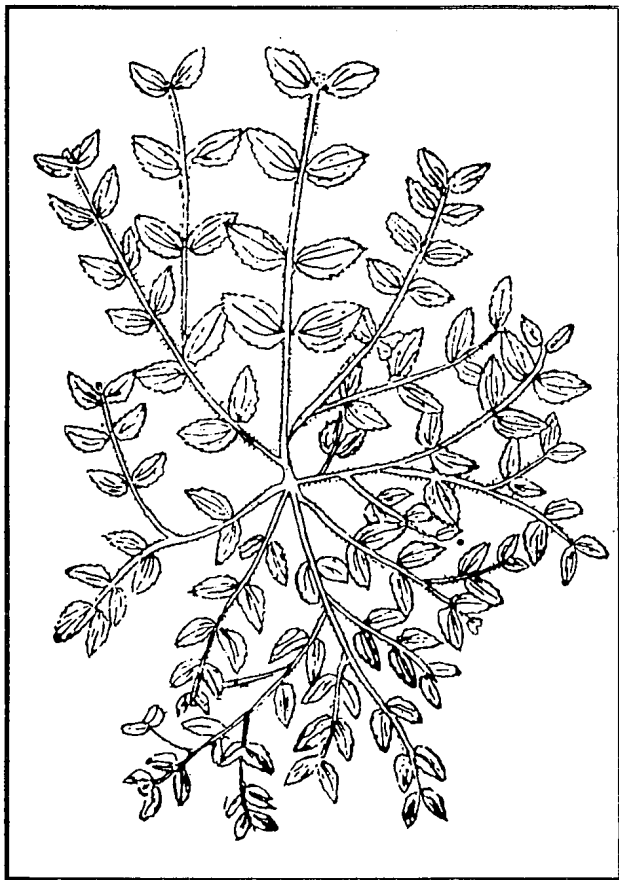


Figura 10. Hierba de la golondrina (*Chamaesyce prostrata*) (Martínez, 1989).

Desde el punto de vista fitoquímico, son escasos los estudios que se han realizado sobre la especie *Chamaesyce prostrata*. Las diferentes investigaciones han permitido el aislamiento e identificación de flavonoides [camperol (1), 3-O-galactosil-ramnetina (2), quercetina (3), 3-O-ramnosil-quercetina (4), 7-O-glucosil-apigenina (5)], diversos hidrocarburos (El-Missiry *et al.*, 1977), esteroides (β -sitosterol, estigmasterol), ésteres metílicos de ácidos grasos de 30 y 32 átomos de carbono, amino ácidos (alanina, isoleucina, ácido 2-amino-*N*-butírico, ornitina, treonina) (Singla y Pathak, 1991), cumarinas y terpenos [cicloart-23-en-3 β ,25-diol (6)] (Rizk *et al.*, 1986; Singla y Pathak, 1991). En la Figura 11 se muestran algunos de los metabolitos mencionados.

Cabe destacar, que en estudios realizados recientemente de las partes aéreas de esta especie, se aislaron las prostratinas A (7), B (9) y C (8), además del glicósido de un flavonoide (11), siete monómeros de taninos hidrolizables [la 1,2,3-O-galoil- β -D-glucosa (12), las telimagrandinas I (13) y II (14), las rugosinas A (15) y B (16), corilagina (17) y geraniina (18)], dos dímeros [las rugosinas D (19) y E (20)] y un trímero [la rugosina G (10)] (Yoshida *et al.*, 1990). En la Figura 12 se muestran las estructuras de estos compuestos.

Finalmente, es importante hacer mención que no hay estudios previos concernientes a la actividad biológica de esta planta.

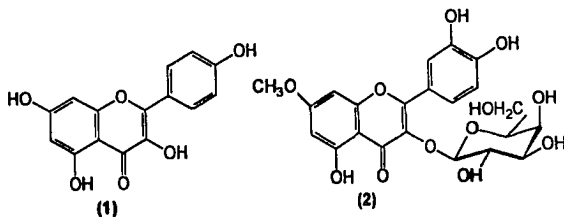


Figura 11. Metabolitos aislados de *Chamaesyce prostrata*.

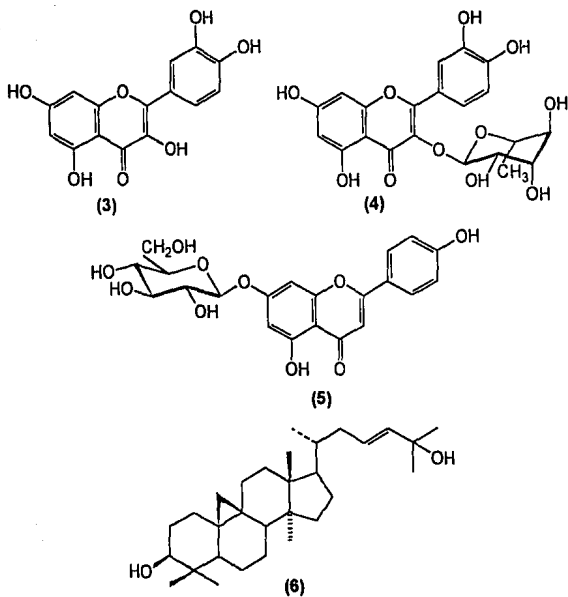


Figura 11. Metabolitos aislados de *Chamaesyce prostrata* (continuación).

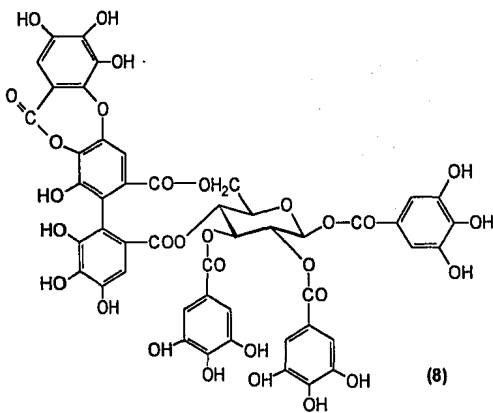
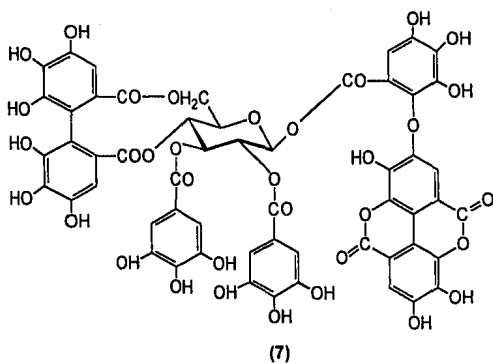
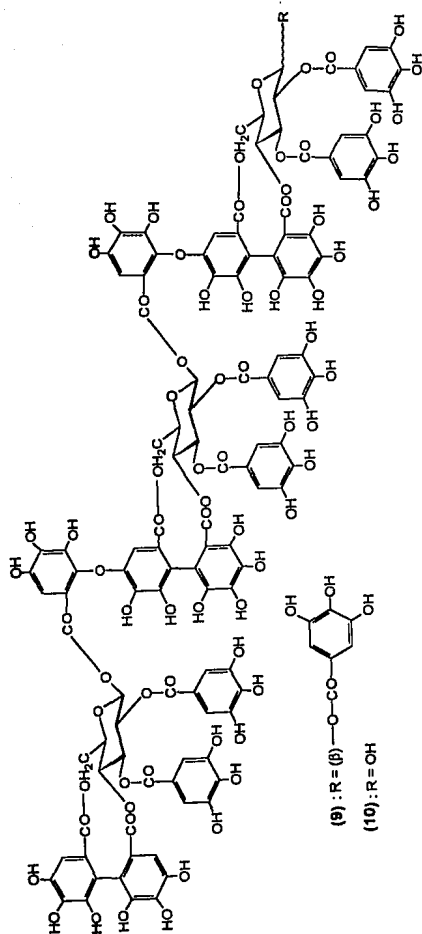
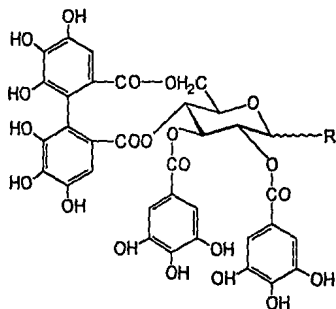
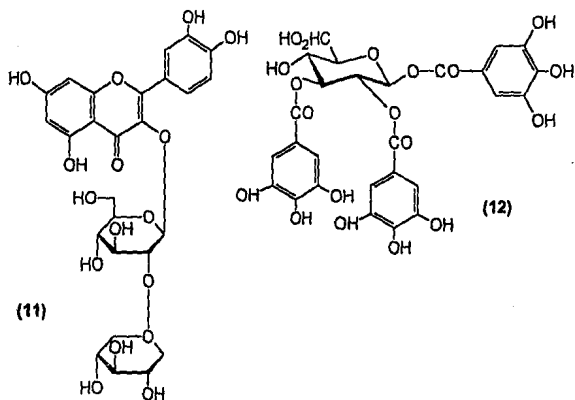


Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *Chamaesyce prostrata*.

Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *C. prostrata* (continuación).



(13) : R = OH

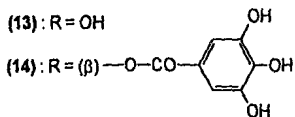


Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *C. prostrata* (continuación).

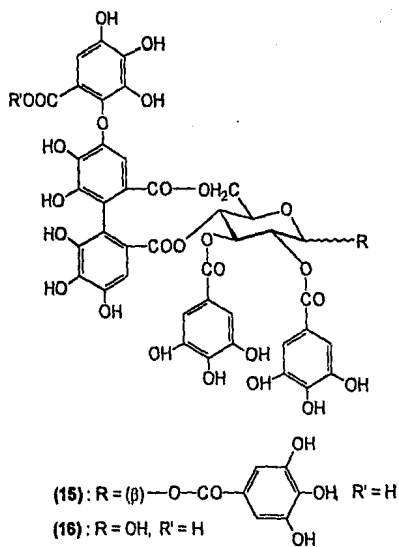


Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *Chamaesyce prostrata* (continuación).

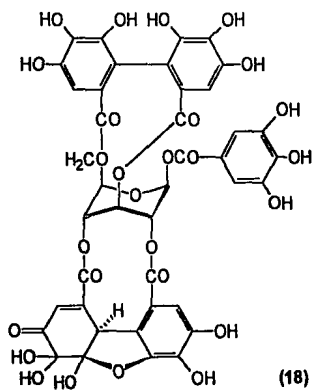
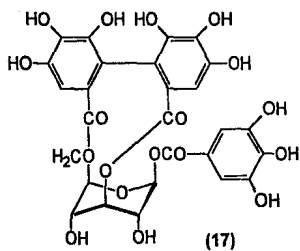


Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *Chamaesyce prostrata* (continuación).

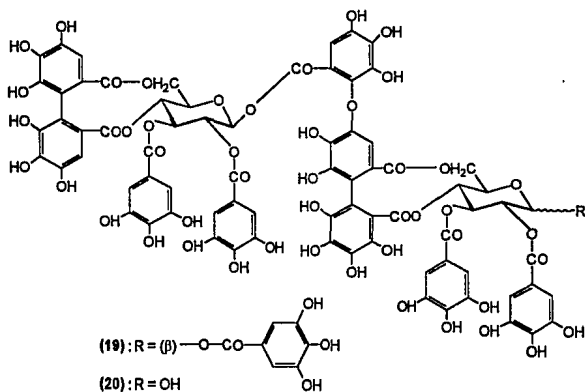


Figura 12. Compuestos aislados recientemente de *Chamaesyce prostrata* (continuación).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

En las últimas décadas, el interés por la búsqueda de nuevos principios activos a partir de materias primas vegetales ha sido notable. La selección de las mismas utilizando como criterio el uso en la medicina tradicional, es un hecho bien documentado, que ha permitido el hallazgo de fármacos importantes (Klayman, 1985; Balandrin *et al.*, 1985; Tyler, 1986; Farnsworth, 1990; Balick, 1990; Cox, 1990; Blechert y Guénard, 1990; Vogel, 1991; Huang *et al.*, 1992; Guénard *et al.*, 1993; *inter alia*). En este sentido, la flora medicinal mexicana representa una fuente potencial valiosísima para la búsqueda de principios activos. El conocido uso tradicional de la misma, así como la gran riqueza y diversidad son sus principales características.

Entre las plantas mexicanas que son utilizadas como agentes terapéuticos en la medicina popular y que potencialmente podrían constituir fuentes de principios activos, se encuentra *Chamaesyce prostrata*, la cual, como se mencionó previamente, es utilizada como agente antidiarreico y antiséptico, para quitar manchas de la piel y córnea, para aliviar picaduras de alacrán y mordeduras de serpientes, así como para el mal funcionamiento renal.

Con base en lo antes expuesto y considerando que no existe ningún reporte previo de dicha planta en México, se consideró pertinente realizar el estudio fitoquímico de dicha especie, como parte de un estudio sistemático de plantas usadas en la medicina tradicional, con la finalidad de obtener en lo posible constituyentes bioactivos de esta especie medicinal, así como contribuir al conocimiento integral de la flora mexicana. Indudablemente, en el caso de obtener sustancias activas, este proyecto podría constituir una aportación para la resolución de problemas de salud pública nacional.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos planteados para el presente trabajo son los siguientes:

1. Recopilar la información bibliográfica acerca de los aspectos biológicos, fitoquímicos, etnobotánicos y taxonómicos de *Chamaesyce prostrata*.
2. Efectuar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales.

3. Preparar el extracto de la planta (hojas, tallos y raíces) de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlo mediante los métodos adecuados.

4. Separar y purificar el mayor número de constituyentes posibles de las diferentes fracciones obtenidas.

5. Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los productos aislados.

6. Preparar algunos derivados semisintéticos de los compuestos aislados con la finalidad de establecer de manera inequívoca la estructura de los mismos.

7. Determinar la toxicidad del extracto, fracciones y/o compuestos aislados para *Artemia salina* Leach, considerando que este bioensayo permite detectar de forma preliminar actividades biológicas más complejas.

8. Determinar el efecto del extracto total, así como de algunos de los compuestos puros aislados sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crus-galli* y *Amaranthus hypochondriacus*.

9. Determinar la actividad antifúngica potencial del extracto total y de algunos de los compuestos puros sobre las especies *Pythium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium sp.*

III. PARTE
EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (hojas, tallos y raíces) de *Chamaesyce prostrata*, se recolectó en Cuautla, Morelos, en junio de 1992 y fue identificada por el Dr. Robert Bye, del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher, E. Linares y R. Bye 269).

La planta se secó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino de cuchillas, modelo Wiley 4.

2. METODOS DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR

El material vegetal molido (2.2 kg), se extrajo ocho veces con un volumen total de 15 litros de una mezcla de CHCl_3 -MeOH 1:1, dejando entre cada extracción un período de 48 hrs., al término de cada una de las cuales se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose finalmente un total de 160 g de extracto seco.

El extracto obtenido, se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (1.6 kg de Sílica Gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 170 fracciones de un litro cada una, combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares.

En el Cuadro 2 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de *Chamaesyce prostrata*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA
Hexano	100	1-2	I
		3-4	II
		5-10	III
Hex/CHCl ₃	90:10	11-19	IV
		20-23	V
Hex/CHCl ₃	80:20	24-41	VI
Hex/CHCl ₃	60:40	42-46	VII
Hex/CHCl ₃	50:50	47-56	VIII
Hex/CHCl ₃	30:70	57-64	IX
		65-66	X
		67-90	XI
CHCl ₃	100	91-95	XII
		96-110	XIII
CHCl ₃ /MeOH	98:2	111-116	XIV
CHCl ₃ /MeOH	96:4	117-118	XV
		119-125	XVI
CHCl ₃ /MeOH	90:10	126-127	XVII
		128-137	XVIII
CHCl ₃ /MeOH	80:20	138-144	XIX
		145	XX
CHCl ₃ /MeOH	70:30	146-160	XXI
CHCl ₃ /MeOH	50:50	161-170	XXII

3. ANALISIS CROMATOGRAFICOS

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 GF254 Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos. Los sistemas de elución y los reactivos reveladores empleados se resumen en los Cuadros 3 y 4, respectivamente.

Cuadro 3. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SIST. DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	Hex/CHCl ₃	Diversas
B	CHCl ₃ /MeOH	Diversas
C	CHCl ₃	100
D	IsopOH/AcOEt/H ₂ O	83:11:6

Cuadro 4. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA	
Sulfato cérico*	Sulfato cérico	12.0 g	Sthal, 1969
	Acido sulfúrico conc.	22.2 ml	
	Hielo	350.0 g	
Acido sulfúrico 10 %*	Acido sulfúrico conc.	10.0 ml	
	Agua destilada	90.0 ml	
Anisaldehído*	Anisaldehído	0.5 ml	
	Etanol	9.0ml	
	Acido sulfúrico conc.	0.5 ml	
	Acido acético	1.0 ml	

*Para el desarrollo de color es necesario calentar por dos minutos aproximadamente a 110°C.

4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

Para determinar la toxicidad para *A. salina* se utilizó el método descrito por Meyer y colaboradores (1982). El procedimiento se describe a continuación:

4.1.1 Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos) se prepararon disolviendo 20 mg del material en 2 ml del disolvente apropiado. De esta solución se transfirieron 500, 50 y 5 μ l a tres frascos viales, dejándose evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío; cada concentración se preparó por triplicado.

4.1.2 Incubación de los huevecillos de *Artemia salina*.

Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en un medio salino artificial durante un período de 48 hrs.

4.1.3 Bioensayo.

Se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los viales que contenían las muestras a evaluar y se aforó a 5 ml con medio salino artificial, obteniéndose una concentración final de 1000, 100 y 10 μ g/ml. Los viales se mantuvieron con iluminación durante 24 hrs.; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de microorganismos sobrevivientes, para calcular la CL₅₀ o el porcentaje de mortalidad. En el primer caso se utilizó el programa de análisis de probabilidad de Finney.

Cabe mencionar que para que un extracto o fracción se considere activo la CL₅₀ debe ser menor a 1000 μ g/ml, y en el caso de un compuesto puro la CL₅₀ debe ser menor a 200 μ g/ml (Anderson *et al.*, 1991).

4.2 Determinación de la actividad alelopática y antifúngica del material vegetal, del extracto total y de algunos de los compuestos puros.

El potencial alelopático del extracto, así como el de algunos de los compuestos puros, se determinó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*; en el caso del material vegetal la evaluación se realizó sobre un lixiviado acuoso.

Con respecto a la determinación de la actividad antifúngica los ensayos se realizaron sobre hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Pythium*. En todos los casos se determinó el efecto sobre el crecimiento radial.

Estas evaluaciones fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por la Bióloga Blanca Hernández. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a la metodología descrita para este tipo de bioensayos (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1992).

5. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS

5.1 Obtención del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).

La fracción X (Cuadro 2), fue sometida a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta, empleándose 2.35 g de muestra y 70 g de gel de sílice. Se obtuvieron un total de 92 fracciones de 20 ml cada una, utilizando como eluyentes hexano y hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas que resultaron similares. En el Cuadro 5 se resumen los sistemas de elución empleados, así como las fracciones combinadas.

De la fracción secundaria XXVII (Cuadro 5), se aislaron 212 mg de un sólido amorfo, de color blanco, soluble en CHCl_3 . La cromatografía en capa fina de este sólido mostró una mezcla de compuestos, por lo que, a fin de separarlo en sus componentes individuales, se procedió a la acetilación del mismo (120 mg de muestra). La mezcla acetilada se sometió a una cromatografía preparativa en capa delgada, empleando como sistema de elución, Hex-AcOEt (98:2). Se emplearon un total de 9 cromatoplaques de gel de sílice (0.25 mm de espesor),

impregnadas con una solución de AgNO₃ al 10%, con 10 mg de muestra cada una y eluidas tres veces.

Como resultado del proceso anterior, se obtuvieron 5 bandas, de las cuales únicamente se separó la que representaba al compuesto mayoritario. De esta manera, se obtuvieron 10 mg del compuesto (21a), como un sólido cristalino, en forma de agujas, soluble en CHCl₃ y con pf = 175 °C.

Cuadro 5. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción X (Cuadro 2).

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA
Hexano	100	1-22	XXIII
Hex/AcOEt	95:5	23-28	XXIV
Hex/AcOEt	90:10	29-30 31-32 33-44	XXV XXVI XXVII
Hex/AcOEt	85:15	45-48 49-65	XXVIII XXIX
Hex/AcOEt	80:20	66-86	XXX
Hex/AcOEt	50:50	87-92	XXXI

5.2 Obtención de β-sitosterol (22).

De la fracción XI (Cuadro 2), se aislaron 54.7 mg de un sólido amorfo de color blanco, soluble en CHCl₃.

5.3 Obtención del 3,6-éter dimetilico del camperol (23).

La fracción primaria XVII (Cuadro 2), fue sometida a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta (3 g de muestra y 105 g

III. Parte experimental

de gel de sílice). Como eluyentes se emplearon hexano-cloroformo, cloroformo-metanol y cloroformo, en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 72 fracciones de 40 ml cada una, combinándose aquellas que resultaron cromatográficamente similares. En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas.

Cuadro 6. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria XVII (Cuadro 2).

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA
Hex/CHCl ₃	20:80	1-15	XXXII
CHCl ₃	100	16-24	XXXIII
CHCl ₃ /MeOH	98:2	25-33	XXXIV
CHCl ₃ /MeOH	96:4	34-46	XXXV
CHCl ₃ /MeOH	92:8	47-61	XXXVI
CHCl ₃ /MeOH	90:10	62-69	XXXVII
CHCl ₃ /MeOH	70:30	70-72	XXXVIII

De la fracción secundaria XXXV (Cuadro 6), precipitaron 304.2 mg de un sólido amorfo de color amarillo, soluble en AcOEt y MeOH, con $pf = 233\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 Obtención de β -D-glucositolsterol (24).

De la fracción XVIII (Cuadro 2) se aislaron 300 mg de un sólido blanco, parcialmente soluble en MeOH, con $pf > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5 Obtención del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).

La fracción primaria XIX (Cuadro 2, 10 g de muestra), se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta, sobre 220 g de gel de sílice. Se obtuvieron un total de 118 fracciones de 100 ml cada una, utilizando como eluyentes cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, uniéndose aquellas que resultaron similares. En el Cuadro 7 se muestran los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

Cuadro 7. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción XIX (Cuadro 2).

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA
CHCl ₃	100	1-3	XXXIX
		4-6	XL
		7-8	XLI
		9-10	XLII
		11-14	XLIII
CHCl ₃ /MeOH	99:1	15-20	XLIV
		21-27	XLV
CHCl ₃ /MeOH	97:3	28-30	XLVI
		31-43	XLVII
CHCl ₃ /MeOH	95:5	44-51	XLVIII
CHCl ₃ /MeOH	90:10	52	XLIX
		53-56	L
		57-62	LI
CHCl ₃ /MeOH	80:20	63-101	LII
CHCl ₃ /MeOH	50:50	102-118	LIII

De la fracción secundaria XL (Cuadro 7), se obtuvieron 1.5 g de un sólido amorfo, de color café oscuro brillante, soluble en MeOH y con $pf > 300$ °C. El análisis cromatográfico en capa fina de este sólido mostró un compuesto mayoritario, el cual se purificó mediante sucesivas cromatografías preparativas, para lo cual se emplearon 8 cromatoplasmas (4 placas de 2 mm y 4 placas de 0.25 mm de espesor, aplicándose en cada una de ellas 250 mg y 10 mg de muestra, respectivamente); como sistema de elución se empleó $CHCl_3$ -MeOH (6:4). Luego de eluir y procesar las placas de manera convencional, se obtuvieron 12 mg de un sólido untuoso, de color amarillo, soluble en MeOH.

5.6 Obtención del polialcohol (26).

De la fracción XXI (Cuadro 2) precipitó espontáneamente un sólido cristalino (300 mg) de color café claro, soluble en agua, ópticamente activo ($[\alpha]_D = -45$), con un $pf = 195-198$ °C.

6. CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

6.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

6.1.1 Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johnes y se reportan sin corregir.

6.1.2 Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599, en pastilla KBr.

6.1.3 Los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se determinaron en el Instituto de Química de la UNAM, en un aparato Varian VXR-3005, utilizando como disolventes $CDCl_3$, piridina- d_5 , $DMSO-d_6$ y MeOD, y como referencia interna TMS.

6.1.4 La rotación óptica fue medida en un polarímetro digital Jasco Dip 360.

6.2 Preparación de los derivados acetilados.

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos (**21**, **22** y **26**) se utilizaron 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 72 hrs.; al cabo de ese tiempo se procesó de la manera convencional (Shriner *et al.*, 1980). En el Cuadro 8 se resumen los compuestos que fueron acetilados, así como los rendimientos y puntos de fusión obtenidos.

Cuadro 8. Rendimiento de los derivados acetilados.

COMPUESTO	PESO DEL COMPUESTO	PESO DEL DERIVADO ACETILADO	PF (°C)
21	120 mg	96 mg	154
23	30 mg	16 mg	130
26	40 mg	70 mg	205

6.3 Preparación del derivado metilado.

Para obtener el derivado metilado del producto aislado (**25**), se utilizó una solución etérea de diazometano, la cual se generó con una solución de hidróxido de potasio (5 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de metanol, 15 ml de éter etílico y 21.5 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald Aldrich), en 45 ml de éter etílico. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a una temperatura de 5 °C; transcurridos 5 minutos, el diazometano etéreo se destiló utilizando un baño maría (58-60 °C) y se recolectó en un recipiente introducido en un baño de hielo.

El producto a metilar se disolvió en metanol y se le adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 24 hrs.

6.4. Prueba de Molisch.

Una pequeña cantidad de los compuestos (25 y 26) se disolvieron en 3 ml de agua destilada y se les adicionó 1 ml de una solución de reactivo de α -naftol (10 % en etanol); seguidamente se adicionaron por las paredes del tubo de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose entonces una coloración violeta en la interfase de los líquidos, lo cual fue indicativo de la presencia de carbohidratos (prueba de Molisch positiva). Paralelamente, se utilizaron un control positivo y un control negativo.

6.5 Hidrólisis ácida.

A 8 mg del compuesto (25), se adicionaron 4 ml de una mezcla de HCl (2 N)-MeOH, en un proporción 1:1. La mezcla de reacción se mantuvo en reflujo con agitación constante durante 48 hrs. Transcurrido este tiempo, se procesó de manera habitual, obteniéndose la aglicona correspondiente (6 mg) (25a).

6.6 Determinación de azúcares.

La presencia de glucosa en el compuesto (25), se determinó en la fase acuosa obtenida previamente, mediante una cromatografía en capa fina en sílica gel, empleando el sistema D (Cuadro 3) y como agente cromogénico anisaldehído (Cuadro 4). Como patrones de referencia se emplearon arabinosa, galactosa, fructosa y glucosa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

El extracto cloroformo-metanólico (hojas, tallos y raíces) de *Chamaesyce prostrata*, así como las fracciones obtenidas, fueron evaluados contra el crustáceo *Artemia salina* Leach, de acuerdo al procedimiento de Meyer y colaboradores (1982), obteniéndose resultados poco satisfactorios ($LC_{50} > 1000$ ppm). Por lo tanto, se procedió a realizar el estudio fitoquímico de manera convencional, con el fin de contribuir al conocimiento de la composición química de la flora medicinal mexicana.

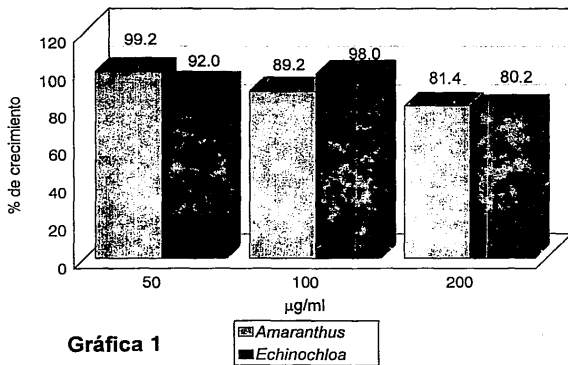
En relación con los ensayos biológicos, el extracto total y el lixiviado fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos y antifúngicos. La actividad alelopática se determinó midiendo el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Los resultados se ilustran en el Cuadro 9 y en la Gráfica 1. En el caso del lixiviado (1 %), se obtuvo un 76.5 % de inhibición, para *A. hypochondriacus* y un 36.4 % de inhibición, para *E. crus-galli*.

Para la determinación de la actividad antifúngica, se realizaron estudios sobre las especies *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium* sp. Los resultados de este último estudio no fueron satisfactorios en ningún caso.

Cuadro 9. Efecto del extracto cloroformo-metanólico de *Chamaesyce prostrata* sobre el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
Ext. 50 µg/ml	99.2	0.8
Ext. 100 µg/ml	89.2	10.8
Ext. 200 µg/m	81.4	18.6
<i>Echinochloa crus-galli</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
Ext. 50 µg/ml	92.0	8.0
Ext. 100 µg/ml	98.0	2.0
Ext. 200 µg/m	80.2	19.8

Efecto del extracto CHCl₃:MeOH (1:1) de *Chamaesyce prostrata* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*



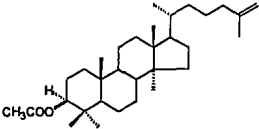
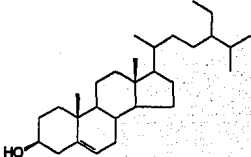
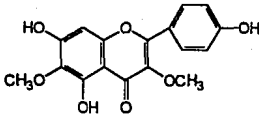
Gráfica 1

IV. Resultados y discusión

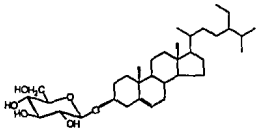
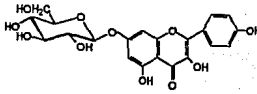
El estudio fitoquímico convencional del extracto permitió el aislamiento de dos esteroides (el β -sitosterol y el β -D-glucositosterol), un triterpenoide (el acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol), dos flavonoides (el 3,6-éter dimetilico del camperol y el 7-O- β -D-glucosil-camperol) y un polialcohol (26).

De manera general, los compuestos aislados fueron identificados y caracterizados mediante sus constantes físicas y espectroscópicas. En el Cuadro 10 se resumen los rendimientos de los compuestos aislados.

Cuadro 10. Rendimiento de los compuestos aislados del extracto cloroformo-metanólico de *Chamaesyce prostrata*.

COMPUESTO	PESO DEL COMPUESTO	% EN RELACION A PLANTA SECA
	10 mg	0.000454
	54.7 mg	0.002486
	304.2 mg	0.013827

Cuadro 10. Rendimiento de los compuestos aislados del extracto cloroformo-metanólico de *Chamaesyce prostrata* (continuación).

COMPUESTO	PESO DEL COMPUESTO	% EN RELACION A PLANTA SECA
	350 mg	0.015909
	12 mg	0.000545
(26)	300 mg	0.013636

La discusión de la elucidación estructural de estos compuestos será el objetivo principal de esta sección.

1. Identificación del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).

El producto (21a) se aisló al recromatografiar la fracción X de la columna original (Cuadros 2 y 5). Por tratamiento con anhídrido acético y piridina en condiciones normales, y después de sucesivas recromatografías en capa fina, se obtuvo el derivado monoacetilado, como un sólido cristalino, en forma de agujas, con $pf = 175^\circ C$. Es importante destacar que el producto (21a) se obtuvo bajo la forma de acetil derivado considerando que en el espectro de IR no se observaron las señales características de un grupo acetato. La fórmula molecular de este derivado se estableció como $C_{32}H_{54}O_2$ por análisis elemental, permitiendo un índice de insaturación de seis.

Su espectro de IR (Cuadro 13, Espectro 1) presentó bandas de absorción características para C-H (2924, 1456 cm^{-1}), grupos metilo geminales (1368 cm^{-1}), doble ligadura (1638 cm^{-1}), carbonilo de éster (1736 cm^{-1}), C-O (1244, 1166 cm^{-1}) y grupo metileno terminal (882 cm^{-1}).

El análisis del espectro de RMN- ^1H (Cuadro 13, Espectro 2) permitió obtener la siguiente información:

- En la zona comprendida entre δ 0.78-1.68, se observaron seis singuletes atribuibles a seis grupos metilo terciarios, uno de los cuales, de acuerdo al desplazamiento químico que presentaba (δ 1.68) debía corresponder a un metilo sobre una doble ligadura.
- En δ 0.84, se observó un doblete ($J = 5.2$ Hz), asignable a un metilo secundario.
- En δ 2.04, se observó un singulete característico para un grupo acetato, confirmando la presencia en el producto natural de solamente un grupo hidroxilo.
- Se observó un doblete dobleteado en δ 4.46 ($J = 10.3, 5.4$ Hz) que integraba para un hidrógeno que, de acuerdo al desplazamiento químico observado, se asignó al protón geminal de un grupo acetato previamente evidenciado por el espectro de IR.
- Finalmente, se observó la presencia de un sistema AB (δ 4.57, d, $J = 2.4$ Hz; δ 4.68, d, $J = 2.4$ Hz), correspondiente a los hidrógenos olefínicos de un metileno terminal.

Por otra parte, el espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 13, Espectro 4) mostró señales para 32 átomos de carbono en congruencia con la fórmula molecular previamente establecida.

De estas 32 señales, las tres desplazadas a campo más bajo (δ 170.09, 137.7 y 109.31) se asignaron a un grupo carbonilo de éster y a dos carbonos de un metileno terminal.

El espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT (Espectro 5), mostró 11 señales negativas (δ 40.0, 38.3, 37.1, 35.5, 34.2, 29.8, 29.7, 27.9, 27.4, 23.7 y 20.95) atribuibles a once metilenos, 14 señales positivas (δ 80.96, 55.3, 48.2, 42.8, 38.05, 27.9, 21.37, 19.3, 18.03, 16.52, 16.2, 16.00 y 14.5), seis de las cuales debían corresponder a grupos metino y las ocho restantes a grupos metilo, por lo cual las cuatro señales faltantes eran atribuibles a cuatro carbonos cuaternarios.

Como se mencionó previamente, la fórmula molecular establecida permitía un índice de insaturación de seis. Con el análisis espectroscópico realizado hasta el momento, se satisfacían dos de las seis insaturaciones, por lo cual, las cuatro restantes podían entonces corresponder a una estructura tetracíclica.

Las características espectroscópicas antes mencionadas, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico (Óksüz *et al.*, 1993), sugirieron que el producto aislado correspondía al derivado acetilado de un triterpenoide tetracíclico sustituido con un grupo metileno terminal y con esqueleto eufano (A), tirucalano (B) o lanostano (C) (Figura 13).

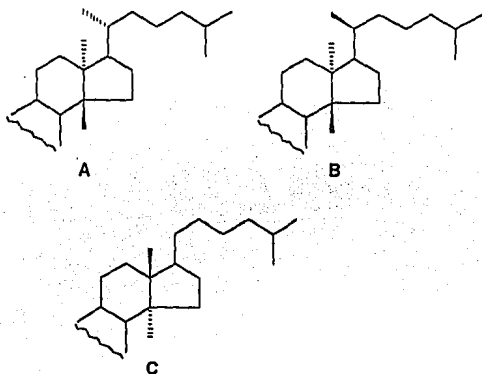


FIGURA 13. Estructuras posibles del compuesto (21a).

A fin de discriminar entre las tres posibilidades, la comparación de los desplazamientos químicos observados para el derivado acetilado del producto natural en los espectros de RMN para el C-13, C-14, C-18, C-28 y C-21, con los previamente descritos en la literatura fueron de gran utilidad. Como se puede

apreciar en la Figura 14, los valores experimentales mostraron una notable similitud con los valores correspondientes para triterpenoides con esqueleto lanostano (Knight, 1973; Gwall, *et al.*, 1992; de Pascual *et al.*, 1987; Shun *et al.*, 1986).

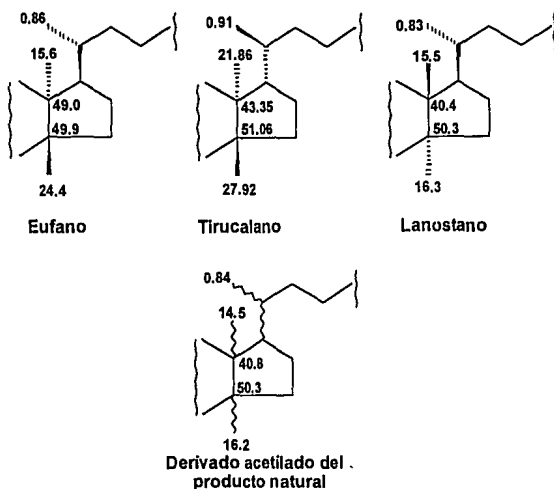


Figura 14. Comparación de los desplazamientos químicos observados para núcleos de triterpenoides descritos previamente y el compuesto (21a).

Por otro lado, el desplazamiento químico y la multiplicidad observada para la señal en δ 4.46 en el espectro de RMN- ^1H y la señal positiva en δ 80.96 en el espectro de RMN- ^{13}C , así como consideraciones de tipo biogénico (Torsell, 1983; Manitto, 1981; Herbert, 1981), permitieron ubicar al grupo acetoxi del derivado (grupo hidroxilo en el producto natural) en la posición C-3 del

anillo A del esqueleto base en disposición β tal como se indica en la Figura 15, por comparación con modelos descritos en la literatura (Özküz *et al.*, 1993; Knight, 1973):

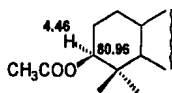


Figura 15. Ubicación del grupo β -acetoxi en el compuesto (21a).

Finalmente, la ubicación del grupo metileno terminal en C-25 se realizó con base al desplazamiento químico observado en el espectro de RMN- ^1H en δ 1.68 atribuible a un metilo sobre doble ligadura, así como por la comparación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos del sistema AB observados para el derivado acetilado del producto natural con los valores descritos previamente en la literatura (Hernández, 1992; Laxman *et al.*, 1986).

Con base en la discusión anterior, el compuesto (21a) fue identificado como el acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol, el cual constituye un nuevo producto natural (Figura 16).

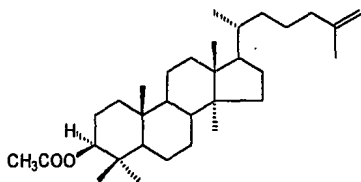
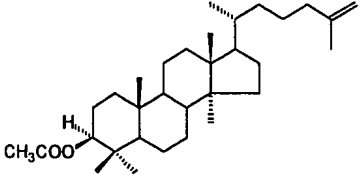
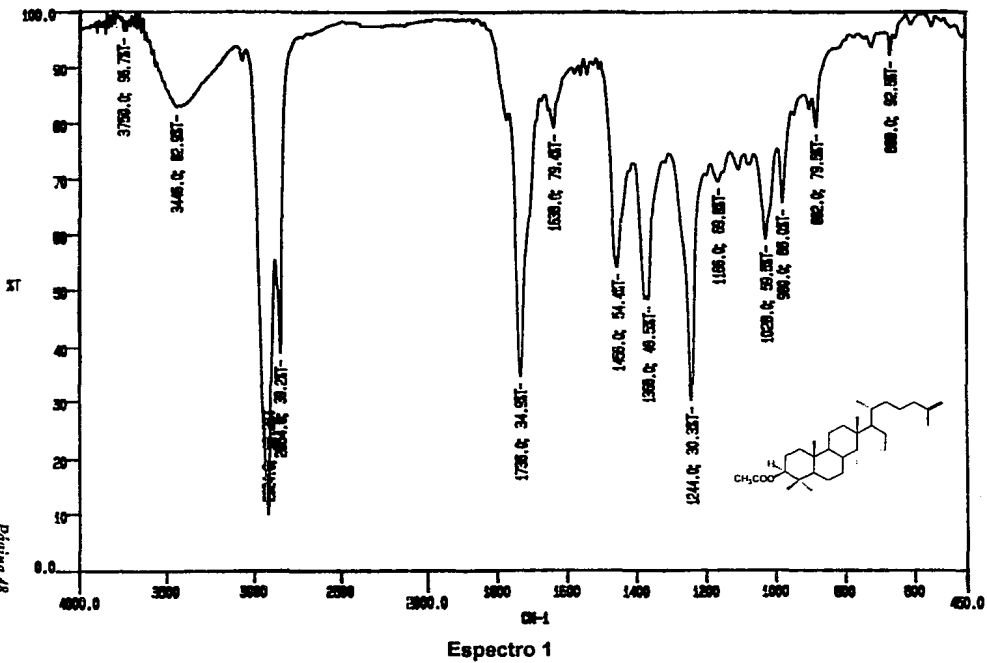
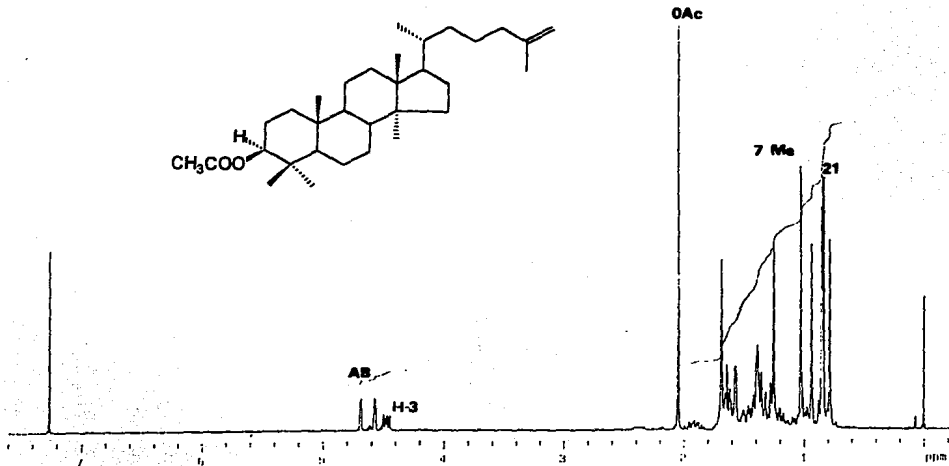
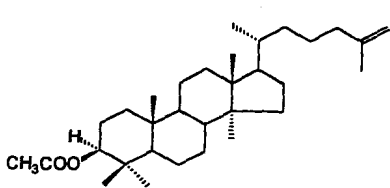


Figura 16. Estructura del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).

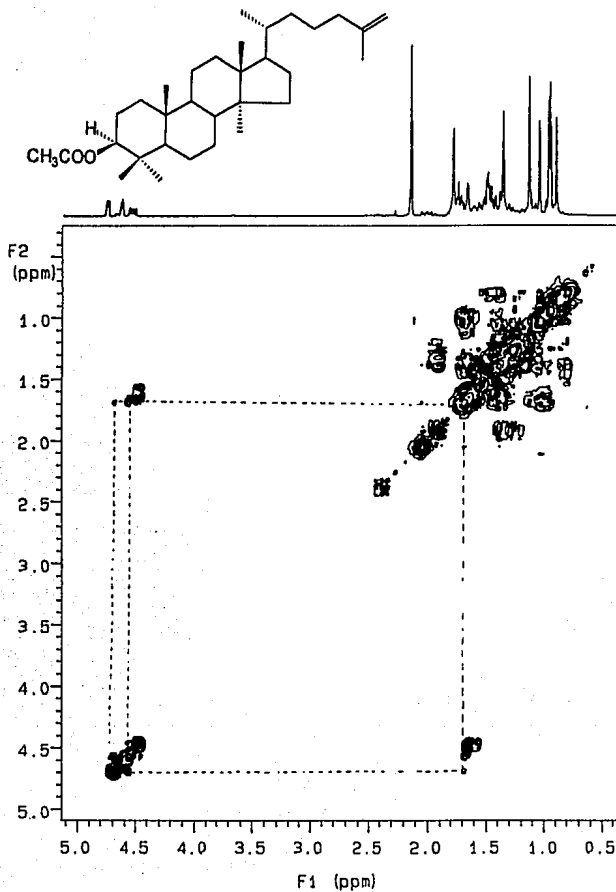
Cuadro 11. Constantes espectroscópicas del acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol (21a).

	
IR ν max. (KBr) cm^{-1} (Espectro 1)	2924, 1959, 1736, 1638, 1338, 1244, 1176, 882.
RMN- ^1H , δ (CDCl_3) (Espectro 2)	4.86 (d, H-27', J= 2.4), 4.57 (d, H-27, J= 2.4), 4.46 (dd, H-3, J= 10.3, 5.4), 2.04 (s, CH_3CO), 1.68 (s, CH_3), 1.25 (s, CH_3), 1.02 (s, CH_3), 0.93 (s, CH_3), 0.84 (d, CH_3 -21, J= 5.2), 0.83 (s, CH_3), 0.78 (s, CH_3).
RMN- ^{13}C , δ (CDCl_3) (Espectro 4)	170.97 (CO), 137.70 (C-25), 109.31 (C-27), 80.96 (C-3), 55.3 (C-5), 50.3 (C-14), 48.2 (C-9, C-17), 42.8 (C-8), 40.08 (C-13), 40.0 (C-24), 38.39 (C-22), 38.05 (C-20), 37.8 (C-4, C-10), 35.5 (C-1), 34.2 (C-12), 29.8 (C-15), 27.9 (C-30, C-16), 27.7 (C-23), 27.44 (C-7), 27.4 (C-2), 23.7 (C-11), 20.95 (C-6), 19.3 (C-19), 18.03 (C-21), 16.52 (C-26), 16.2 (C-28), 16.0 (C-29), 14.5 (C-18).

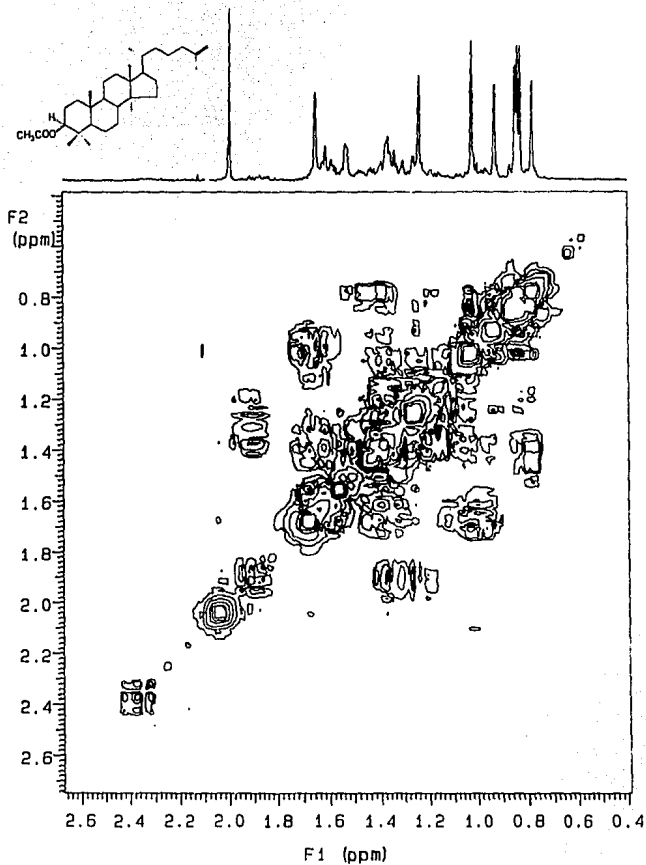




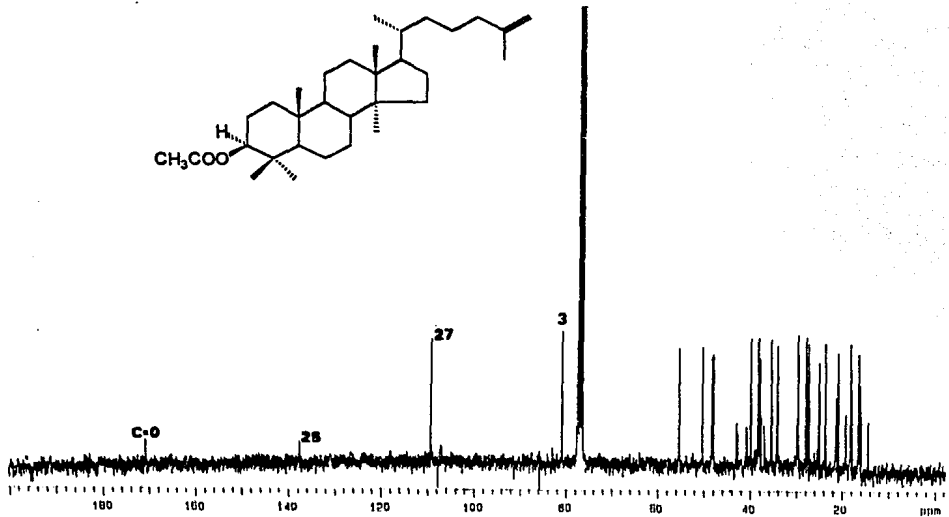
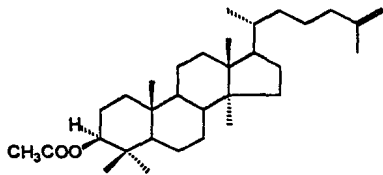
Espectro 2



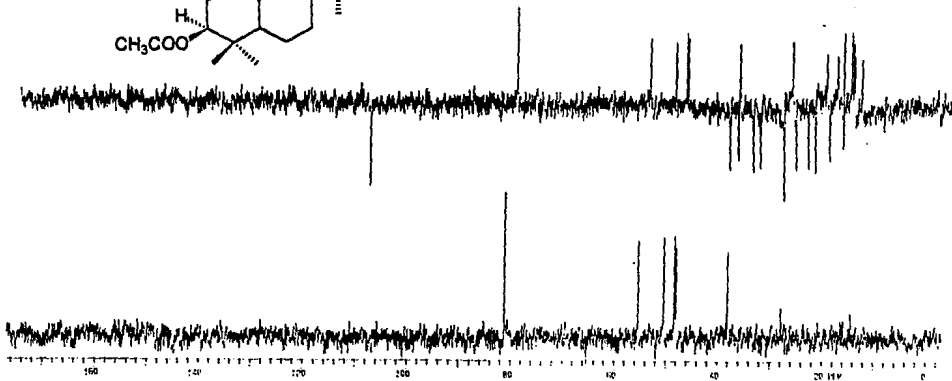
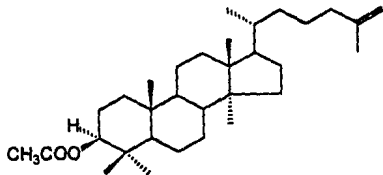
Espectro 3



Espectro 3a



Espectro 4



Espectro 5

2. Identificación del β -sitosterol (22).

El producto (22) se aisló de la fracción XI de la columna original, como un sólido amorfo de color blanco, soluble en CHCl_3 . El compuesto se identificó como β -sitosterol mediante la comparación de su comportamiento cromatográfico y sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra auténtica (Espectro 6, Figura 17).

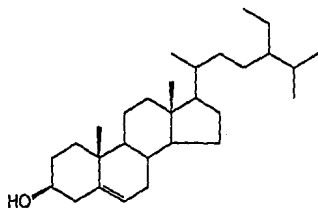
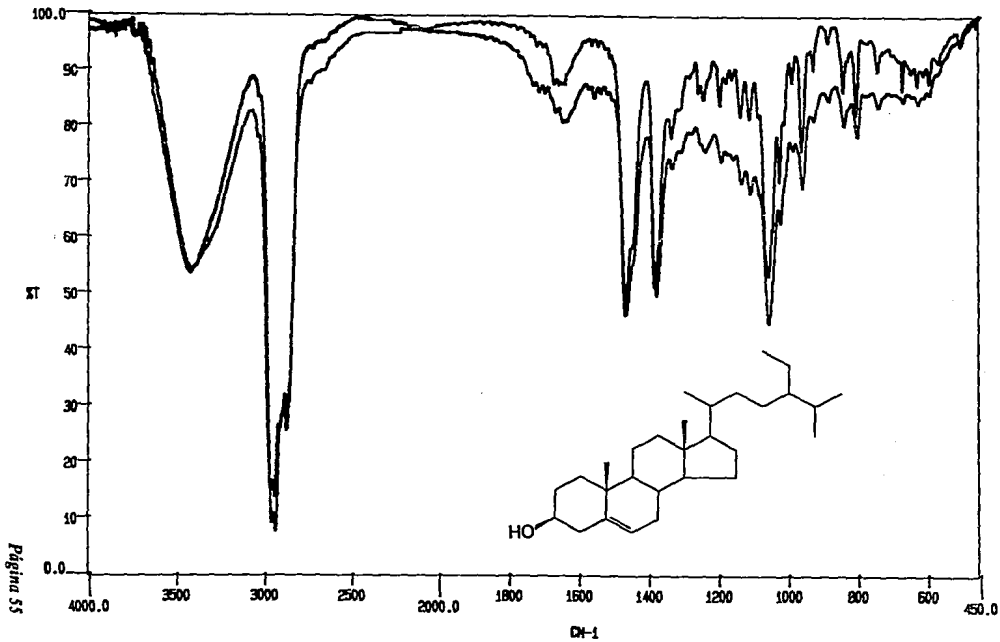


Figura 17. Estructura del β -sitosterol (22).



Espectro 6

3. Identificación del 3,6-éter dimetilico del camperol (23).

El producto (23), se aisló como un sólido amorfo, de color amarillo, con $p_f = 233$ °C, ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como $C_{17}H_{14}O_7$ por análisis elemental.

El espectro de IR (Cuadro 14, Espectro 7), presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3386 cm^{-1}), C-H (2942 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1642 cm^{-1}) y anillo aromático (1612 cm^{-1}).

Por otro lado, el espectro de UV (Cuadro 14, Espectro 8) mostró bandas de absorción a 270 y 340 nm.

Las características espectroscópicas antes mencionadas, el comportamiento cromatográfico mostrado por el producto natural, así como consideraciones de tipo quimiotaconómico (Ismail *et al.*, 1977), permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto (Harborne *et al.*, 1975; Markham *et al.*, 1985).

El análisis detallado del espectro de RMN- ^1H (Cuadro 14, Espectro 9), indicó que el producto (23) era un flavonol, con base a las siguientes evidencias:

- En δ 3.73 y 3.76 se observaron dos singuletes, cada uno de ellos integrando para tres hidrógenos, atribuibles a dos grupos metoxilo.
- En la zona donde resuenan los protones aromáticos, se observó un singulete (δ 6.53) asignable a un hidrógeno aromático aislado.
- Dos dobletes que integraban cada uno para dos hidrógenos (δ 6.93, $J = 8.7$ Hz; δ 7.91, $J = 9.03$ Hz), correspondientes a un sistema A_2B_2 de un anillo aromático *para-sustituido*.
- Las señales observadas en δ 10.2, 10.5 y 12.76 se asignaron a tres grupos hidroxilo, el último de los cuales, de acuerdo al desplazamiento químico observado, debía estar quelatado con un grupo carbonilo.
- Finalmente, la ausencia de la señal característica para H-3 de una flavona (Markham *et al.*, 1985), sugería que la molécula era un flavonol, sustituido con dos grupos metoxilo y tres grupos hidroxilo, uno de los cuales debía estar en C-5 de acuerdo al desplazamiento químico observado en δ 12.76 en el espectro de RMN- ^1H .

Por otra parte, el espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 14, Espectro 10) mostró señales para 15 átomos de carbono, lo cual indicaba la presencia de dos señales equivalentes.

De las 15 resonancias, la señal observada en δ 178.07 se asignó al grupo carbonilo de una γ -pirona, previamente evidenciada por el espectro de IR; las siguientes siete señales (δ 160.07, 157, 155, 152, 151, 137, 131.04) se asignaron a carbonos cuaternarios unidos a funciones oxigenadas.

Adicionalmente, se observaron dos señales en δ 120 y 93.9, atribuibles a dos carbonos cuaternarios no oxigenados.

Por otra parte, las señales observadas en el espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT a δ 130.06, 115.58 y 92.9 (Espectro 11), fueron asignadas a cuatro metinos de un anillo *para*-sustituido y a un metino de un anillo aromático, respectivamente.

Finalmente, las señales en δ 59.95 y 59.6 se asignaron a dos grupos metoxilo.

Con base a la discusión previa, eran factibles cuatro posibles estructuras para el producto natural (A-D, Figura 18).

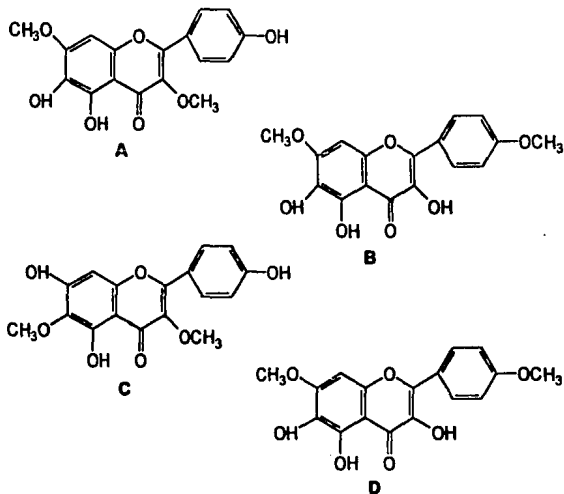


Figura 18. Posibles estructuras del compuesto (23).

A fin de discernir la disposición de los grupos funcionales, la obtención del derivado acetilado del producto natural fue de gran utilidad.

El espectro de RMN-¹H del derivado acetilado (Cuadro 13, Espectro 14) mostró las siguientes diferencias significativas, con respecto al mostrado por el producto natural:

- tres señales características de grupo acetato (δ 2.52, 2.39 y 2.35), confirmando la presencia de tres grupos hidroxilo, y
- el desplazamiento diamagnético observado para las señales atribuibles al sistema A₂B₂ del anillo aromático *para*-sustituido (δ 8.09 y 7.26) y un protón aromático aislado (δ 7.23) (Figura 19).

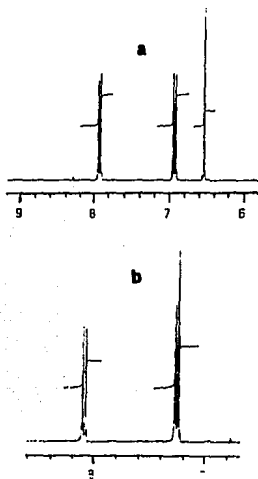


Figura 19. Comparación de los espectros de RMN-¹H del compuesto (23) (a) y de su derivado acetilado (b).

Este análisis permitió descartar, en principio, las posibilidades A, B y D. Sin embargo, a fin de confirmar la ubicación de los grupos metoxilo en la molécula, se decidió realizar experimentos adicionales de NOESY y NOEDIF (Espectros 16, 19 y 20).

En el espectro NOESY, se observó la correlación de la señal en δ 3.87 con una rama del sistema A_2B_2 (δ 8.09), lo cual indicaba claramente la ubicación de un grupo metoxilo en C-3 del núcleo base.

Lo anterior fue confirmado al realizar el espectro NOEDIF, ya que éste mostró la exaltación de la señal en δ 8.09 al ser irradiado el singulete centrado en δ 3.87. De manera adicional, este experimento permitió ubicar el segundo grupo metoxilo en C-6, ya que al ser irradiada la señal en δ 3.87, no se observó la exaltación de ninguna de las señales, por lo cual este grupo debía encontrarse ubicado en la posición antes mencionada.

Con base a lo antes señalado, el compuesto (**23**) se identificó como el 3,6-éter dimetilíco del camperol (Figura 20), el cual ya había sido previamente descrito (Rosler *et al.*, 1971). Cabe destacar sin embargo, que este estudio constituye el primer reporte de la presencia este metabolito en *Chamaesyce prostrata*.

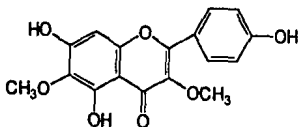
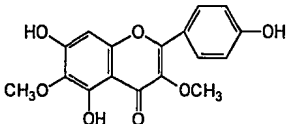
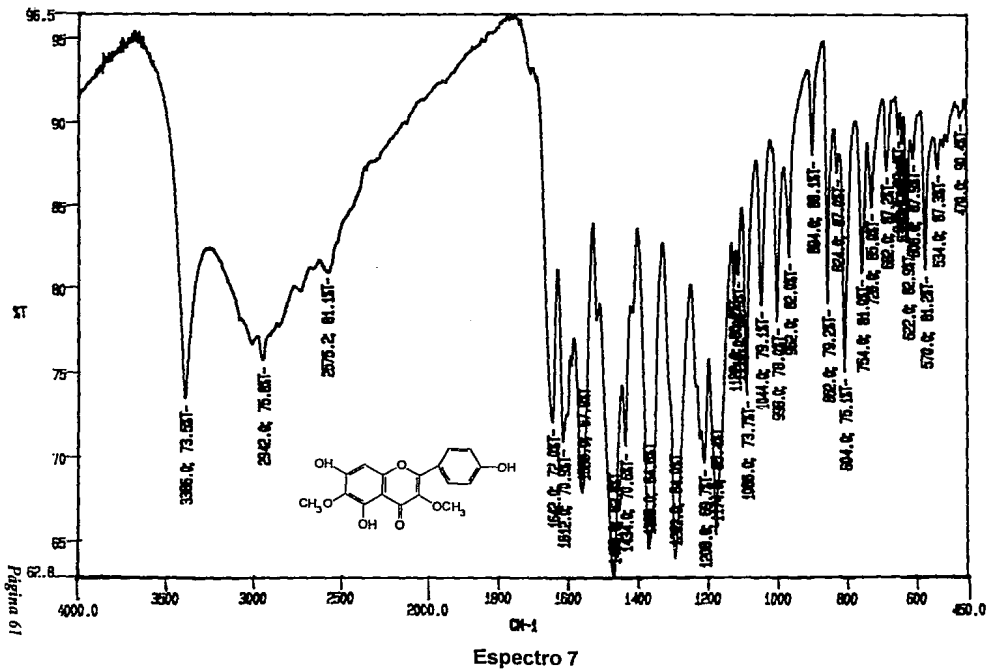
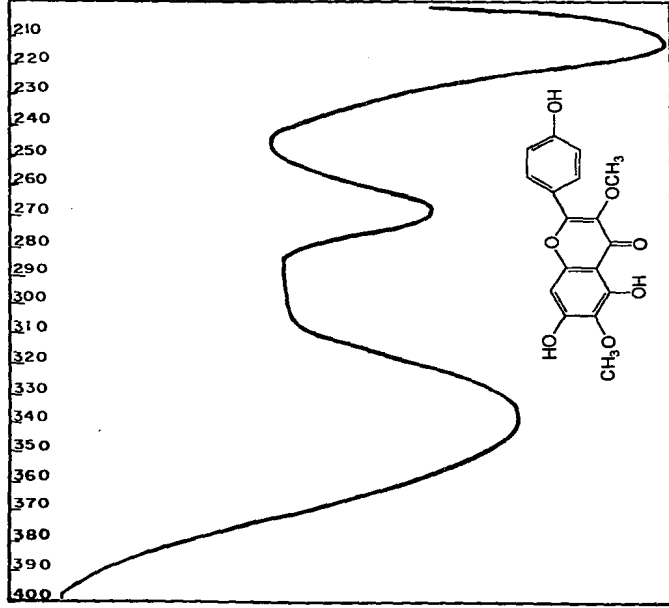


Figura 20. Estructura del 3,6-éter dimetilíco del camperol (**23**).

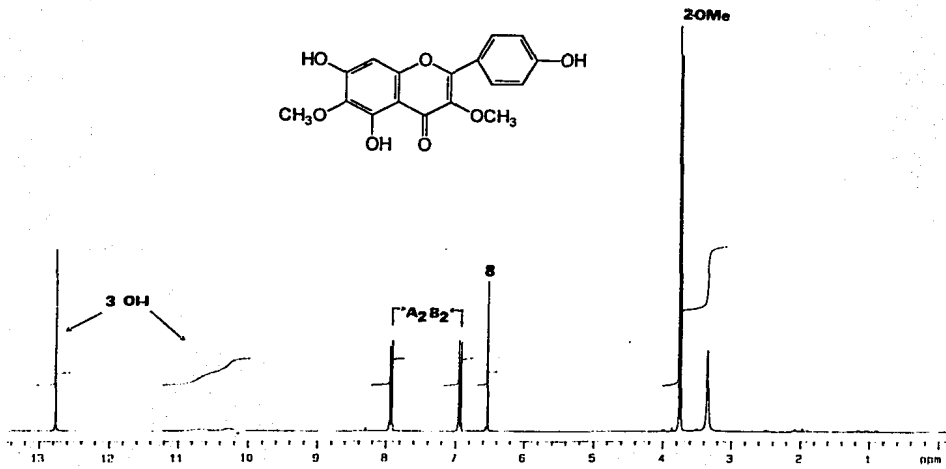
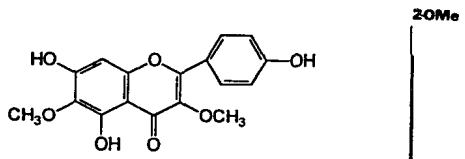
Cuadro 12. Constantes espectroscópicas del 3,6-éter dimetílico del camperol (23).

	
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} (Espectro 7)	3386, 2924, 1642, 1612.
UV (MeOH) nm (Espectro 8)	270, 340.
RMN- ^1H , δ (MeOD) (Espectro 9)	12.76 (s, OH-5), 10.2 (OH-7, OH-4'), 7.91 (d, H-2', H-6', J = 9.03), 6.93 (d, H-3', H-5', J = 8.7), 6.53 (s, H-8), 3.76 (s, OCH ₃ -6), 3.73 (s, OCH ₃ -3).
RMN- ^{13}C , δ (MeOD) (Espectro 10)	178.07 (C-4), 160.07 (C-4'), 157 (C-7), 155 (C-5), 152 (C-9), 151 (C-2), 137 (C-3), 131.04 (C.6), 130.06 (C-2', C-6'), 120 (C-1'), 115.58 (C-3', C-5'), 104.5 (C-10), 93.9 (C-8), 59.9 (OCH ₃ -6), 59.6 (OCH ₃ -3).

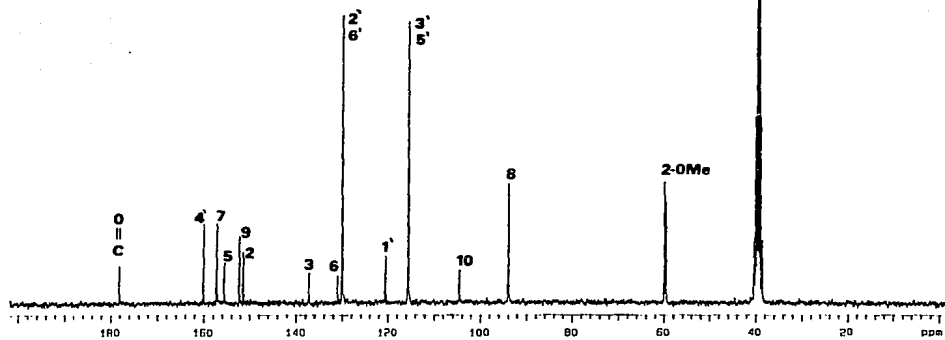
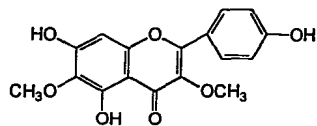




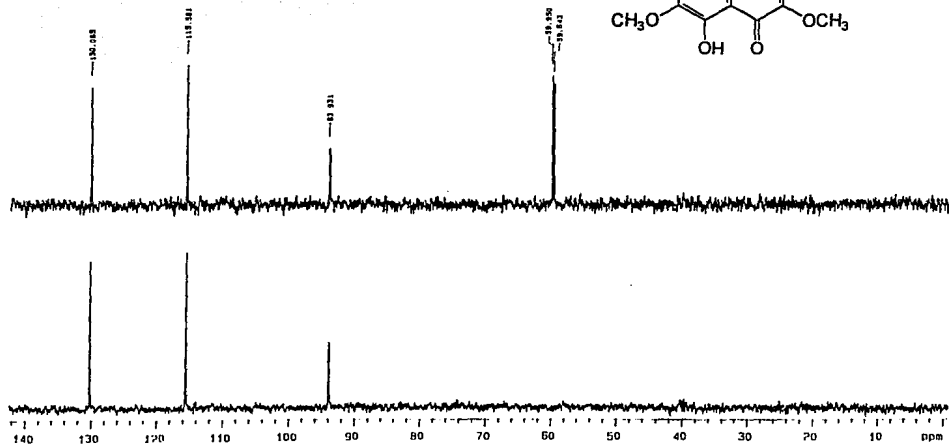
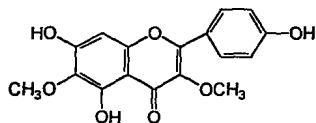
Espectro 8



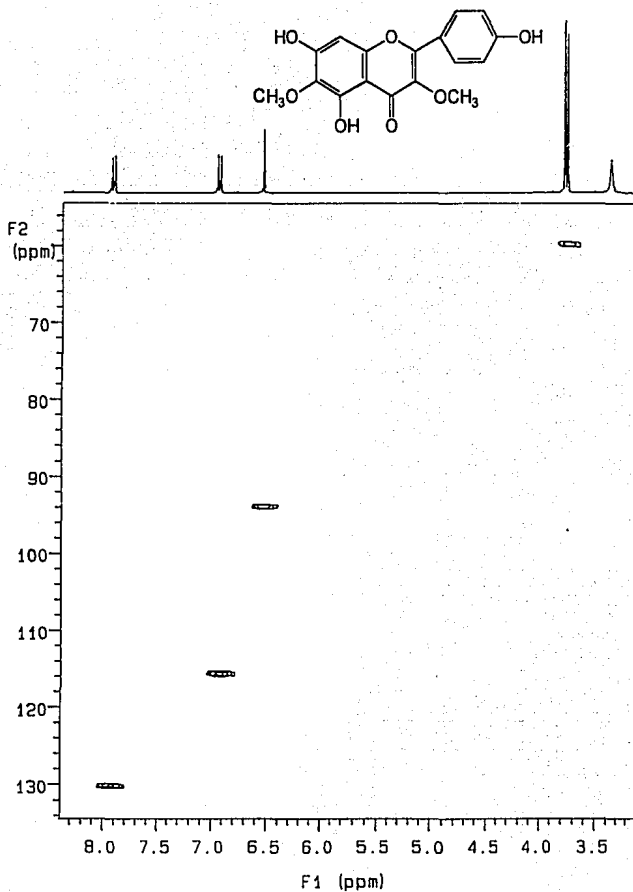
Espectro 9



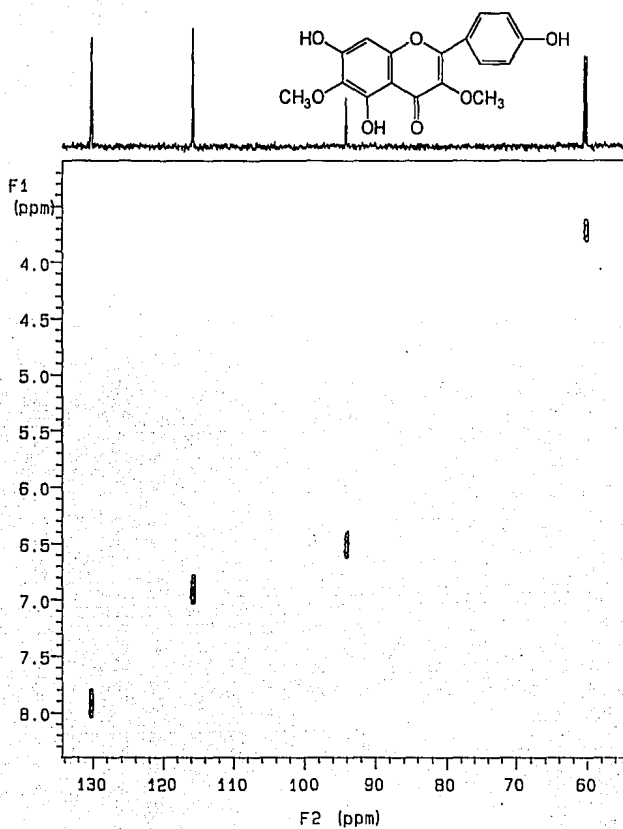
Espectro 10



Espectro 11

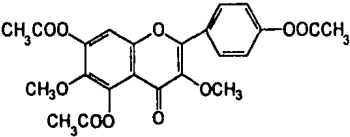


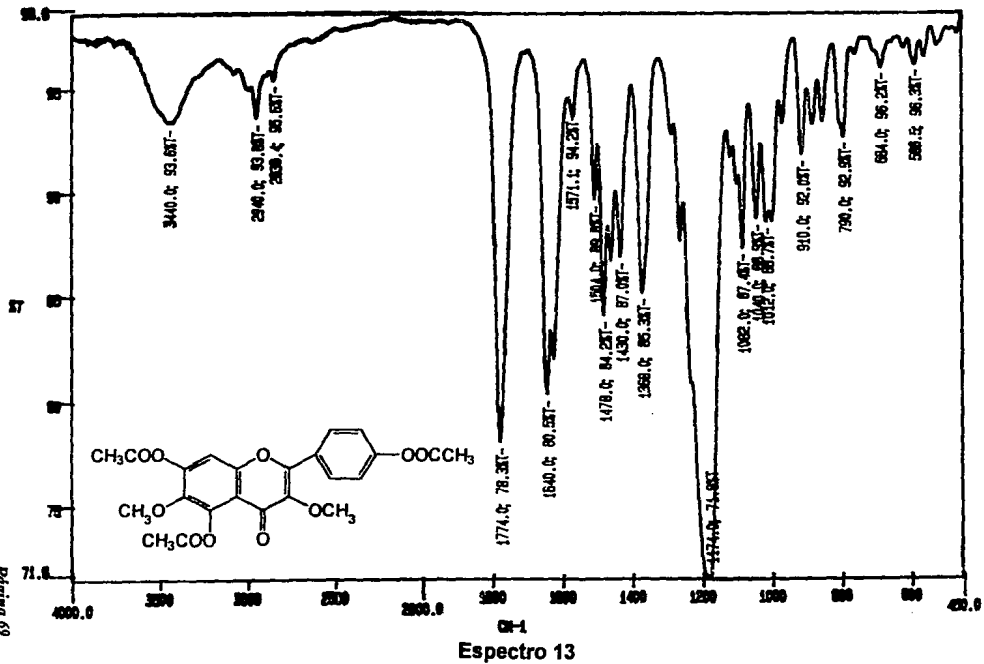
Espectro 12

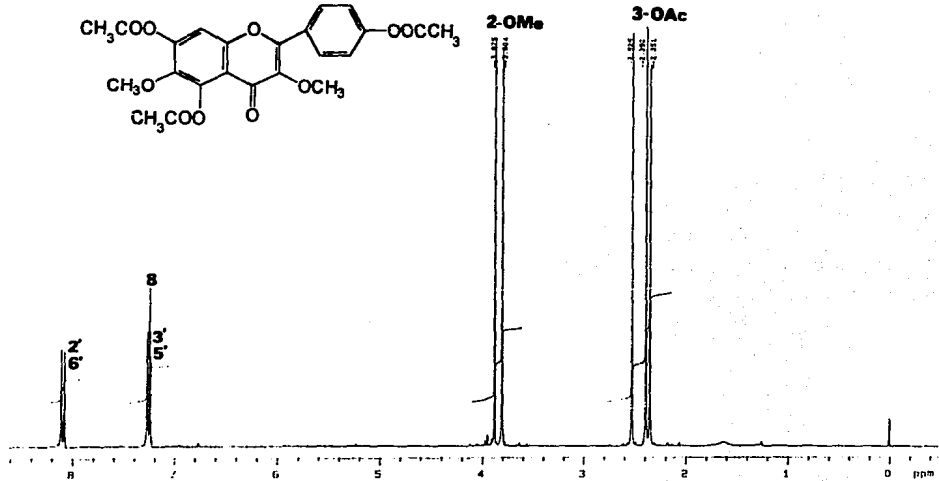
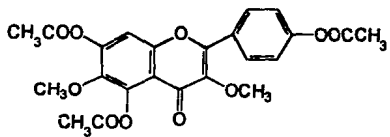


Espectro 12a

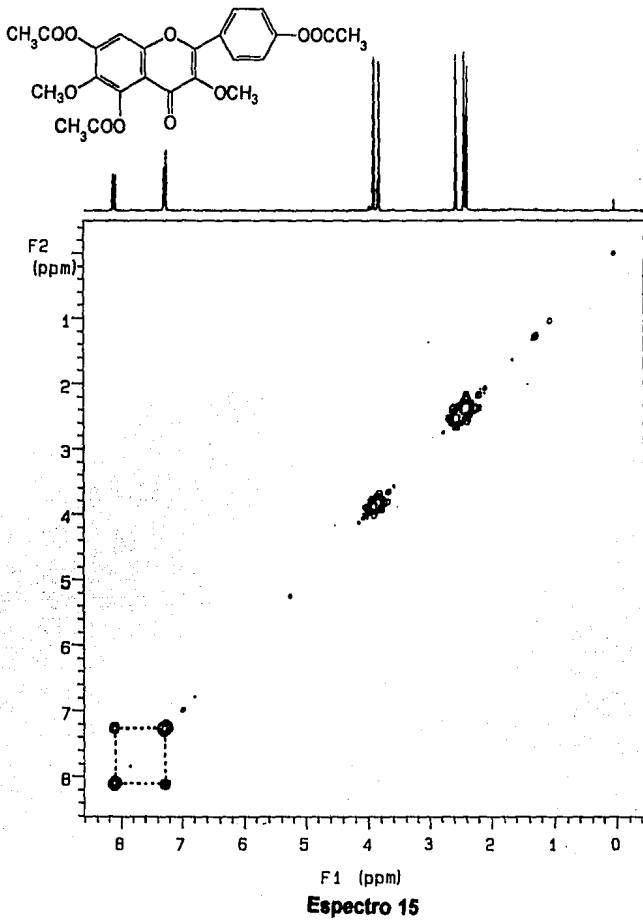
Cuadro 13. Constantes espectroscópicas del derivado acetilado del 3,6-éter dimetilico del camperol (**23a**).

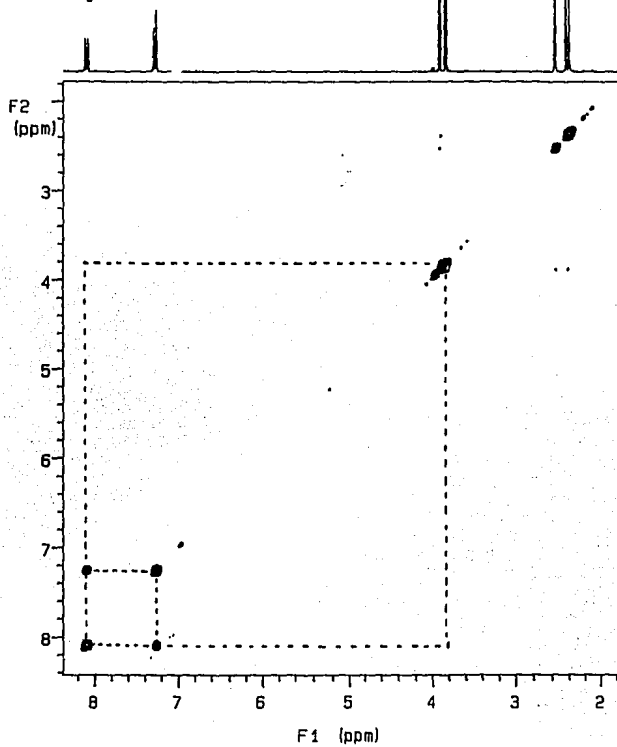
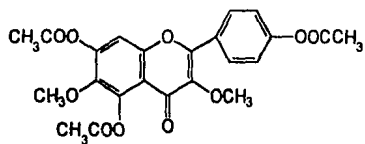
	
IR ν max. (KBr) cm^{-1} (Espectro 13)	2940, 1774, 1640.
RMN- ^1H , δ (MeOD) (Espectro 14)	8.09 (d, H-2', H-6', J= 9), 7.26 (d, H-3', H-5', J= 9), 7.23 (s, H-8), 3.87 (s, 3H, OCH ₃), 3.8 (s, 3H, OCH ₃), 2.52 (s, 3H, CH ₃ COO), 2.39 (s, 3H, CH ₃ COO), 2.35 (s, 3H, CH ₃ COO).
RMN- ^{13}C , δ (MeOD) (Espectro 17)	173.2 (C-4), 169.1 (CO), 169.0 (CO), 167.9 (CO), 153.9 (C-4'), 152.3 (C-9), 151.5 (C-2), 148.2 (C-7), 142.2 (C-5), 141.9 (C-3), 141.3 (C-6), 129.7 (C-2', C-6'), 60.2 (OCH ₃ -3), 21.1 (CH ₃), 21.09 (CH ₃), 20.75 (CH ₃).



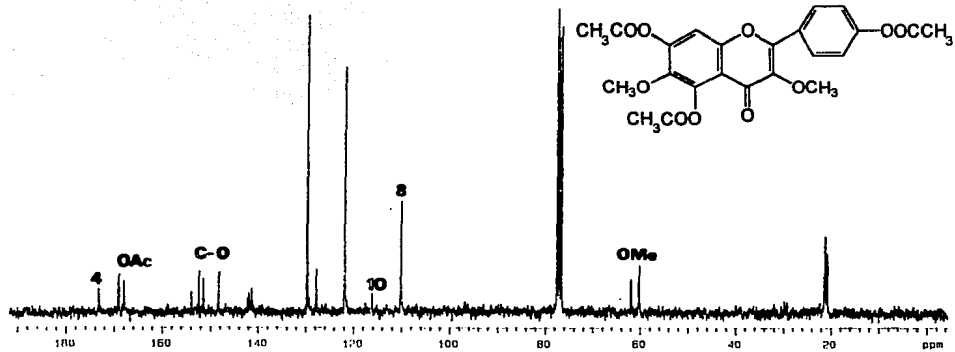


Espectro 14

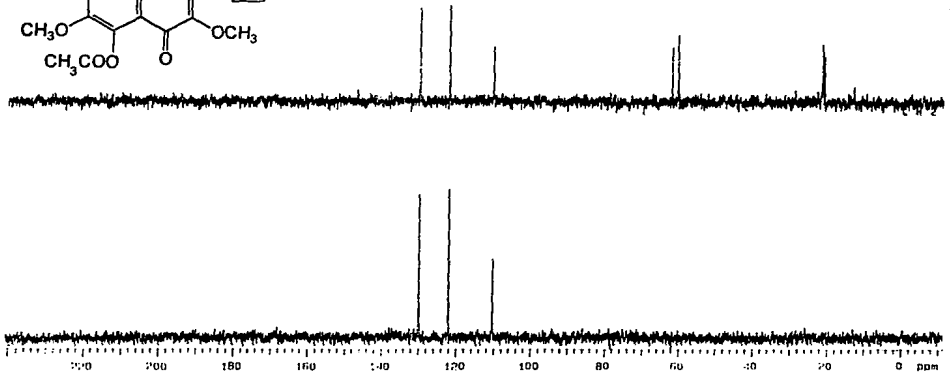
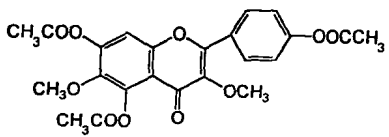




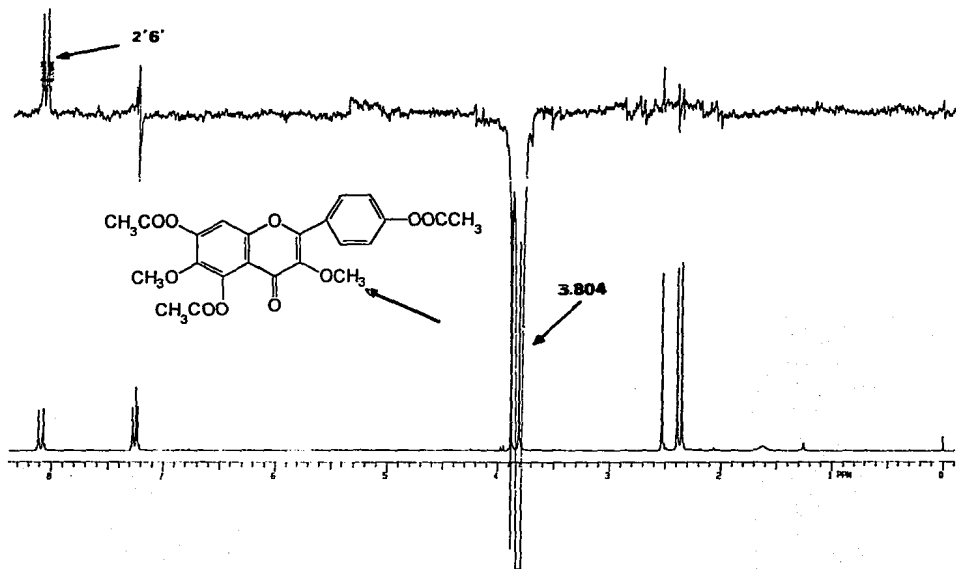
Espectro 16



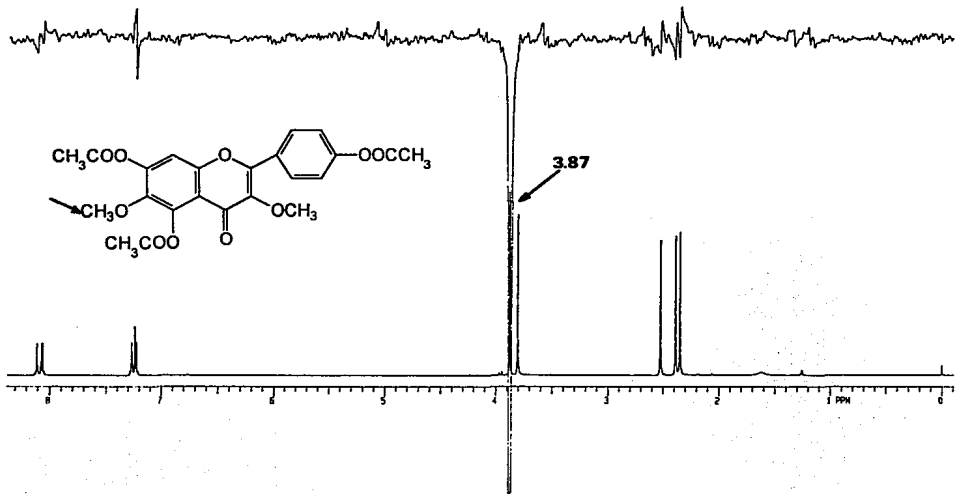
Espectro 17



Espectro 18



Espectro 19



Espectro 20

Cabe mencionar que se determinó la toxicidad para el crustáceo *A. salina* de este compuesto, mostrando una $CL_{50} = 34.5$ ppm.

Así mismo, se determinó la actividad como posible agente alelopático, obteniéndose un efecto estimulante tanto para *Amaranthus hypochondriacus* como para *Echinochloa crus-galli*. Los resultados se ilustran en el Cuadro 14 y en la Gráfica 2.

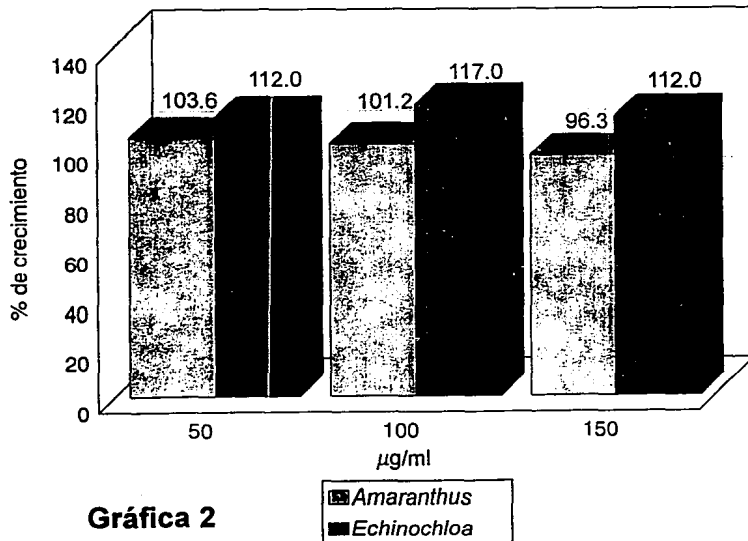
Cuadro 14. Efecto del compuesto (23) sobre el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
50 $\mu\text{g/ml}$	103.6	(3.6)*
100 $\mu\text{g/ml}$	101.2	(1.2)*
150 $\mu\text{g/m}$	96.3	3.7
<i>Echinochloa crus-galli</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
50	112.0	(12.0)*
100	117.0	(17.0)*
150	112.0	(12.0)*

* Los números entre paréntesis indican efecto de estimulación del crecimiento.

Finalmente, se determinó la actividad antifúngica sobre las especies *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium* sp., obteniéndose resultados no satisfactorios.

Efecto del compuesto (23) sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.



Gráfica 2

4. Identificación del β -D-glucositolsterol (24).

De la fracción primaria XVIII, precipitó espontáneamente un sólido blanco, parcialmente soluble en MeOH. El compuesto fue identificado como β -D-glucositolsterol (Figura 21) por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra auténtica (Espectro 21).

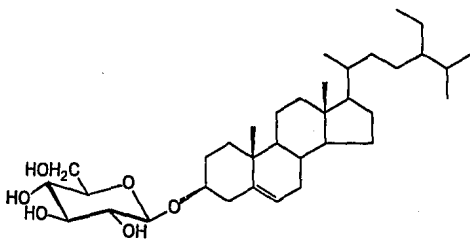
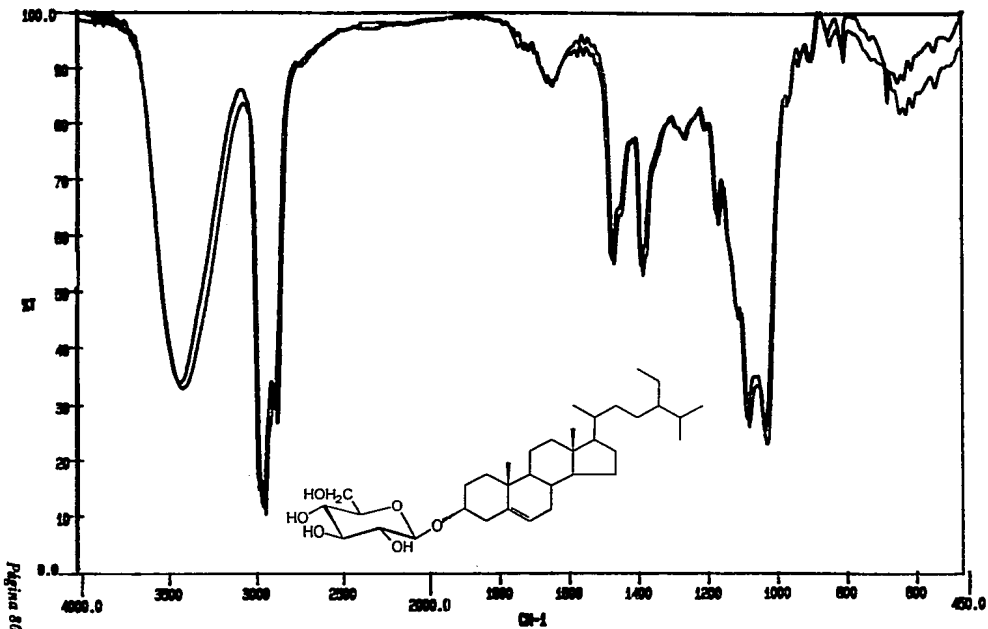


Figura 21. Estructura del β -D-glucositolsterol (24).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro 21

5. Identificación del 7-O-β-D-glucosil-camperol (25).

El producto (25) se aisló como un sólido untuoso, de color amarillo, soluble en MeOH.

Su espectro de IR (Cuadro 16, Espectro 22) mostró bandas características para grupos hidroxilo (3386 cm⁻¹), C-H (2920 cm⁻¹) y carbonilo de γ-lactona (1604 cm⁻¹).

La solubilidad del compuesto en disolventes polares, las bandas observadas en el espectro de IR, así como una prueba positiva frente al reactivo de Molisch, permitieron sugerir la naturaleza glicosídica del compuesto.

El espectro de RMN-1H (Cuadro 16, Espectro 23) permitió detectar en forma clara:

- a) Un doblete (δ 5.04, J = 7.4 Hz) que integraba para un hidrógeno, característico del protón anomérico de una porción sacárida en disposición β.
- b) Un sistema AB (δ 6.02, 6.12, J = 2 Hz) asignable a dos hidrógenos aromáticos en disposición *meta*.
- d) Un sistema A₂B₂ (δ 6.84, 8.02, J = 9 Hz) correspondiente a los hidrógenos de un anillo aromático *para*-sustituido.
- d) Finalmente, en la zona comprendida entre δ 3.3-3.7, se observó un multiplete que debía corresponder a los hidrógenos restantes de la porción sacárida de la molécula.

En el espectro de RMN-¹³C (Cuadro 16, Espectro 25), se observaron señales para 13 átomos de carbono, de entre las cuales resaltaban, una señal característica para un grupo carbonilo de una γ-pirona (δ 175.35), cuatro carbonos aromáticos base de oxígeno (δ 132.15, 162.15, 162.56, 158.9), dos señales equivalentes atribuibles a los metinos de un anillo *para*-sustituido, y señales características de una porción sacárida (δ 102.98, 75.7, 78.32, 71.2, 75.7, 62.57) que, de acuerdo a la comparación de los desplazamientos químicos observados, debían corresponder a la β-D-glucosa (Boros, 1990; Otzuka, 1990; Markham, 1982).

De los cuatro carbonos base de oxígeno observados en este espectro, se deriva que el producto natural debía estar sustituido con tres grupos hidroxilo, por lo cual, el enlace glicosídico debía establecerse a través del carbono base de oxígeno restante (δ 162.63).

Los grupos hidroxilo evidenciados, podían estar ubicados en las posiciones C-3, C-5, C-7 y/o C-4' con base al análisis espectroscópico antes descrito, así como consideraciones de tipo biogénético.

La hidrólisis de una pequeña cantidad del producto natural, permitió confirmar mediante cromatografía en capa fina, a la glucosa como único azúcar presente en la molécula y a un compuesto de menor polaridad que la materia prima.

Los datos analizados hasta el momento, aunados al comportamiento cromatográfico mostrado por el compuesto, así como la ausencia de H-3 característico de flavonas (Harborne *et al.*, 1975; Markham, 1982), permitieron establecer que el producto natural era el glicósido de un flavonol. Por lo tanto, restaba tan sólo por establecer la posición de la unión de la β -D-glucosa, la cual podía ser a través de C-3, C-5- C-7 o C-4', para lo cual la obtención del derivado acetilado del producto natural y el análisis comparativo mediante cromatografía en capa fina con una muestra auténtica del acetil derivado del 3-O-glucosil-camperol gentilmente proporcionado por la Dra. Lydia Rodríguez Hahn del Instituto de Química, permitió descartar en principio, la unión glucosídica a través de C-3. Por otra parte, la comparación de los desplazamientos químicos obtenidos para el producto natural, con los previamente descritos en la literatura (Gaviño, 1994; Markham, 1982), permitieron descartar la unión glucosídica a través de C-3-, C-4', debido al desplazamiento químico observado para el doblete correspondiente al protón anomérico de la glucosa, así como para los hidrógenos del sistema AB del anillo A (Cuadro 15).

Cuadro 15. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones del producto (25) y el 6- β -acetil-3-gluco-camperol.

HIDROGENO	PRODUCTO NATURAL	6- β -acetil-3-gluco-camperol
H-2',6'	8.02, d, J = 9 Hz	8.02, d, J = 8.7 Hz
H-3',5'	6.84, d, J = 9 Hz	6.85, d, J = 8.7 Hz
H-8	6.16, d, J = 2 Hz	6.39, d
H-6	6.02, d, J = 2 Hz	6.21, d
H-1"	5.04, d, J = 7.4 Hz	5.8, d

Para descartar la unión entre C-5 y C-7, se preparó el derivado metilado de la aglicona obtenida por hidrólisis ácida del producto natural.

Los datos observados en el espectro de RMN-¹H de este derivado (Cuadro 17, Espectro 27) permitieron descartar a C-5 como punto de unión de la porción sacárida, ya que en δ 12.6 se observó la señal característica para un grupo OH quelatado.

Con base a la información anterior, y a la comparación de los datos espectroscópicos mostrados por el derivado metilado con los previamente descritos en la literatura para el 3,4',7-éter trimetilico del camperol aislado de *Hyptis albida* (Pereda, 1988), se concluyó que la aglicona correspondía al flavonol denominado camperol.

El producto natural (**25**) se identificó entonces, como el 7-O- β -D-glucosil-camperol (Figura 22), el cual ya había sido previamente descrito en la literatura (Rosler *et al.*, 1971).

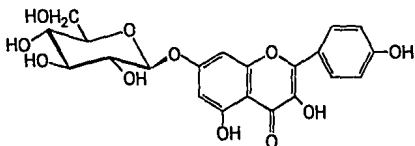
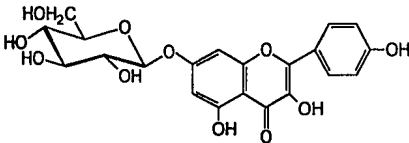
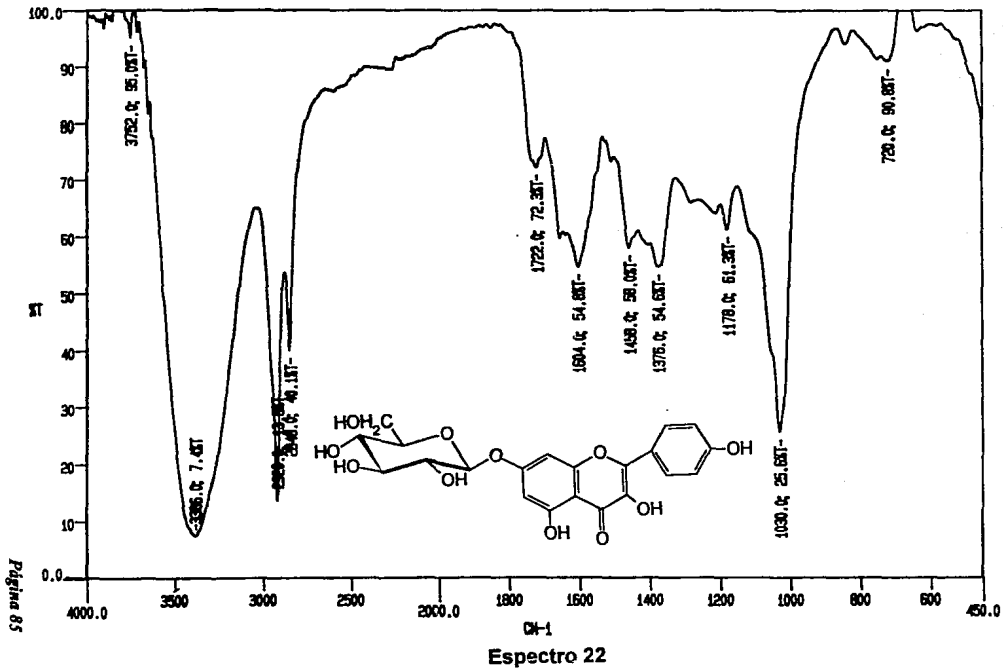
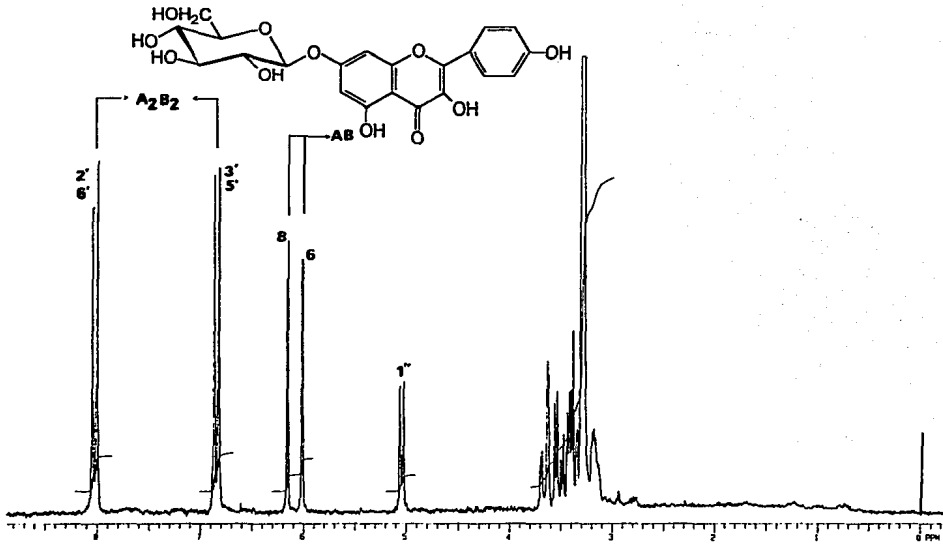


Figura 22. Estructura del 7-O- β -D-glucosil-camperol (**25**).

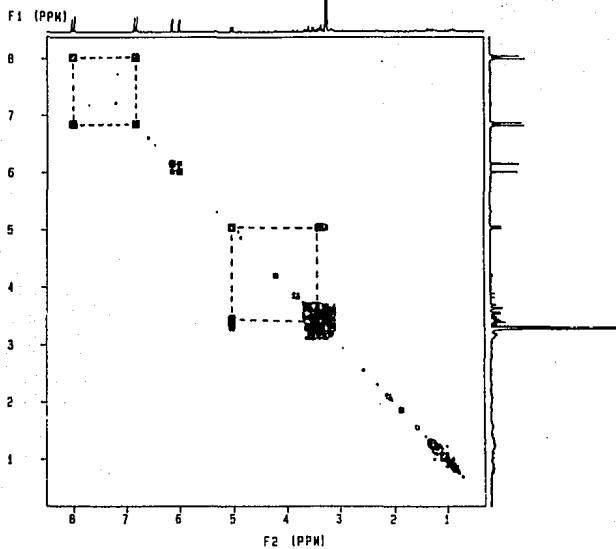
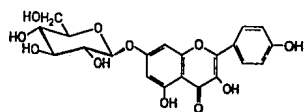
Cuadro 16. Constantes espectroscópicas del 7-O-β-D-glucosil camperol (25).

	
IR ν max. (KBr) cm^{-1} (Espectro 22)	3386, 2920, 1604.
RMN- ^1H , δ (CDCl_3) (Espectro 23)	8.02 (d, H-2'-6', J= 9.0), 6.84 (d, H-3'-6', J=9.0), 6.16 (d, H-8, J= 2.0), 6.02 (d, H-6, J=2.0), 5.04 (d, H-1'', J= 7.4).
RMN- ^{13}C , δ (CDCl_3) (Espectro 25)	178.86 (C-4), 162.63 (C-7), 161.21 (C-5), 159.24 (C-4'), 158.16 (C-2, C-9), 135.17 (C-3), 132.06 (C-2', C-6'), 122.41 (C-1'), 115.77 (C-3', C-5'), 105.4 (C-10), 104.42 (C-1''), 99.48 (C-6), 94.75 (C-8), 77.65 (C-3''), 75.36 (C-5''), 75.21 (C-2''), 71.0 (C-4''), 64.16 (C-6'').

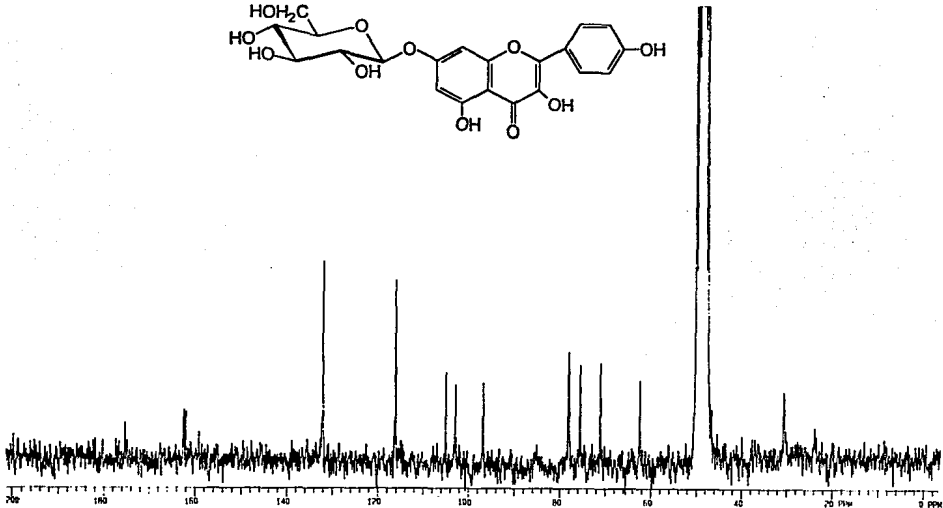
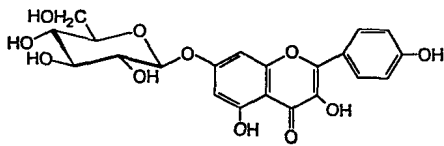




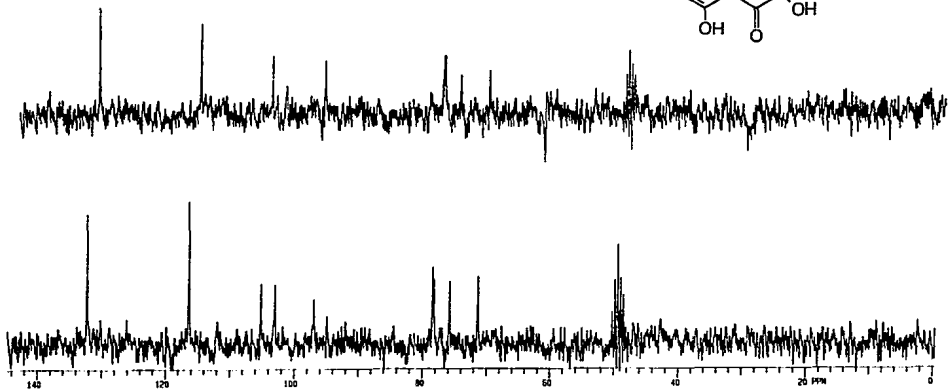
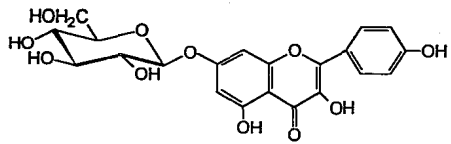
Espectro 23



Espectro 24

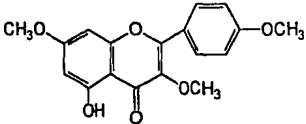


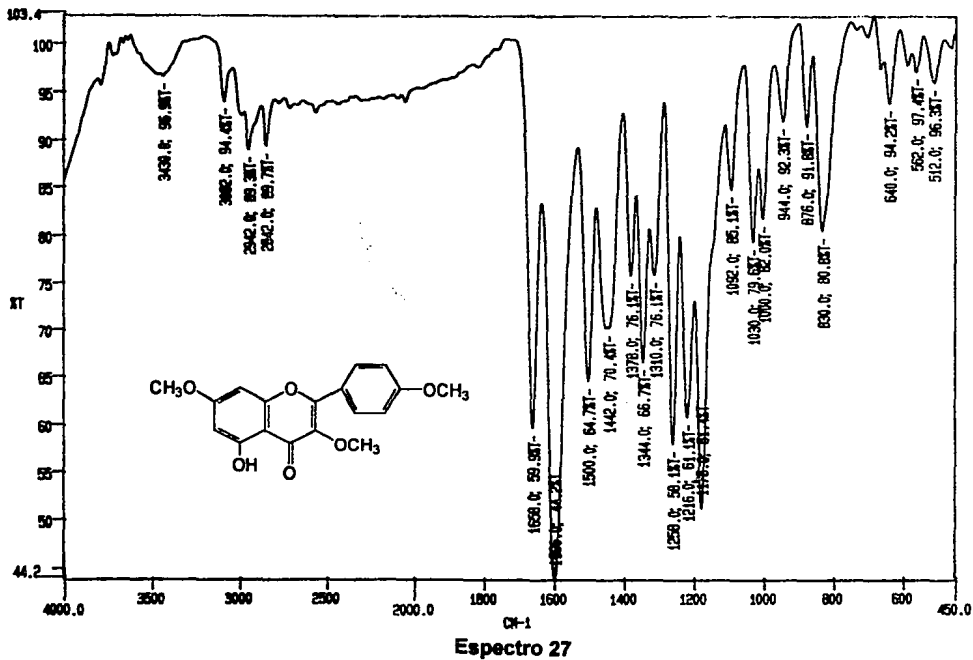
Espectro 25

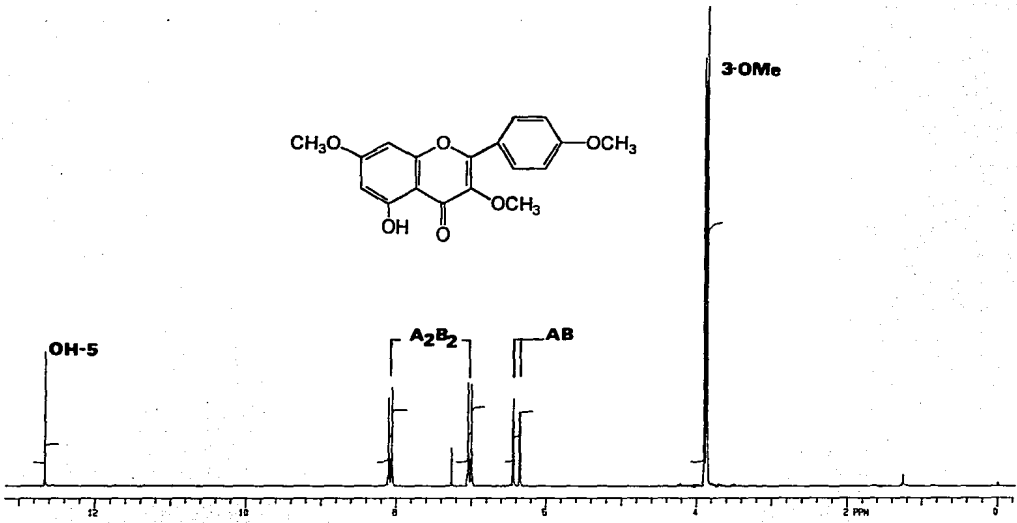
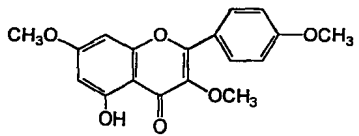


Espectro 26

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas del 3,4',7-éter trimetílico del camperol.

	
IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} (Espectro 27)	3430, 2942, 1658, 1596.
RMN- ^1H , δ (MeOH) (Espectro 28)	12.66 (s, OH-5), 8.08 (d, J=9), 7.025 (d, H-3',5', J=9.20), 6.44 (d, H-8, J= 2.2), 6.35 (d, H-6, J= 2.4), 3.9 (s, OCH ₃), 3.87 (s, OCH ₃), 3.86 (s, OCH ₃).





Espectro 28

6. Evaluación de la actividad biológica del compuesto (26).

Por lo que respecta al compuesto (26), hasta el momento únicamente se han realizado los ensayos biológicos. En el caso de la evaluación contra *Artemia salina* Leach, los resultados fueron poco satisfactorios ($LC_{50} > 1000$ ppm). En las evaluaciones para la determinación de la actividad alelopática, el compuesto mostró un efecto estimulante selectivo sobre *Amaranthus hypochondriacus*. Los resultados se muestran en el Cuadro 18 y en la Gráfica 3.

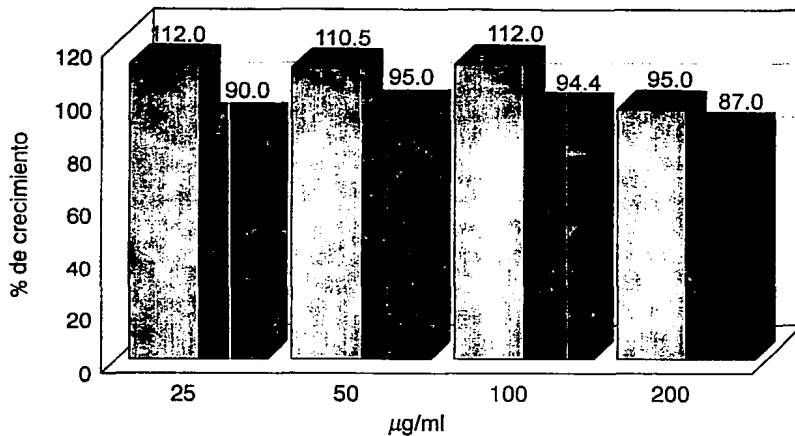
Cuadro 18. Efecto del compuesto (26) sobre el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
25 µg/ml	112.0	(12.0)*
50 µg/ml	110.5	(10.5)*
100 µg/ml	112.0	(12.0)*
200 µg/m	95.0	5.0
<i>Echinochloa crus-galli</i>		
TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control	100	0.0
25 µg/ml	90.0	10.0
50 µg/ml	95.0	5.0
100 µg/ml	94.4	5.6
200 µg/m	87.0	13.0

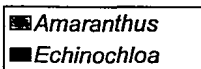
*Los números entre paréntesis indican un efecto de estimulación del crecimiento.

Al igual que en los casos anteriores, la actividad antifúngica del compuesto (26) fue nula.

Efecto del compuesto (26) sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*



Gráfica 3



***V.RESUMEN Y
CONCLUSIONES***

1. El estudio fitoquímico convencional de *Chamaesyce prostrata*, permitió el aislamiento y caracterización mediante métodos químicos y espectroscópicos de seis metabolitos secundarios: dos esteroides (β -sitosterol y β -D-glucositolsterol), dos flavonoides (el 3,6-éter dimetilico del camperol y el 7-O- β -D-glucosil-camperol), un triterpenoide (el acetil derivado del lanostan-25-en-3 β -ol), constituyendo este último un nuevo producto natural, y un polialcohol (26), el cual aún no ha sido caracterizado.

2. Este trabajo constituye el primer reporte de la presencia de los dos flavonoides en la planta objeto de estudio.

3. El extracto total y los compuestos puros mostraron ser inactivos frente a *Artemia salina* Leach ($LC_{50} > 1000$ ppm), a excepción del flavonoide caracterizado como 3,6-éter dimetilico del camperol, el cual presentó una toxicidad significativa ($LC_{50} = 34.5$ ppm).

4. Se evaluó el potencial alelopático de extracto, lixiviado acuoso y de los compuestos puros sobre las especies *Echinochloa crus-galli* y *Amaranthus hypochondriacus*, encontrándose en el lixiviado acuoso la mayor inhibición del crecimiento para la maleza *Amaranthus hypochondriacus* (76.5%). En el caso del extracto cloroformo-metanólico los resultados fueron poco significativos. El 3,6-éter dimetilico del camperol presentó un efecto estimulante en ambas malezas, a diferencia del compuesto (26), el cual presentó un efecto estimulante selectivo sobre *Amaranthus hypochondriacus*.

5. La determinación de la actividad antifúngica del extracto orgánico realizada sobre las especies *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Helmithosporium* sp. no mostró resultados satisfactorios.

6. Los metabolitos secundarios encontrados en esta investigación, no han sido descritos previamente en la literatura como constituyentes de *Chamaesyce prostrata*, con excepción de los esteroides.

RECOMENDACIONES

1. Caracterizar el compuesto (26) aislado en el presente estudio.
2. Realizar evaluaciones biológicas adicionales del extracto, fracciones y compuestos aislados.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Anaya, A. L.; Calera, M.; Mata, R. y Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potencial of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2145-2152.
- Anderson, J. E.; Goetz, C. M. y McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* **2**, 107-111.
- Azpiri, M. T. (1973). Etnobotánica mexicana: plantas medicinales usadas popularmente como diuréticos. México. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 67.
- Balandrin, M.; Klocke, J.; Syrkin, E. y Bollinger, Wm. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* **228**, 1154-1160.
- Balick, M. (1990). Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. *Bioactive Compounds from Plants*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium), pp. 22-39.
- Banerji, J.; Das, B.; Chatterjee, A. y Shoolery, J. N. (1984). Gadain, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **23**, 2323-2327.
- Bhakuni, D. S.; Satish, S. y Dhar, M. M. (1970). The Alkaloids of *Croton sparsiflorus*. *Phytochemistry* **9**, 2573.
- Bleichert, S. y Guénard, D. (1990). Taxus alkaloids. *The alkaloids* **39**, 195-238.
- Boros, C. A.; Stermitz, F. R. y Harris, G. H. (1990). *Journal of Natural Products* **53**, 72.
- Burke, B. A.; Chan, W. R.; Pascoe, K. O.; Blount, J. F. y Manchand, P. S. (1981). The structure of crotonitenone, a novel casbane diterpene from *Croton nitens* Sw. *Journal Chemical Society of Perkin I*, 2666.
- Bye, R. y Linares, E. (1994). Comunicación personal.

- Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L. y Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1025-1037.
- Chatterjee, A.; Das, B.; Pascard, C. y Prange, T. (1981). Crystal structure of a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **20**, 2047-2048.
- Chávez, P. I.; Jolad, S. D.; Hoffmann, J. J. y Cole J. R. (1982). Four new 12-deoxyphorbol diesters from *Croton californicus*. *Journal of Natural Products* **45**, 745.
- Chen, Y.; Tang, Z.-J.; Jiang, F.-X.; Zhang, X.-X. y Lao, Ai-Na. (1979). Studies on the active principles of Ze-Qi (*Euphorbia helioscopia* L.), a drug used for chronic bronchitis. *Yao Hsueh Hsueh Pao* **14**, 91-95. (via *Chemical Abstracts* **92**: 72680).
- Cox, P. (1990). Ethnopharmacology and the search for new drugs. *Bioactive Compounds from Plants*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium), pp. 40-55.
- Craveiro, A. A. y Silveira, E. R. (1982). Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry* **21**, 2571.
- de Alvarenga, M. A.; Gottlieb, O. R. y Hagalhaes, M. t. (1976). Methylphenanthrenes from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry* **15**, 844-845.
- de Pascual, J.; Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basame, P.; Sexmero, Ma. J. y Fernández, R. (1987). Triterpenes from *Euphorbia broter*. *Phytochemistry* **26**, 1767-1776.
- Dutta, P. K.; Banerjee, D. y Dutta, N. L. (1972). Euphorbetin: A new bicoumarin from *Euphorbia lathyris* L. *Tetrahedron Letters*, 601-604.

- Dutta, P. K.; Majumder, P. C. y Dutta, N. L. (1975). Synthetic approaches towards bicoumarins. Synthesis of euphorbetin and isoeuphorbetin. *Tetrahedron* **31**, 1167-1170.
- Evans, F. J. y Taylor, S. E. (1983). Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **44**, Springer-Verlag, Wien New York.
- Farnsworth, N. (1990). The role of ethnopharmacology in drug development. *Bioactive Compounds from Plants*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium), pp. 2-21.
- Gaviño, R. (1994). Tesis de Maestría, Instituto de Química, UNAM.
- Gewall, M. B.; Hattori, M.; Tezuka, J.; Kikuchi, T. y Namba, T. (1990). Constituents of the latex of *Euphorbia antiquorum*. *Phytochemistry* **29**, 1625-1628.
- Guénard, D.; Guéritte-Voegelein, F. y Potier, P. (1993). Taxol and toxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships. *Acc. Chém. Res.* **26**, 160-167.
- Harborne, J. B.; Mabry, T. J. y Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*. Academic Press, New York.
- Hart, N. K.; Jones, S. R. y Lamberton, J. A. (1969). Hexahydroimidazopyrimidines, a new class alkaloids from *Alchornea javanensis*. *Journal of the Chemical Society D*, 1484-1485.
- Hart, N. K.; Jones, S. R.; Lamberton, J. A. y Willig, R. J. (1970). Alkaloids of *Alchornea javanensis*: the isolation of hexahydroimidazo [1,2a] pyrimidines and guanidines. *Australian Journal of Chemistry* **23**, 1679-1693.
- Herbert, R. B. (1981). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Chapman and Hall, London, pp. 63-66.

- Hernández, J. (1990). Estudio fitoquímico de algunas Euphorbiaceae medicinales mexicanas. Tesis de Maestría. Instituto de Química, UNAM.
- Huang, P.; Huang, P.; Huang, P.; Huang, H. y Lee-Huang, S. (1992). Developing drugs from traditional medicinal plants. *Chemistry and Industry*, 290-293.
- Ismail, S. I.; El-Missiry, M. M.; Hammouda, F. M. y Rizk, A. M. (1977). Flavonoids of *Euphorbia geniculata* y *Euphorbia prostrata*. *Pharmazie* **32**, 538.
- Johns, S. R. y Lamberton, J. A. (1967). New imidazole alkaloids from a *Glochidion* species (family Euphorbiaceae). *Australian Journal of Chemistry* **20**, 555-560.
- Kjaer, A. y Friis, P. (1962). Isothiocyanates XLIII. Isothiocyanates from *Putranjiva roxburghii* Wall. including (S)-2-methylbutyl isothiocyanato, a new mustard oil of natural derivation. *Acta Chemica Scandinavica* **10**, 936-946.
- Klayman, D. (1985). *Qinghaosu* (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**, 1049-1055.
- Knight, S. A. (1973). The carbon-¹³NMR spectra of lanostenol, euphadienol y euphenol. *Tetrahedron Letters* No. 1, 83-86.
- Law, AH.; Threlfall, D. R. y Whistance, G. R. (1970). Ubiquinones of *Heva brasiliensis*. *Phytochemistry* **9**, 2461.
- Laxman, K.; Ramraj, S.; Ravinder, A.; Subba, T. y Sundararamaiah, T. (1986). Cycloart-25-en-3 β -ol from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry* **25**, 277-278.
- López, R. e Hinojosa A. (1988). *Catálogo de Plantas Medicinales Sonorenses*, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, pp. 134.
- Manitto, P. (1981). *Biosynthesis of Natural Products*. John Wiley and Sons, USA, pp. 266-285.

- Manske, R. H. F. (1968). Alkaloids unclassified and of unknown structure. En R. H. F. Manske (Ed.), *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*, Vol 10. Academic Press, Inc., New York, London, pp. 545-595.
- Markham, K. R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*: Academic Press Inc. London.
- Markham, K. R.; Chari, V. M. y Mabry, T. J. (1985). *Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids*, pp. 19-28.
- Martínez, M. (1979). Flora Medicinal. En M. Martínez y E. Matuda, Flora del Estado de México, Tomo III, Biblioteca Enciclopédica del Estado de México, México, pp. 349-401.
- Martínez M. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*. 6a. Ed. Editorial Botas, México, pp. 167-168.
- Martínez, M. (1990). *Las Plantas Medicinales de México*. Editorial Botas, México, pp. 657.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E., y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34.
- Monte, F. J. Q.; Andrade, C. H. S.; Craveiro, A. A. y Braz Filho, R. (1984). New Tetracyclic Diterpenes from *Croton argyrophyloides*. *Journal of Natural Products* **47**, 55.
- Nahrstedt, A.; Kant, J.-D. y Wray, V. (1982). Acalyphic, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry* **21**, 101-105.
- Öksüz, S.; Shieh, H.-L.; Pezzuto, J. M.; Özhatay, N. y Cordell, G. A. (1993). Biologically active compounds from the Euphorbiaceae. Part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp. *glauca* (en prensa).

- Otzuka, H.; Sasaki, Y.; Yamasaki, K.; Takeda, Y. y Seki, T. (1990). *Journal of Natural Products* **53**, 107.
- Pereda-Miranda, R. (1987). Elucidación estructural y estereoquímica de nuevos metabolitos secundarios aislados de Labiatae (*Salvia* e *Hyptis*). Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Pieters, L. A. C.; Vanden Berghe, D. A. y Vlietinck, A. J. (1990). A dithydrobenzofuran lignan from *Croton erythrochilus*. *Phytochemistry* **29**, 348.
- Pohl, R.; Janistyn, B. y Nahrstedt, A. (1975). Die flavonolglykoside von *Euphorbia helioscopia*, *E. stricta*, *E. verrucosa* y *E. dulcis*. 9. Mitteilung ueber die flavonoide einheimischer Euphorbiaceen. *Planta Medica* **27**, 301-303.
- Ponsinet, G. y Ourisson G. (1965). Études chimio-taxonomiques dans la famille des Euphorbiacees-I. Introduction générale et séparation et identification des triterpènes tétracycliques monohydroxyles naturels. *Phytochemistry* **4**, 799-811.
- Pulido, Ma. T. y Serralta L. (1993). Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Chetumal, QRoo, pp. 105.
- Rizk, A. M. y El-Missiry, M. M. (1986). Non-diterpenoid constituents of Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In F. J. Evans (Ed.), *Naturally Occurring Phorbol Esters*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 107-138.
- Rizk, A. M.; Youssef, A. M.; Diab, M. A. y Salem, H. M. (1976). Flavonoids of *Euphorbia paralias*. *Pharmazie* **31**, 405.
- Rizk, A. M.; Ahmed, S. S. y Diab, M. M. (1979). Further investigation of the flavonoides of *Euphorbia paralias* L. *Planta Medica* **36**, 189-190.

- Rizk, A. M.; Hammouda, F. M.; Seif El-Nasr, M. M. y Abou-Youssef, A. A. (1980a). Phytochemical investigation of *Euphorbia peplus*. *Fitoterapia* **51**, 223-227.
- Rizk, A. M.; Hammouda, F. M.; El-Shamy, A. M. y El-Missiry, M. M. (1980b). Triterpenoids from latices of *Euphorbia paralias* y *E. geniculata*. *Fitoterapia* **51**, 313-316.
- Rizk, A. M.; Al-Nagdy, S. A. y El-Missiry, M. M. (1982). Investigation of *Euphorbia granulata*. *Pharmazie* **37**, 737-738.
- Rizk, A. M.; Heiba, H. I.; Ma'ayergi, H. A. y Batanouny, K. H. (1986). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia* **57**, 3-9.
- Rizk A. M. (1987). The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **94**, 293-326.
- Rosler, H; Star, A. y Mabry, T. (1971). New 6-methoxyflavonols from *Centaurea jacea*. *Phytochemistry* **10**, 450-451.
- Sahai, R.; Dube, M. P. y Rastogi, R. P. (1981). Chemical and pharmacological study of *Euphorbia maddenii*. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* **43**, 216-219.
- Sarkar, S. y Chakrabarty, M. M. (1956a). Seed fats of the Euphorbiaceae family. I. Chemical examination of the seed fat from *Trewia nudiflora*. *Science and Culture* **21**, 473-474. (via *Chemical Abstracts* **50**: 10427).
- Schun, Y.; Cordell, G. A.; Cox, P. y Alan, R. (1986). Wallenona, a C₃₂ triterpenoid from the leaves of *Gyrinops walla*. *Phytochemistry* **25**, 753-755.
- Shang, T.-M.; Wang, L.; Liang, H.-T.; Lin, X.-Y.; Xiao, J.-M. y Niu, S.-L. (1979). Studies on the constituents of Mao-Yan-Cao (*Euphorbia lunulata* Bge.). *Hua Hsueh Hsueh Pao* **37**, 119-128. (via *Chemical Abstracts* **92**: 3184).

- Shriner, R. L.; Fuson, R. C. y Curtin, D. Y. (1986). Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos, Cap. 10, 1ª Ed. Limusa, México.
- Singla, A. K. y Pathak, K. (1991). Constituents of *Euphorbia prostrata*. *Fitoterapia* **62**, 453-454.
- Souza, N. (1943). *Plantas Medicinales que Viven en Yucatán*. Mimeograph. Mérida, Yucatán, pp. 31.
- Stahl, E. (1969). *Thin Layer Chromatography*, Academic Press Inc., New York, pp. 487.
- Talapatra, B.; Goswami, S. y Talapatra, S. K. (1981). Acalyphamide, a new amide and other constituents of *Acalypha indica* Linn. *Indian Journal of Chemistry* **20B**, 974-977.
- Tipathi, R. D. y Tiwari, K. P. (1980). Genticulatin, a triterpenoid saponin for *Euphorbia geniculata*. *Phytochemistry* **19**, 2163-2166.
- Torssell, K. B. (1983). *Natural Product Chemistry. A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*. John Wiley and Sons Limited, Great Britain, pp. 197-204.
- Tyler, V. (1986). Plant drugs in the twenty-first century. *Economic Botany* **40**, 279-288.
- Valen, F., Van. (1978). Contribution to the knowledge of cyanogenesis in Angiosperms. 10. Communication. Cyanogenesis in Euphorbiaceae. *Planta Medica* **34**, 408-413.
- Vickery, M. L. y Vickery, B. (1979). *Plant Products of Tropical Africa*. London: MacMillan.
- Vogel, H. (1991). Similarities between various systems of traditional medicine. Considerations for the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 179-190.

Wagner, H.; Hoerhammer, L. y Kiraly, I. C. (1970). Flavon C-glykoside in *Croton zambezicus*. *Phytochemistry* **9**, 897.

Yamaguchi, K. (1970). *Spectral Data of Natural Products* I. Amsterdam, Elsevier.

Yoshida, T.; Namba, O.; Chen, L.; Liu, Y. y Okuda, T. (1990). Ellagitannin monomers and oligomers from *Euphorbia prostrata* Ait. and oligomers from *Loropetalum chinense* Oliv. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **38**, 3296-3302.