



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

42
29

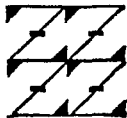
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO QUIMICO DE Croton niveus
PLANTA MEDICINAL ENDEMICA DE MEXICO

T E S I S
D E L I C E N C I A T U R A
P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O
S U S T E N T A :
JANETTE LOZANO VINALAY

U N A M
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
EN NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M. en C. ALEJANDRO RUIZ CANCINO

MEXICO, D. F.

OCTUBRE 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN EL XXXI CONGRESO NACIONAL DE QUIMICA. 19 DE SEPTIEMBRE DE 1995. MAZATLAN SINALOA, MÉXICO.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA FES ZARAGOZA CAMPUS II, UNAM, LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES L-314, BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. en C. ALEJANDRO RUIZ CANCINO.

DEDICATORIAS :

En estos momentos elevo una oración a DIOS para agradecerle el haberme permitido alcanzar uno de mis más anhelados sueños.

Señor solo te pido salud y un poco de sabiduría para seguir mi camino y alcanzar una a una mis metas.

A MI MADRE :

Aurora Vinalay : Quien con sus consejos forjo en mi un gran deseo de superación y lucha. Gracias a su esfuerzo incansable he logrado llegar a un momento muy importante en mi vida.

Gracias por tu amor, comprensión y apoyo incondicional en los momentos que más los necesito.

A MI PADRE :

Justino Lozano : Gracias por haberme dado la vida e infundir en mi el valor para luchar por lo que quiero en la vida.

A MIS HERMANOS :

Nelli, Patricia, Delia y Marco Antonio : Agradesco su cariño, apoyo y entusiasmo que siempre me han dado para seguir adelante.

Estoy segura que siempre lograran todo lo que se propongan en la vida.

A MIS AMIGOS :

Gracias por brindarme su amistad incondicional, espero que la sigamos cultivando día a día.

No hay que desanimarse, se que el camino es difícil pero lo lograremos.

EN MEMORIA DE :

ALEJANDRO RUIZ CANCINO :

Gracias por la asesoría y la enseñanza que me fueron brindadas durante la elaboración del presente trabajo.

AGRADECIMIENTO :

Al Instituto de Química, de la UNAM, al personal Técnico-Académico y al Dr. Guillermo Delgado Lamas por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

A la M. en C. Clara H. Ramos del Instituto de Biología de la UNAM por la recolección y clasificación del material vegetal.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. FUNDAMENTACION	4
2.1. FAMILIA <i>Euphorbiaceae</i>	4
2.1.1. COMPUESTOS AISLADOS DE LAS EUFORBIACEAS	5
2.2. GENERO <i>Croton</i>	18
2.2.1 COMPUESTOS AISLADOS DEL GENERO <i>Croton</i>	18
2.2.2. PROPIEDADES FARCOLOGICAS DEL GENERO <i>Croton</i>	34
2.2.3. GENERALIDADES DE <i>Croton niveus</i>	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GENERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
5. HIPOTESIS	38
6. MATERIAL	39
7. EQUIPO	39
8. SUSTANCIAS	39
9. PARTE EXPERIMENTAL	40
9.1. DESARROLLO CROMATOGRAFICO DE LA COLUMNA ORIGINAL	40

	Pag
9.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL β-SITOSTEROL (1)	40
9.2.1. REACCION DE ACETILACION DEL β-SITOSTEROL (1a) ESQUEMA A	40
9.2.2. REACCION DE EPOXIDACION DEL β-SITOSTEROL (1b) ESQUEMA B	41
9.2.3. REACCION DE APERTURA DEL 5α-EPÓXI-COLESTAN-3β-OL (1c) ESQUEMA C	42
9.3 OBTENCION DEL ACETILADO DEL β-D-GLUCÓSIDO DE β-SITOSTEROL (2a) ESQUEMA D	42
9.4 SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL EPOXIDO DE CARIOFILENO	43
9.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO FREN A <i>Artemia salina</i>	44
10. RESULTADOS	45
TABLA IV. RENDIMIENTO Y PUNTO DE FUSION DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS	46
TABLA V. DATOS DE IR DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS	47
TABLA VI. DATOS DE RMN-¹H DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS	48
TABLA VII. DATOS DE ESPECTROMETRIA DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO 70 ev	49
11. DISCUSION DE RESULTADOS	50
12. CONCLUSIONES	58
13. ESPECTROS	59
ESPECTRO 1. DE IR DE β-SITOSTEROL (1)	60
ESPECTRO 2. DE RMN-¹H DE β-SITOSTEROL (1)	61

	Pag
ESPECTRO 3. DE IR DEL ACETILADO DE β-SITOSTEROL (1a)	62
ESPECTRO 4. DE RMN-¹H DEL ACETILADO DE β-SITOSTEROL (1a)	63
ESPECTRO 5. DE IR DEL 5α-EPOXI-COLESTAL-3β-OL (1b)	64
ESPECTRO 6. DE RMN-¹H DEL 5α-EPOXI-COLESTAN-3β-OL (1b)	65
ESPECTRO 7. DE IR DEL 5α-6β-DIOL-COLESTAN-3β-OL (1c)	66
ESPECTRO 8. DE RMN-¹H DEL 5α-6β-DIOL COLESTAN-3β-OL (1c)	67
ESPECTRO 9. DE IR DEL β-D-GLUCOSIDO DE β-SITOSTEROL (2)	68
ESPECTRO 10. DE IR DEL ACETILADO DEL β-D-GLUCOSIDO DE β-SITOSTEROL (2a)	69
ESPECTRO 11. DE RMN-¹H DEL ACETILADO DEL β-D-GLUCOSIDO DE β-SITOSTEROL (2a)	70
ESPECTRO 12. DE RMN-¹H DEL EPOXIDO DE CARIOFILENO (3)	71
GLOSARIO	72
14. BIBLIOGRAFIA	73

RESUMEN

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos del estudio químico de *Croton niveus* (copalchi), planta medicinal originaria de México, la cual fue clasificada por Jacq en el año de 1763; del análisis realizado a esta planta se aislaron e identificaron tres sustancias β -sitosterol, β -D-glucósido de β -sitosterol y epóxido de cariofileno; además del acetilado del β -sitosterol, 5α -epóxi-colestan- 3β -ol y $5\alpha,6\beta$ -diol-colestan- 3β -ol como productos de reacción.

Estas sustancias fueron identificadas por medio de la espectroscopia -IR y RMN- 1 H-, propiedades físicas descritas en la literatura y por comparación con muestra auténtica de cada una de ellas a excepción de los derivados del β -sitosterol.

Por lo anterior se concluye que los objetivos planteados se alcanzaron en su totalidad, de esta manera el presente contribuye al conocimiento químico del género *Croton* en particular y de las plantas medicinales mexicanas en general.

1. INTRODUCCION

México es un país que cuenta con una gran riqueza de recursos vegetales, pero la información que existe sobre estos recursos aún no es completa; a pesar de ser un país que tiene muy arraigada la herbolaria medicinal, la cual fue heredada de las antiguas culturas que existieron en nuestro país.

Del estudio químico de las plantas medicinales se pueden aislar un sin número de metabolitos secundarios, los cuales son derivados de un grupo muy reducido de metabolitos primarios, éstos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en cambio los metabolitos secundarios cuentan con una menor distribución [1]. El análisis químico juega un papel muy importante en el estudio de las plantas medicinales, ya que permite mostrar la composición de los metabolitos secundarios aislados y caracterizar a las moléculas con posible actividad biológica[2]. En caso de que algunas moléculas presenten actividad terapéutica, se pueden realizar una serie de ensayos farmacológicos que permitan asegurar o descartar si la molécula presenta o no tal actividad, que es informada por la medicina tradicional popular.

Es de suma importancia el aislamiento de metabolitos nuevos que presenten alguna actividad terapéutica, ya que de ahí se pueden obtener nuevos fármacos que ayuden a contrarrestar algunas de las enfermedades que atacan al hombre e inclusive a varios animales y plantas, estos fármacos pueden ser sintetizados u obtenidos de la misma planta, utilizando la nueva biotecnología que en estos momentos está en auge en el ámbito científico mundial.

Asimismo para realizar el estudio químico de una planta medicinal se requiere generalmente de técnicas cromatográficas y de equipos instrumentales, entre las técnicas cromatográficas a utilizar se encuentran la cromatografía en capa fina, de columna, de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en capa fina a alta presión, de líquidos a vacío, en capa fina de alta resolución, etc. [3].

De los equipos que se utilizan en el análisis químico se cuenta con instrumentos de Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono e Hidrógeno (RMN ^{13}C , RMN $^1\text{-H}$), Espectrometría de Masas (EM); todos estos equipos con un alto poder de resolución. Sin estas técnicas y equipos, el estudio químico de las plantas medicinales sería casi imposible de llevarlo a cabo.

Por otra parte de acuerdo con la importancia del estudio químico de una planta medicinal, el presente trabajo describe los resultados obtenidos del análisis de la planta medicinal *Croton niveus*, la cual se conoce con el nombre vulgar de copalchi. Esta planta fue utilizada en la antigüedad por sus propiedades terapéuticas en casos de digestión perezosa, intestinos irritables y como medicina antiperiódica (cuando se suspende el periodo de menstruación). Del estudio realizado a *Croton niveus* se aislaron: tres metabolitos secundarios, los cuales se identificaron por medio de técnicas cromatográficas, propiedades físicas, análisis espectrométricos y espectroscópicos.

2. FUNDAMENTACION

2.1. FAMILIA *Euphorbiaceae*.

La familia de las Euforbiáceas, está dividida en cinco subfamilias [4] Fig. 1 y más de cincuenta tribus, las cuales incluyen 283 géneros y cerca de 7 300 especies.

Entre los géneros con mayor número de especies se encuentran los siguientes:

Género	Número de Especies
<i>Euphorbia</i>	1 600
<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>Tragia</i>	140

El mayor porcentaje de estas especies se encuentran en las zonas tropicales de América y Africa [5].

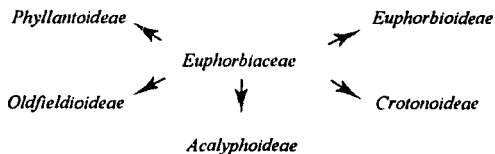


Fig. 1 División infrafamiliar de la familia *Euphorbiaceae* según Webster 1975.

La mayoría de los géneros se caracterizan por la presencia, de una sustancia llamada látex, la cual está compuesta de sales minerales, proteínas, aminoácidos, terpenos y caucho [6].

Una gran cantidad de metabolitos secundarios¹ han sido aislados de estas plantas, algunas presentan actividad biológica que en su mayoría tienen una actividad antibiótica, antitumoral; algunos metabolitos separados son tóxicos y causan inflamación en las membranas mucosas, conjuntivitis; unos son carcinogénicos [7] y otros juegan un papel muy importante en la industria alimenticia.

2.1.1. COMPUESTOS AISLADOS DE LAS EUFORBIACEAS

De la familia *Euphorbiaceae* se han aislado numerosas sustancias entre las que se pueden mencionar:

- a) Triterpenos
- b) Flavonoides
- c) Cumarinas
- d) Alcaloides
- e) Glicósidos cianogénicos
- f) Taninos

a) TRITERPENOS

La familia *Euphorbiaceae* es muy rica en triterpenos de los cuales se han aislado e identificado más de 55 triterpenos tetra y pentacíclicos [8], algunos de los más representativos se muestran en la Tabla I y su estructura en el Esquema 1. Los triterpenos son productos naturales compuestos de 30 átomos de carbono, procedentes del isopreno, casi siempre hidroxilados en la posición tres. Presentan una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto base [9].

¹. Son aquellos que se derivan de un grupo reducido de metabolitos primarios por medio de reacciones enzimáticas.

b) FLAVONOIDES

Varios flavonoides se han caracterizado de las Euforbiáceas, principalmente flavonas y flavonoles, estos se encuentran en su mayoría en forma de O- y C-glicósidos y como metil éteres.

Los flavonoides son productos naturales compuestos por 15 átomos de carbono que están constituidos por dos núcleos bencénicos unidos por un eslabón de tres carbonos [10], estos compuestos en su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos. La Tabla I y el Esquema 1 muestran los nombres y estructuras de algunos flavonoides.

c) CUMARINAS

Las cumarinas son productos naturales que se han aislado muy poco de las plantas que pertenecen a las Euforbiáceas. A las cumarinas se le considera derivados de la lactona del ácido O-hidroxicinámico, usualmente llamado coumarina [11], la mayoría de las cumarinas conocidas se encuentran libres en las plantas, pero se conocen algunos glicósidos del psoraleno. Ver la Tabla I y el Esquema 1.

d) ALCALOIDES

Los alcaloides son sustancias que se encuentran presentes en varios géneros de las Euforbiáceas, en particular en los géneros *Croton*, *Phyllanthus* y *Securinega*. (Tabla I y Esquema 1).

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas con acción fisiológica intensa sobre los animales [11].

e) GLICOSIDOS CIANOGENICOS

En realidad son pocos los glicósidos cianogénicos que han sido aislados e identificados en las Euforbiáceas. La Tabla I y el Esquema 1 muestran algunos nombres y estructuras de glicósidos.

Los glicósidos cianogénicos se biosintetizan de aminoácidos vía aldoximas, por lo regular las sustancias cianogénicas vegetales son siempre glicósidos de 2-hidroxi nitrilos, debido a este tipo de compuestos la planta produce ácido cianhídrico [10].

f) TANINOS

Los taninos pueden ser aislados e identificados de algunas especies de Euforbiáceas. En la Tabla I y el Esquema 1 se detallan algunos nombres y estructuras de taninos.

Los taninos se pueden describir como compuestos fenólicos hidrosolubles con elevado peso molecular, que presentan las propiedades clásicas de los fenoles, con la característica de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas [11].

TABLA I. COMPUESTOS AISLADOS DE LAS EUFORBIACEAS [7,8]

TRITERPENOS		
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA
<i>Euphorbia</i> ssp <i>Macaranga tanarius</i>	α -Amirina	(1)
<i>Euphorbia</i> ssp <i>Phyllanthus acidus</i>	β -Amirina	(2)
<i>Euphorbia boteri</i> <i>Euphorbia caudicifolia</i> <i>Euphorbia hirta</i> <i>Euphorbia nerifolia</i> <i>Euphorbia petiolata</i>	Cicloartenol	(3)
<i>Antidesma menusa</i> <i>Apurosa cardiosperma</i> <i>Bridelia moontii</i> <i>Euphorbia longana</i> <i>Euphorbia supina</i> <i>Euphorbia trigona</i> <i>Macaranga coranilinearis</i> <i>Phyllanthus flexuosus</i>	Fridelina	(4)
<i>Euphorbia boteri</i> <i>Euphorbia rusopolii</i> <i>Euphorbia tirucalli</i> <i>Synadenium grantii</i>	Eufol	(5)
<i>Euphorbia</i> ssp <i>Glochidion</i> ssp <i>Phyllanthus</i> ssp	Lupeol	(6)

Continuación de la tabla I.

FLAVONOIDES		
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA
I. FLAVONAS		
<i>Jatropha curcas</i> <i>Jatropha gossypifolia</i>	Apigenina	(7)
<i>Croton zambezicus</i>	Orientina	(8)
II. FLAVONOLES		
<i>Euphorbia ssp</i> <i>Ricinocarpus stylosus</i>	Miricetina	(9)
<i>Euphorbia ssp</i>	Rhamnetina	(10)
III. FLAVONONAS		
<i>Mobea caudata</i>	Naringenina	(11)
<i>Euphorbia palustri</i> <i>Euphorbia stepposa</i>	Estepogenina	(12)
CUMARINAS		
<i>Euphorbia drancunculoides</i>	Dafnetina	(13)
<i>Euphorbia ssp</i>	Esculetina	(14)
<i>Euphorbia lanthyris</i>	Euforbetina	(15)

Continuación de la tabla I.

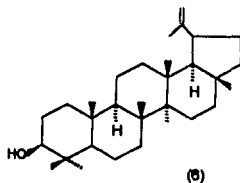
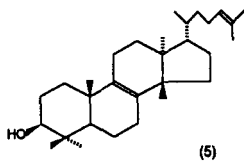
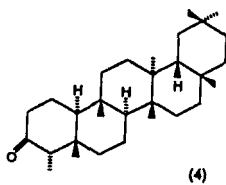
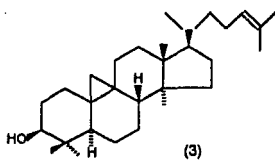
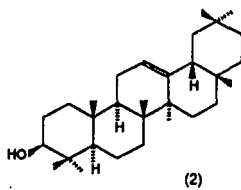
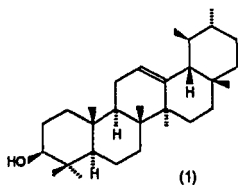
CUMARINAS		
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA
<i>Jatropha glandulifera</i>	Fraxetina	(16)
<i>Euphorbia lathyris</i>	Isoeuforbetina	(17)
ALCALOIDES		
<i>Phyllanthus discoides</i> <i>Securinega suffruticosa</i>	Alossecurina	(18)
<i>Croton linearis</i>	Crotonosina	(19)
<i>Glochidion philippicum</i>	Glochidicina	(20)
<i>Ricinus communis</i>	Ricinina	(21)
<i>Croton ssp</i>	Vasicina	(22)
GLICOSIDOS CIANOGENICOS		
<i>Acalypha indica</i>	Acalifina	(23)
<i>Manihot carthagenesis</i>	Lotraustralina	(24)
<i>Cnidoculus texanus</i>	Linamaina	(25)
<i>Phyllanthus gastroeniti</i>	Taxifilina	(26)

Continuación de la tabla I.

GLICOSIDOS CIANOGENICOS		
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA
<i>Adrachne colchita</i>	Triglochinina	(27)
TANINOS		
<i>Euphorbia hirta</i>	Acido Gálico	(28)
<i>Mallotus japonicus</i>	Corilanginina	(29)
<i>Tridaca sebifera</i>	Geraniina	(30)
<i>Mallotus japonicus</i>	Acido mallafusínico	(31)

**ESQUEMA 1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS
AISLADOS DE LAS EUFORBIACEAS**

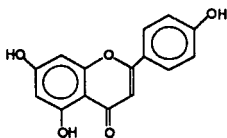
TRITERPENOS



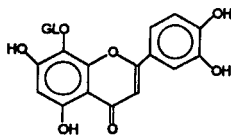
Continuación del esquema 1.

FLAVONOIDES

I. FLAVONAS

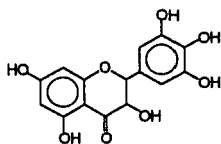


(7)

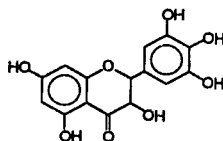


(8)

II. FLAVONOLES

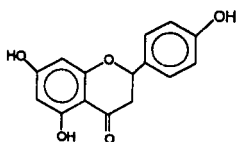


(9)

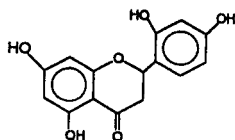


(10)

III. FLAVONONAS



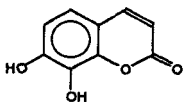
(11)



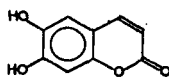
(12)

Continuación del esquema 1.

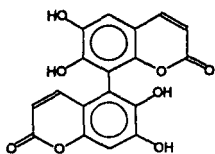
CUMARINAS



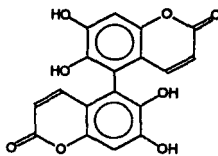
(13)



(14)



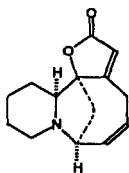
(15)



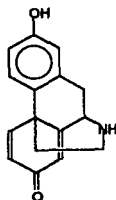
(16)

Continuación del esquema 1.

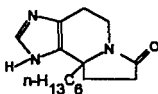
ALCALOIDES



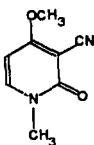
(18)



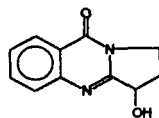
(19)



(20)



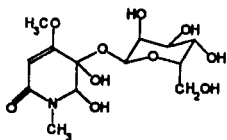
(21)



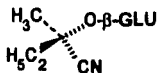
(22)

Continuación del esquema 1.

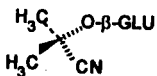
GLICOSIDOS CIANOGENICOS



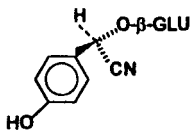
(23)



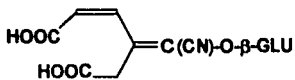
(24)



(25)



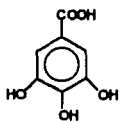
(26)



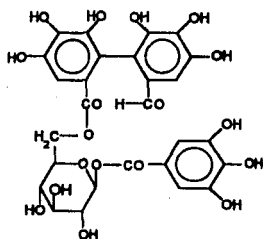
(27)

Continuación del esquema 1.

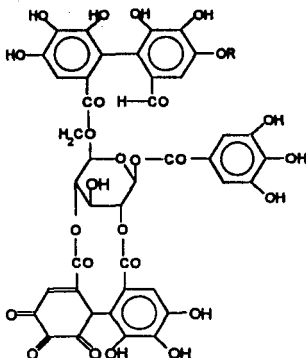
TANNOS



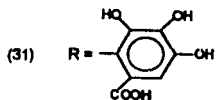
(28)



(29)



(30) R = H



(31)

2.2. GENERO *Croton*

El género *Croton*² se encuentra dentro de la familia *Euphorbiaceae*, este género pertenece a la subfamilia IV, *Crotonoideae*, a la tribu 47, *Crotonaeae*, cuyo género característico es el *Croton linnaeus* [4].

Las plantas del género *Croton* se distinguen por estar en forma de hierbas, arbustos o árboles; tallos generalmente con savia resinosa o coloreada; hojas persistentes aterciopeladas, simples, alternas; algunas veces agrupadas o subopuestas [12].

Croton es uno de los géneros más amplios de la familia *Euphorbiaceae*, ya que según Farnsworth tiene cerca de 700 especies distribuidas en América, África Continental, India, la parte tropical de Asia, Malasia, Austria y Oceanía. Se caracteriza por ser un género de zonas tropicales, sin embargo presenta algunas especies en lugares templados. Más de las dos terceras partes de las especies conocidas se encuentran en Brasil.

En México se conocen cerca de 100 especies de *Croton*, distribuidas entre los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Oaxaca, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán [13].

2.2.1. COMPUESTOS AISLADOS DEL GENERO *Croton*

A diferentes especies del género *Croton* se le han realizado numerosos estudios químicos, de los cuales se han aislado diversos compuestos; entre los que se pueden mencionar; diterpenos, triterpenos, alcaloides, flavonoides, cumarinas, derivados del *ent*-Kaurano, oleananos y compuestos fenólicos. Algunos de los compuestos aislados del género se indican en la Tabla II y las estructuras en el Esquema 2.

² La palabra *Croton* viene del griego *Kroton* que significa garrapata y fue dado a este género por el parecido de su semilla con el animal

TABLA II. COMPUESTOS AISLADOS DEL GENERO *Croton*

ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton argipilloides</i> Raíz	Acido <i>ent</i> -kaur-16-en-15-oxo-18-oico	(1)	[14]
	Acido <i>ent</i> -kaur-16-en-18-oico	(2)	
	3,12-Dioxo-15,16-epoxi-4-hidroxi-cleroda-13(16),14-dieno	(3)	[15]
<i>Croton bonplandianu</i> H ojas	3 Metoxi-4,6-dihidroxi morfina-7-ona	(4)	[16]
	Nonsinoacutina	(5)	
<i>Croton cajacura</i> Corteza	t-Crotonina	(6)	[17]
	dihidrocrotonina	(7)	
<i>Croton caudatus</i>	Estigmastan-3,6-diona,5- α	(8)	[18]
	Taraxerona	(9)	
	Taraxerol	(10)	

Continuación de la tabla II.

ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton celtdifolius</i>	(+)-L- bornesitol pentan acetato	(11)	[19]
	β -sitosterol	(12)	
<i>Croton draconoides</i>	Taliporfirina	(13)	[20]
	Taspina	(14)	
	Glaucina	(15)	
<i>Croton huamanianus</i>	Crotocorilifurano	(16)	[21]
	Crotohuamanoxido	(17)	
<i>Croton lacciferus</i> Raíz	Ac, 6-ent-Kauran-17-oico	(18)	[22]
	Ent-15- β -16-epóxi-kauran-17-ol	(19)	
	Ac. β -acetoxi-D-friedolean-14,28-oico	(20)	
	Ac. Oleanólico	(21)	
	Ent-kaur-15-en-3- β -17-diol	(22)	

Continuación de la tabla II.

ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton Lechleri</i> Savia	(+)-Catequina	(23)	[20]
	(-)-Epicatequina	(24)	
	(+)-Galocatequina	(25)	
	(-)-Epigalocatequina	(26)	
	Epicatequin-(4- β -8)-catequina	(27)	
	Catequin-(4- α -8)-epicatequina	(28)	
	Catequin-(4- α -8)-epigalocatequina	(29)	
	Galocatequin-(4- α -8)-epicatequina	(30)	
	Galocatequin-(4- α -6)-epigalocatequina	(31)	

Continuación de la tabla II.

ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton lechleri</i> Savia	Galocatequin- (4- α -8)- galocatequin- (4- α -8)- epigalocatequina	(32)	[23]
<i>Croton megalocarpus</i> Tallo	Chirimodina	(34)	[25]
<i>Croton niveus</i> Hojas	Nivenólida	(35)	[26]
<i>Croton salutaris</i> Hojas	Salutarina	(36)	[27]
	Salutaridina	(37)	
	N-norsalutaridina	(38)	
<i>Croton salutaris</i> Tallo	(10E)-3,12- dihidroxí- 3,7,11,15- tetrametil-1,10,14- hexadecatrien- 5,13-diona	(39)	[28]

Continuación de la tabla II.

ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton salutaris</i> Tallo	(6E,10E)-3,12-dihidroxi-3,7,11,15-tetrametil-1,6,10,14-hexadecatetraen-5,13-diona	(40)	[28]
	(6Z,10E)-3,12-dihidroxi-3,7,11,15-tetrametil-1,6,10,14-hexadecatetraen-5,13-diona	(41)	
	12-hidroxi-13-metilpodocarpa-9,11,13-trien-3-ona	(42)	
<i>Croton sonderianus</i>	Sonderianina	(43)	[29]
	Escopoletina	(44)	
	Sonderianol	(45)	
	3,4-seco-sonderianol	(46)	
<i>Croton sonderianus</i> Raiz	Sonderianina	(43)	[30]

Continuación de la tabla II.

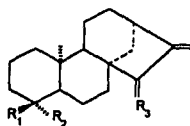
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton sonderianus</i> Raíz	Ac.-12-hidroxi-hardwickico	(47)	[30]
<i>Croton sonderianus</i> Raíz	Ac. 3,4-seco-tranquilobanoico	(48)	[31]
<i>Croton sparsiflorus</i> Planta completa	Crotosparina	(49)	[32]
<i>Croton sparsiflorus</i>	Crotosparinina	(50)	[33]
<i>Croton sparsiflorus</i>	N,O-dimetil-crotosparinina	(51)	[34]
	N-metil-crotosparinina	(52)	
	N-metil-crotosparina	(53)	
	Crotosparinina	(50)	
	Esparsiflorina	(54)	

Continuación de la tabla II.

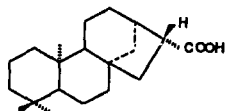
ESPECIES	NOMBRE DEL COMPUESTO	NUMERO DE LA ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Croton sublyratus</i>	Plaunólido	(55)	[35]
<i>Croton zambezicus</i>	Vitexina	(56)	[36]
	Soponarentina	(57)	
	Orientina	(58)	
	Isorientina	(59)	

**ESQUEMA 2. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS
AISLADOS DEL GENERO *Croton***

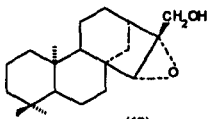
DERIVADOS DEL ENT-KAURANO



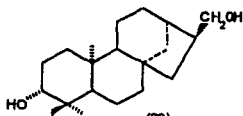
	R ₁	R ₂	R ₃
(1)	COOH	CH ₃	H
(2)	COOH	CH ₃	O



(18)



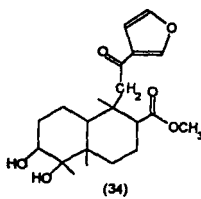
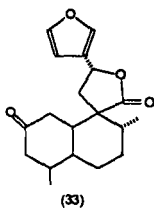
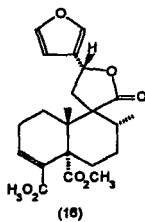
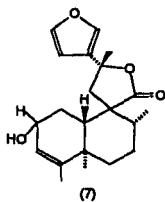
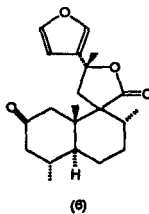
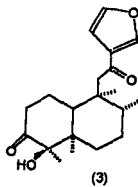
(19)



(22)

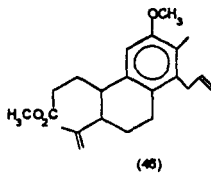
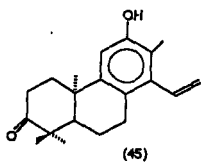
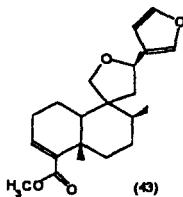
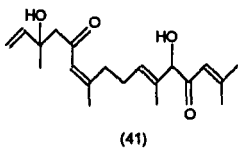
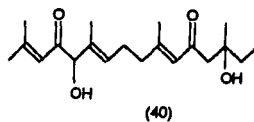
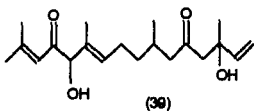
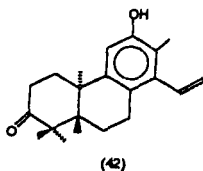
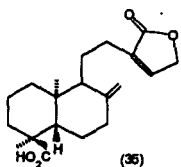
Continuación del esquema 2.

DITERPENOS



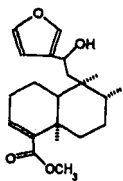
Continuación del esquema 2.

DITERPENOS

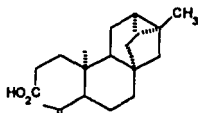


Continuación del esquema 2.

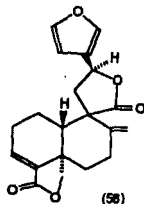
DITERPENOS



(47)

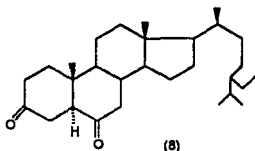


(48)

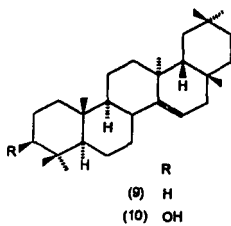


(58)

TRITERPENOS



(8)



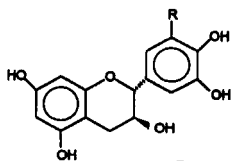
(9)

H

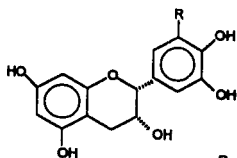
(10) OH

Continuación del esquema 2.

COMPUESTOS FENOLICOS

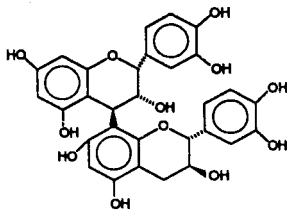


R
(23) H
(25) OH

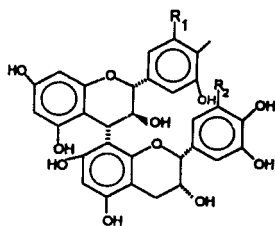


R
(24) H
(26) OH

COMPUESTOS POLIFENOLICOS



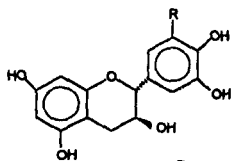
(27)



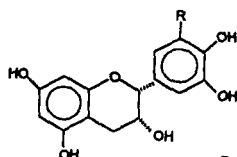
	R ₁	R ₂
(28)	H	H
(29)	H	OH
(30)	OH	H

Continuación del esquema 2.

COMPUESTOS FENOLICOS

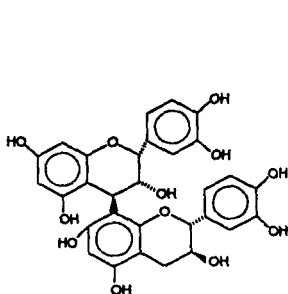


R
(23) H
(25) OH

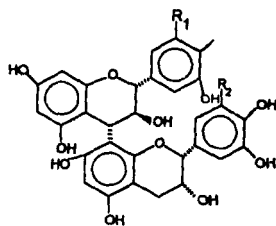


R
(24) H
(26) OH

COMPUESTOS POLIFENOLICOS



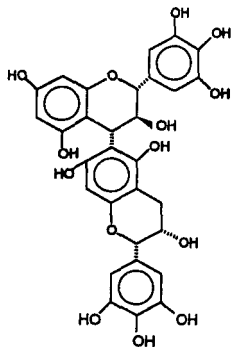
(27)



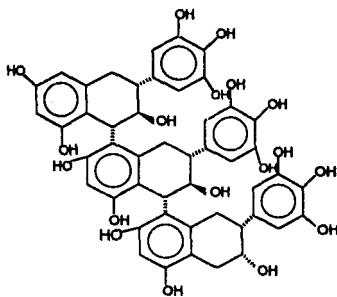
	R ₁	R ₂
(28)	H	H
(29)	H	OH
(30)	OH	H

Continuación del esquema 2.

COMPUESTOS POLIFENOLICOS



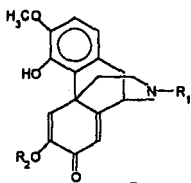
(31)



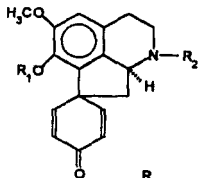
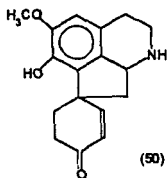
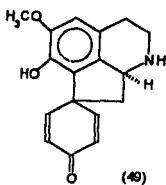
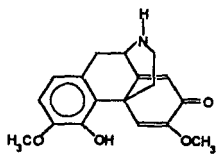
(32)

Continuación del esquema 2.

ALCALOIDES

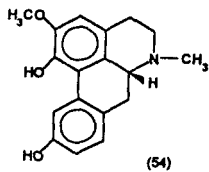
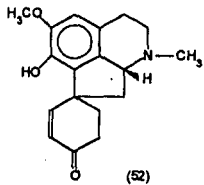


	R ₁	R ₂
(4)	H	H
(5)	H	CH ₃

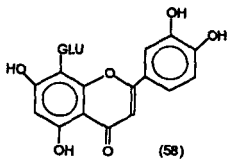
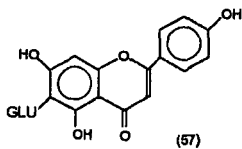
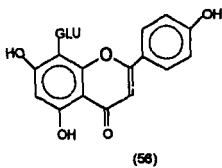


	R ₁	R ₂
(51)	CH ₃	CH ₃
(53)	H	CH ₃

ALCALOIDES



FLAVONOIDES



2.2.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL GENERO *Croton*

El género *Croton* es uno de los más amplios de las Euforbiáceas, al cual se le han atribuido varias propiedades farmacológicas, las cuales se utilizan en la medicina tradicional, de estas propiedades la más relevante es la actividad antibiótica. Algunas especies del género *Croton* presentan propiedades insecticidas (*C. ciliatoglandulosus*, *C. eleuteria*) [37]. La Tabla III. ilustra algunas actividades terapéuticas de diferentes especies del género.

TABLA III. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL GENERO *Croton*

ESPECIES	PROPIEDAD FARMACOLOGICA	REFERENCIA
<i>Croton argiophylloides</i>	Antibiótico	[15]
<i>Croton ciliatoglandulosus</i>	Antibiótico	[37]
<i>Croton cortesianus</i>	Tratamiento dermatológico	[38]
<i>Croton craspedotrichus</i>	Digestivo	[37]
<i>Croton draco</i>	Antipirético	[38]
<i>Croton eluteria</i>	Contra enfermedades venereas	[38]
<i>Croton flavens</i>	Citotóxico	[38]
<i>Croton humilis</i>	Contra enfermedades urinarias	[38]
<i>Croton lacciferus</i>	Antipirético	[21]
<i>Croton linearis</i>	Antipirético	[38]
<i>Croton lobatus</i>	Purgante	[37]
	Diurético	
<i>Croton macrotachys</i>	Antihelmíntico	[38]
<i>Croton mirycifolius</i>	Digestivo	[37]
	Antigripal	
<i>Croton nummulariaefolius</i>	Tratamiento de colitis	[37]
<i>Croton sagraeanus</i>	Antipirético	[37]
<i>Croton sellowii</i>	Antibiótico	[38]

Continuación de la tabla III

ESPECIES	PROPIEDADES FARMACOLOGICAS	REFERENCIA
<i>Croton sanderianus</i>	Antibiótico	[29]
<i>Croton stenophyllus</i>	Contra dolores de pecho	[38]
<i>Croton sublyratus</i>	tratamiento de úlceras	[35]
<i>Croton tiglium</i>	Contra la conjuntivitis	[38]

2.2.3. GENERALIDADES DE *Croton niveus*

Entre las especies del género *Croton* que existen en México, se encuentra la especie *niveus* (nombre científico); esta planta se encuentra en los estados de Colima a Tamaulipas, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Yucatán; a esta planta se le conoce con diferentes nombres vulgares dependiendo de la región donde se encuentre, copalchi blanco (Veracruz, Oaxaca y Colima); copalche, cascarilla, palo almizcle y quina Blanca (Veracruz); chul o chul-che (Yucatán); quina (Oaxaca y Guerrero) y palo de santo domingo (Guerrero).

Las plantas de esta especie se caracterizan por ser arbustos o árboles de hojas pecioladas, estipuladas de 3 a 12 cm, ovaladas de base codiforme, superficie plateada principalmente en el envés; flores en racimos axilares muy pequeños y fruto capsular trilobado.

La infusión de la corteza de la planta se utilizaba en la medicina antigua en casos de digestión perezosa, intestinos irritables y en algunos casos como planta medicinal antiperiódica en caso de fiebre. [39].

Croton niveus, es una de las plantas que se encuentra entre la vasta y variada riqueza vegetativa de México, es objeto del presente estudio químico-, ya que algunos datos informados en la literatura de las plantas de este género se han encontrado compuestos con estructuras muy interesantes, las cuales se muestran en el Esquema 2. Además de atribuírseles una gran variedad de propiedades farmacológicas, (Tabla III), tal es el caso de la infusión de su corteza a la que se le atribuyen este tipo de propiedades, por las cuales se utiliza en la medicina tradicional.

Por lo descrito en el párrafo anterior, se justifica el interés y la importancia del estudio químico de *Croton niveus*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es un país que cuenta con una gran riqueza de recursos naturales, entre los que se encuentran los vegetales, de los cuales algunos son utilizados como plantas medicinales por diferentes grupos étnicos, los cuales heredaron el uso de estas plantas de las antiguas culturas que existieron en nuestro país, a pesar de tener una antigua y arraigada tradición en las plantas medicinales, el conocimiento sobre éstas es empírico y se cuenta con muy poca información sobre las mismas.

Por lo anterior el estudio químico de *Croton niveus* (copalchi); tiene la finalidad de aislar, purificar y elucidar la estructura molecular de los metabolitos mayoritarios presentes en esta especie vegetal, la cual se utiliza para casos de indigestión, intestinos irritados y en algunos casos como medicina antiperiódica; empleando técnicas convencionales para el aislamiento y purificación de los metabolitos, así como las técnicas espectroscópicas y espectrométricas que permitan elucidar las estructuras de los mismos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

El presente estudio tiene como objetivo la extracción, aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *Croton niveus* (Copalchi), la cual se utilizó en la medicina antigua por sus propiedades digestivas y como planta medicinal antiperiódica.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtención del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *Croton niveus* (Copalchi), por medio de extracciones sólido-líquido.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios que se encuentren en *Croton niveus*, mediante técnicas convencionales de aislamiento y purificación.
- Caracterizar y elucidar las estructuras de los metabolitos extraídos de *Croton niveus*, a través de sus propiedades físicas y por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Contribuir al conocimiento químico y a la información que se tiene sobre las plantas medicinales que se encuentran en México.

5. HIPOTESIS

Estudios químicos previos realizados a las plantas del género *Croton* que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, informan que se han aislado y caracterizado sustancias como los diterpenos, triterpenos, alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, etc. Entonces por medio de técnicas convencionales de extracción, separación y purificación se podrán aislar los metabolitos secundarios mayoritarios de *Croton niveus*, los cuales se caracterizarán por técnicas espectroscópicas y espectrométricas; estos metabolitos pueden ser sustancias iguales a las aisladas de otras especies pertenecientes al género *Croton* o bien pueden ser diferentes dependiendo de la individualidad biológica de la planta y al medio en el que se desarrolla.

6. MATERIAL

- Columnas para cromatografía de diferentes tamaños y diámetro
- Equipo para destilación (simple, fraccionada, y arrastre de vapor)
- Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades
- Matraces Kitazatos de diferentes capacidades
- Matraces balón de diferentes capacidades
- Vasos de precipitado diferentes capacidades
- Pipetas graduadas, volumétricas y pasteur
- Embudos büchner
- Parrilla de calentamiento
- Parrilla de agitación
- Barra magnética
- Material biológico: Larvas de *Artemia salina*

7. EQUIPO

- Balanza analítica Ainsworth modelo 100A
- Balanza granataria Ohaus serie 700-800
- Rotavapor Yamoto RE-47
- Lámpara de luz UV Listed INSA & MEANS 399-J
- Aparato Fischer-Johns
- Espectrofotómetro de IR Perkin Elmer modelo 283 y 681
- Espectrofotómetro Nicolet FT IR modelo 5 SX
- Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5985 GC/Ms system 70 eV
- Espectrómetro de RMN Varian VXR-300

8. SUSTANCIAS

- Cromatofolios de sílica gel con soporte de aluminio 60 F₂₅₄
- Cromatoplaques de 20x20 de sílica gel G-200 UV₂₅₄
- Sílica gel para cromatografía en columna (70-230 ASTM)
- Disolventes: Hexano, Diclorometano, Cloroformo, Eter etílico e isopropílico, Acetato de etilo, Etanol, Metanol, etc.

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1. DESARROLLO CROMATOGRAFICO DE LA COLUMNA ORIGINAL

De las partes aéreas de *Croton niveus* (copalchi), se realizaron extracciones sólido-líquido con acetato de etilo, el cual se concentró en un rotavapor, para obtener el extracto de acetato de etilo. La separación de metabolitos secundarios se llevó a cabo en una columna de vidrio con un diámetro interno de 4.8 cm, empacada con una altura de 12 cm de sílica gel para cromatografía en capa fina, en la columna se aplicaron 68.05 g del extracto de acetato de etilo adsorbidos con 68.05 g de celita. La columna se empezó a eluir con n-hexano como fase móvil, aumentando la polaridad con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo, hasta finalizar de eluir la columna con acetato de etilo, se obtuvieron un total de 395 eluatos de 200 ml cada uno, el desarrollo de la columna se siguió por cromatografía en capa fina, los reveladores que se utilizaron fueron: la luz ultravioleta y revelador químico, éste constituido por 22.2 ml de ácido sulfúrico, 12 g de sulfato cérico de amonio en 350 g de hielo.

9.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL β -SITOSTEROL (1)

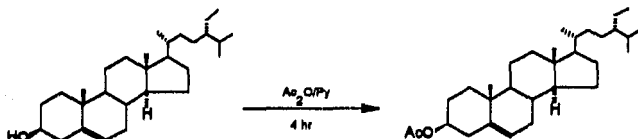
De las fracciones 4-14 eluidas con n-hexano se aislaron 620 mg (0.911%) de un sólido cristalino que fue recristalizado por par de disolventes (acetato de etilo-etanol), esta sustancia es soluble en hexano, cloroformo y acetato de etilo, el cual presenta un p.f 134-136°C.

Este sólido fue identificado como β -sitosterol de acuerdo con los datos espectrocópicos y espectrométricos, asimismo por comparación directa con un estándar. A esta sustancia le corresponde la siguiente fórmula molecular $C_{27}H_{48}O$ ($\Omega=5$), a la cual se le realizaron las reacciones de acetilación y epoxidación. Al oxirano formado se llevó a cabo la reacción de apertura.

9.2.1. REACCION DE ACETILACION DEL β -SITOSTEROL (1a) ESQUEMA A

Se hicieron reaccionar 106.7 mg de (1) con 5 ml de anhídrido acético en 1.5 ml de piridina a temperatura ambiente, el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (c.c.f.), la cual terminó después de 4 horas, en seguida se le adicionó agua.

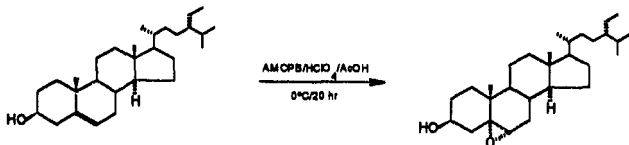
El producto de la reacción se separó con tres extracciones de 20 ml de cloroformo cada una, después se le realizaron lavados con ácido clorhídrico al 10 % así como una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio, posteriormente, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró y se obtuvieron 77mg (72.16%) de un sólido blanco cristalino que es soluble en cloroformo y diclorometano, el cual presenta un p.f. 114-117°C y le corresponde la fórmula molecular $C_{31}H_{52}O_2$ ($\Omega=5$).



ESQUEMA. A

9.2.2. REACCION DE EPOXIDACION DEL β -SITOSTEROL (1b) ESQUEMA B

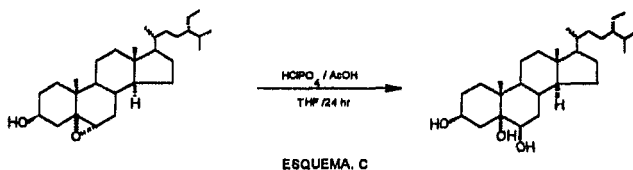
103 mg de (1) se hicieron reaccionar con 110 mg de ácido m-cloro perbenzoico en 25 ml de diclorometano a 0°C, el curso de la reacción se siguió por c.o.f., concluida la reacción después de 20 horas se detuvo ésta, con agua, después se realizaron lavados con tiosulfato de sodio y carbonato de sodio en solución al 10 %, por último se llevaron a cabo tres extracciones de 20 ml de diclorometano cada una para aislar el producto de reacción, la cantidad obtenida fue de 75.5 mg (73 %), el cual es un sólido blanco de aspecto algodonoso, soluble en hexano, cloroformo y acetato de etilo. Presenta un p.f. 145-147°C y le corresponde la siguiente fórmula molecular $C_{29}H_{50}O_2$ ($\Omega=5$).



ESQUEMA. B

9.2.3. REACCION DE APERTURA DEL 5 α -EPOXI-COLESTAN-3 β -OL (1c) ESQUEMA C

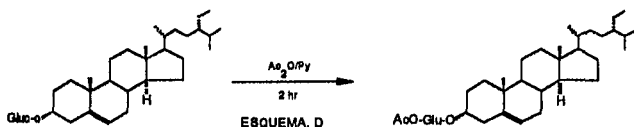
Se realizó la reacción de apertura de 5 α -epóxi-colestan-3 β -ol con 46.3 mg de éste, en 5 ml de tetrahidrofurano, 2 ml de agua y 2 ml de ácido perclórico 0.1M en ácido acético; el curso de la reacción se siguió por c.c.f., la reacción acabó después de 24 horas y al término de ésta, se le adicionó agua, posteriormente el producto de reacción se separó con tres extracciones de 20 ml de cloroformo cada una, después se realizaron lavados con una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio, el producto obtenido fue de 33.2 mg (71.70 %) de un sólido blanco cristalino que es soluble en hexano, cloroformo, acetato de etilo y acetona. Presenta un p.f. 231-233°C y le corresponde la siguiente fórmula molecular C₂₉H₅₂O₃ ($\Omega=5$).



9.3. OBTENCION DEL ACETILADO DEL β -D-GLUCOSIDO DE β -SITOSTEROL (2a) ESQUEMA D

De las fracciones 358-395, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (65:35) hasta terminar con acetato de etilo, se aisló un sólido blanco que se descompone antes de fundirse, esta sustancia es soluble en etanol y metanol caliente, su espectro de I.R. en suspensión muestra una banda muy intensa a 3384 cm⁻¹, lo que permite suponer que la molécula presenta varios grupos hidroxilos. tomando en cuenta éstos, se realizó una reacción de acetilación para obtener el peracetilado de dicho compuesto, para este fin se hicieron reaccionar 50 mg del sólido con 10 ml de anhídrido acético en 1 ml de piridina a temperatura ambiente, el curso de la reacción se siguió por c.c.f., esta reacción terminó después de 2 horas, al término de esta se adicionó agua y se extrajo el producto de reacción con tres extracciones de 20 ml de cloroformo cada una, enseguida se realizaron lavados con ácido clorhídrico al 10 %.

y una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio, por último se secó con sulfato de sodio anhidro, para obtener 20 mg (40 %) de un sólido blanco cristalino, soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona, el cual presenta un p.f. 155-157°C.



9.4. SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL EPOXIDO DE CARIOFILENO (3)

De la fracción 2 de la columna original se realizó una recromatografía, para realizar ésta operación se montó una columna de vidrio con un diámetro interno de 5 cm y una altura de 10 cm, empacada con sílica gel para c.c.f., en esta columna se aplicaron 13.4 g del extracto adsorbido con 13.4 g de celita, la elución de la columna se inició con n-hexano como fase móvil, se continuó eluyendo con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo en polaridad creciente, hasta finalizar de eluir la columna con acetato de etilo. Se obtuvieron 664 fracciones de 100 ml cada una.

De las fracciones 21-30 eluidas con n-hexano se aislaron 272 mg (0.401%) de un aceite color ámbar, el cual fue identificado con base en los datos espectroscópicos y espectrométricos como el epóxido de cariofileno.

9.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO FRENTE A *Artemia salina*

El ensayo se realizó con el extracto de acetato de etilo. La muestra se preparó pesando 20 mg de extracto de acetato de etilo y se tomaron alícuotas de 500 µl, 50 µl, 5 µl respectivamente, transfiriéndose a viales en los que se deja evaporar el disolvente, realizando cada muestra por triplicado.

Se colocaron diez larvas de *Artemia salina*, para cada muestra conteniendo el extracto a evaluar, posteriormente se aforó con 5ml de agua de mar artificial, se cubrieron los viales conteniendo 10, 100 y 1000 ppm y se colocaron bajo la luz de un foco de 60 watts durante 48 horas, después de este tiempo se contaron las larvas muertas con ayuda de una pipeta pasteur y con un lente de aumento. El bioensayo se realizó por triplicado en las mismas condiciones anteriores.

RESULTADOS

**TABLA IV RENDIMIENTOS Y PUNTO DE FUSION
DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS**

COMPUESTO	RENDIMIENTO	PUNTO DE FUSION
β -sitosterol	0.911%*	134-136°C
Acetilado del β -sitosterol	72.16%**	114-117°C
5 α -epóxi-colestan-3 β -ol	73.00%**	145-147°C
5 α ,6 β -diol-colestan-3 β -ol	71.70%**	231-233%
Glucósido de β -sitosterol	0.152%*	Descompone
Acetilado del glucósido de β -sitosterol	40.00%**	155-157%
Epóxido de cariofileno	0.401%*	Aceite

* Con base en el peso del extracto de acetato de etilo.

** Con base en el peso de la sustancia empleada en cada una de las reacciones.

TABLA V. DATOS DE INFRARROJO DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

COMPUESTO	cm ⁻¹						
1	3609			2936	2869	1380	1044
1a		3444		2939	2868	1380	1033
1b		3423		2935	2869	1377	1091
1c		3429		2937	2868	1376	1041
2			3384	2923	2853	1377	1023
2a				2956	2869	1371	1039

4

TABLA VII DATOS DE ESPECTROMETRIA DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO 70 eV

COMPUESTO	m/z (% DE ABUNDANCIA RELATIVA)							
I	414 (M ⁺ ;20.3)	329 (35)	212 (55)	145 (80)	107 (89)	91 (100)	81 (90)	43 (75)
Ia	396 (M ⁺ - AcOH;100)	381 (19)	255 (23)	213 (14)	147 (31)	81 (28)	55 (83)	43 (76)
Ib	430 (M ⁺ ;30)	412 (100)	271 (33)	149 (35)	135 (52)	81 (68)	55 (83)	43 (76)
Ic	448 (M ⁺ ;10)	430 (100)	247 (32)	244 (30)	95 (32)	81 (35)	55 (38)	43 (36)
2a	396 (M ⁺ - AcOH;100)	331 (30)	256 (20)	174 (80)	146 (10)	119 (40)	81 (30)	42 (70)

11. DISCUSION DE RESULTADOS

β -SITOSTEROL (1)

De las fracciones 4-14, obtenidas al ehir la columna original con n-hexano, se aisló un sólido blanco cristalino con un p.f. de 134-136°C. El espectro de IR (espectro 1, página 60), muestra la presencia de hidroxilo debido a las bandas de absorción en 3609 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} y 1044 cm^{-1} . El espectro de masas por impacto electrónico, de esta sustancia, muestra un ión molecular en m/z 414; también se visualizan las señales en m/z 329 y 303, características de los esteroides que presentan una insaturación entre los carbonos 5 y 6 [40]. En su espectro de RMN- ^1H (espectro 2, página 61) muestra una señal doble en δ 5.35 (1H, *d*, $J=4\text{Hz}$) que corresponde al hidrógeno vínilico de la posición 6, la señal en δ 3.58 (1H, *m*) se le asignó al hidrógeno geminal al hidroxilo que está en la posición 3; un singulete en δ 1.02 (3H, *s*) se asignó a los hidrógenos del metilo 19; los hidrógenos de los metilos restantes de ésta molécula se encuentran entre δ 1.00-0.70.

Los datos anteriores permitieron deducir la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ ($\Omega=5$), que al comparar sus constantes espectroscópicas y propiedades físicas con las informadas en la literatura para los fitosteroides se confirmó que la sustancia aislada es el β -sitosterol (compuesto 1), ver figura 2, sustancia ampliamente distribuida en la naturaleza [41,42].

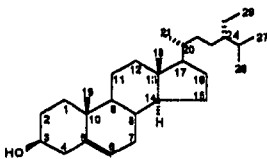


FIGURA. 2 β -sitosterol (1)

ACETILADO DEL β -SITOSTEROL (1a)

De la reacción de acetilación que se le realizó al β -sitosterol, se obtuvo un sólido blanco cristalino con un p.f. de 114-117°C. El IR (espectro 3, página 62) se observa la presencia del acetato por la banda característica de éste en 1731 cm^{-1} mientras que en el espectro de masas por impacto electrónico de dicha sustancia se observa un pico a 396 (100%), que resulta de la pérdida de ácido acético, a través de un arreglo de Mc Lafferty por lo que se infiere, que el peso molecular de dicho compuesto es de 456. Su espectro de RMN- ^1H (espectro 4, página 63) muestra una señal en δ 5.33 (1H, *d*, $J=3\text{Hz}$) que corresponde al hidrógeno vínilico presente en la posición 6, el núcleo que se observa en δ 4.63 (1H, *m*) pertenece al hidrógeno geminal al acetato, el doblete en δ 2.32 (1H, *d*, $J=4\text{Hz}$) se le asignó a los hidrógenos de la posición 7; las señales que pertenecen a los hidrógenos de los metilos se asignaron de la manera siguiente: δ 2.02 (3H, *s*) para el acetato, δ 1.02 (3H, *s*) H-19, δ 0.89 (3H, *s*), H-21, δ 0.85 (3H, *s*), H-29, δ 0.80 (6H, *s*) H-26 y 27 y por último δ 0.68 (3H, *s*.) para H-18 [41].

Todos los datos anteriores permitieron proponer la fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$ ($\Omega=5$) que corresponde al acetilado del β -sitosterol (compuesto 1a), figura 3.

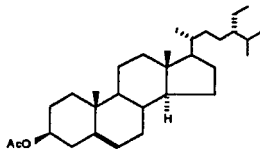


FIGURA. 3 Acetilado del β -sitosterol (1a)

5 α -EPOXI-COLESTAN-3 β -OL (1b)

Al realizar la reacción de epoxidación del β -sitosterol, se obtuvo un sólido blanco de aspecto algodonoso con un p.f. de 145-147°C, en el espectro de IR (espectro 5 página 64) muestra la presencia del enlace -C-O-C- por las bandas de absorción en 1105 cm^{-1} y 1091 cm^{-1} , así como también la evidencia de hidroxilo por las bandas de absorción en 3423 cm^{-1} , 1377 cm^{-1} y 1062 cm^{-1} . Por otra parte en el espectro de masas por impacto electrónico se observa un aumento de 16 unidades de masa con respecto al β -sitosterol, para un ión molecular en m/z 430. Su espectro de RMN- ^1H (espectro 6, página 65) presenta las siguientes señales en: δ 3.90 (1H, *m*) para el hidrógeno geminal al hidroxilo en la posición 3, δ 2.80 (1H, *d*, $J=3\text{Hz}$) que corresponde al hidrógeno geminal al oxirano en la posición 6, que de acuerdo con su constante de acoplamiento se deduce que este hidrógeno tiene una orientación β -axial y por ende el epóxido posee una orientación α -ecuatorial. Los siguientes desplazamientos químicos corresponden a los hidrógenos para los metilos de la molécula en: δ 1.03 (3H, *s*) H-19, δ 0.82 (3H, *s*) H-21, δ 0.80 (3H, *s*) H-29, δ 0.78 (6H, *s*) H-26 y 27, y por último δ 0.60 (3H, *s*) se le asignó a H-18.

Los datos anteriores permitieron proponer la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($\Omega=5$) que corresponde al compuesto (1b) y se trata del 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol, figura 4.

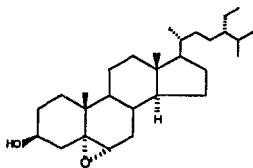


FIGURA. 4 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol (1b)

APERTURA DEL 5 α -EPOXI-COLESTAN-3 β -OL (1c)

De la reacción de apertura que se le realizó al 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol, se obtuvo un sólido blanco cristalino con un p.f. de 231-233°C. Su espectro de IR (espectro 7, página 66) muestra la presencia de hidroxilo debido a las bandas de absorción en 3429 cm^{-1} y 1376 cm^{-1} . El espectro de masas por impacto electrónico de esta sustancia muestra un aumento de 18 unidades de masa con respecto al 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol, con un ión molecular de 448. Su espectro de RMN- ^1H (espectro 8, página 67) presenta una señal múltiple en δ 4.10 (1H, *m*.) que corresponde al hidrógeno en la posición 3, la señal en δ 3.54 (1H, *s.a.*, $W_{1/2}=1\text{Hz}$) fue asignada al hidrógeno que está en la posición 6, una señal en δ 1.18 (3H, *s*) pertenece a los hidrógenos del metilo 19, el desplazamiento químico de los hidrógenos, de este metilo a campo más bajo con respecto a los H-19 del 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol, confirman la disposición β -axial del hidroxilo, porque existe una interacción 1,3-diaxial (Fig. 5), la señal en δ 0.89 (3H, *s*) corresponde a los hidrógenos del metilo 21, la señal en δ 0.83 (3H, *s*) se le asignó a los hidrógenos del metilo 29, y por último una señal en δ 0.68 (3H, *s*) corresponde a los hidrógenos del metilo 18.

Los datos anteriores permitieron proponer la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_3$ ($\Omega=4$) que corresponde a la apertura del 5 α -epoxi-colestan-3 β -ol (compuesto 1c), figura 5.1.

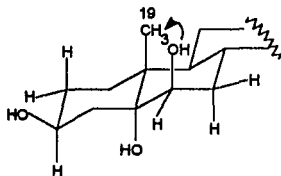


FIGURA 5. Interacción 1,3-diaxial

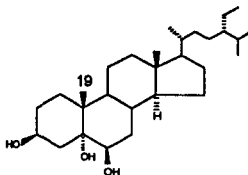


FIGURA. 5.1. 5 α ,6 β -diol-colestan-3 β -ol (1c)

ACETILADO DEL β -D-GLUCOSIDO DE β -SITOSTEROL (2a)

De las fracciones 358-395 de la columna original, se obtuvo un sólido blanco que se descompone a 253°C, el cual es soluble en etanol y metanol caliente. En su espectro de IR (espectro 9, página 68) muestra una banda intensa en 3384 cm^{-1} , lo que permite suponer que la molécula presenta varios grupos hidroxilo, lo que le permite ser muy polar y poco manejable para su análisis espectroscópico; por lo que fue necesario realizar una reacción de acetilación. De dicha reacción se obtuvo un sólido blanco cristalino con un p.f. de 155-157°C. El espectro de IR (espectro 10, página 69) muestra la presencia de un enlace -C=O por la banda de absorción en 1752 cm^{-1} . Su espectro de masas por impacto electrónico presenta un pico a 396 (100 %), que resulta de la pérdida de ácido acético, a través de un arreglo de McLafferty. Por último su espectro de RMN- ^1H (espectro 11, página 70) del compuesto acetilado tiene múltiples señales que fueron asignadas de la forma siguiente: un singulete en δ 0.67 (3H, *s*) que pertenece a los hidrógenos del metilo 18, un doblete en δ 0.85 (6H, *d*, $J=7\text{Hz}$) fue asignado a los hidrógenos de los metilos 26 y 27, una señal doble en δ 0.93 (3H, *d*, $J=7\text{Hz}$) corresponde a H-21, un singulete en δ 0.98 (3H, *s*) se le asignó a H-19, un multiplete en δ 3.05 (1H, *m*) para el H-3 y por último un doblete en δ 5.36 (1H, *d*, $J=8\text{Hz}$) para el hidrógeno vínico de la posición 6.

Las siguientes señales fueron asignadas a la parte glucosídica de la molécula, de la siguiente forma en: δ 4.50 (1H, *d*, $J=8\text{Hz}$) corresponde al hidrógeno ubicado en el carbono 1, δ 4.96 (1H, *dd*, $J=10\text{Hz}$, 8Hz) se le asignó al hidrógeno del carbono 2, δ 5.21 (1H, *t*, $J=10\text{Hz}$) pertenece al hidrógeno del carbono 3', δ 5.08 (1H, *t*, $J=10\text{Hz}$) fue atribuido al hidrógeno del carbono 4, δ 3.68 (1H, *ddd*, $J=10.5$, 2Hz) pertenece al hidrógeno del carbono 5, δ 4.22 (1H, *dd*, $J=10\text{Hz}$, 5Hz) para el hidrógeno "a" del carbono 6, δ 4.11 (1H, *dd*, $J=10\text{Hz}$, 2Hz) se asignó al hidrógeno "b" del carbono 6 y por último cuatro señales entre δ 2.00-2.07 (12H, 4*s*) que corresponden a los cuatro grupos metilos de acetato.

Los datos anteriores y con base en la comparación directa de sus propiedades físicas y espectroscópicas informadas permitieron concluir que la sustancia obtenida de la reacción de acetilación, es el acetilado del β -D-glucósido de β -sitosterol al cual le corresponde la siguiente fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{67}\text{O}_{10}$ (compuestos 2a), figura 4, por lo tanto se puede concluir que el sólido al que se le realizó dicha reacción es el β -D-glucósido de β -sitosterol (compuesto 2), figura 6. [41,43]

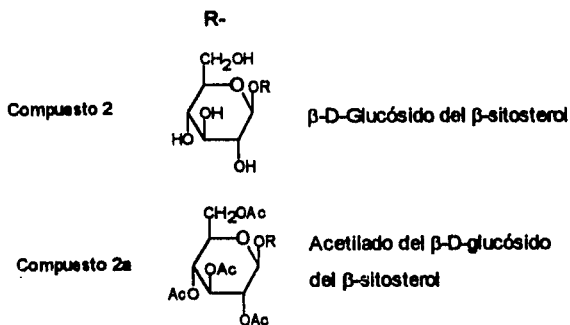
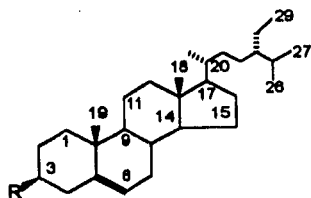


FIGURA 6. Compuestos 2 y 2a

EPOXIDO DE CARIOFILENO (3)

De las fracciones 21-30 eluidas con n-hexano de la recromatografía de la fracción 2 de la columna original, se obtuvo un aceite de color ámbar y aroma agradable. Su espectro de RMN-¹H (espectro 12, página 71) muestra señales en la zona de resonancia de los hidrógenos vinílicos, δ 4.98 (1H, *d*, *J*=2Hz) y δ 4.86 (1H, *d*, *J*=2Hz) con esto se puede establecer la presencia de un metileno exocíclico, esto se confirma en el espectro de IR que presenta bandas de absorción en 1630 cm^{-1} y 892 cm^{-1} , características para la vibración de los dobles enlaces. La señal en δ 1.19 (3H, *s*) corresponde a los hidrógenos del metilo 15 que está vecino a un oxígeno, este último pertenece a un oxirano que se identificó por el hidrógeno geminal a éste, que se encuentra en δ 2.90 (1H, *dd*, *J*=2Hz), las señales en δ 0.90 (3H, *s*) y δ 0.97 (3H, *s*) pertenecen a los hidrógenos de los metilos 12 y 13 respectivamente. El espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular en *m/z* 220.

Los datos anteriores permitieron proponer la fórmula molecular de un sesquiterpeno³, C₁₅H₂₄O ($\Omega=4$); lo anterior también se corroboró con muestra auténtica del epóxido de cariofileno, esto permitió concluir que se trataba del oxirano descrito anteriormente. figura 7, [44,45].

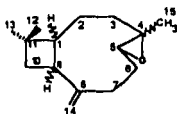


FIGURA 7. Epóxido del cariofileno

³ Los sesquiterpenos son productos naturales con 15 átomos de carbono, formados por la unión de tres unidades de isopreno

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO FRENTE A *Artemia salina*

Al determinar la actividad del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *Croton niveus* frente a *Artemia salina*, resultó ser no activo, por lo que posiblemente la actividad terapéutica informada, se le puede atribuir a otra parte de la planta o a los metabolitos individuales que constituyen dicho extracto. [46]

Sin embargo al β -sitosterol no se le realizó el bioensayo porque, de acuerdo con lo descrito en la literatura no presenta actividad. [41]

12. CONCLUSIONES

Se realizó el análisis de las partes aéreas de *Croton niveus*, conocida como "copalchi", esta planta se utilizaba en la antigüedad como medicina antiperiódica, para intestinos irritados y en casos de digestión perezosa. Del presente estudio se aislaron e identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios, por medio de técnicas convencionales de extracción, separación y purificación; de las sustancias aisladas dos de ellas se identificaron como triterpenos y la otra como un sesquiterpeno, esto se logró con base en sus constantes físicas características de cada sustancia y por comparación con los datos informados en la literatura.

Con ayuda de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas se realizó un estudio estructural, el cual permitió identificar a los compuestos aislados como: β -sitosterol, β -D-glucósido de β -sitosterol y el epóxido de cariofileno.

Al β -sitosterol compuesto que pertenece a los esteroides se le realizaron una serie de reacciones químicas, las cuales permitieron comprobar que efectivamente se trataba de dicho compuesto, ya que al obtener sus espectros de masas por impacto electrónico se observó un aumento de masa de acuerdo al tipo de reacción realizada y en sus espectros de RMN- 1 H mostraban cambios de desplazamientos químicos en la posición de la molécula donde se había llevado a cabo la reacción.

El segundo metabolito caracterizado fue el glucósido de β -sitosterol compuesto triterpénico al cual fue necesario realizarle una reacción de acetilación y se identificó como el acetilado del β -D-glucósido de β -sitosterol, a través de la comparación de sus propiedades físicas informadas en la literatura.

Por último el epóxido de cariofileno, compuesto que pertenece a los sesquiterpenos, se caracterizó por comparación de sus propiedades espectroscópicas, espectrométricas y muestra auténtica.

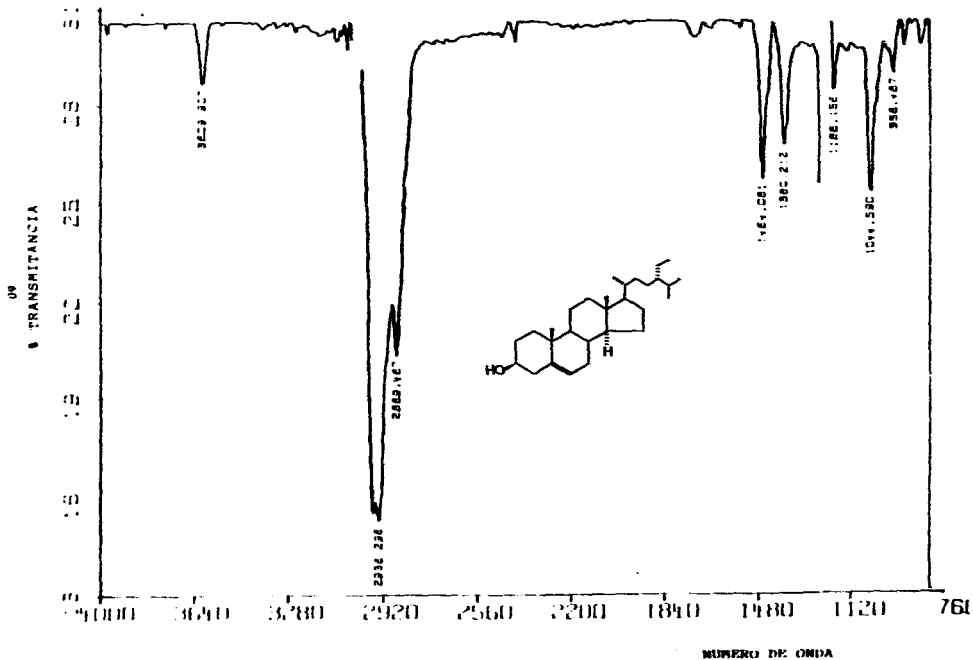
Al determinar la actividad de extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *Croton niveus*, frente a *Artemia salina*, dicho extracto no presentó actividad por lo que se concluyó que posiblemente en otras partes de la planta se encuentran los metabolitos responsables de la actividad informada o la actividad la presentan los metabolitos de manera individual.

De acuerdo con los fundamentos anteriores se concluye que los objetivos planteados en el presente trabajo fueron alcanzados en su totalidad y la hipótesis propuesta se acepta, contribuyendo y enriqueciendo el conocimiento científico que se tiene sobre las plantas de uso medicinal y que actualmente se siguen utilizando por algunos grupos sociales de México.

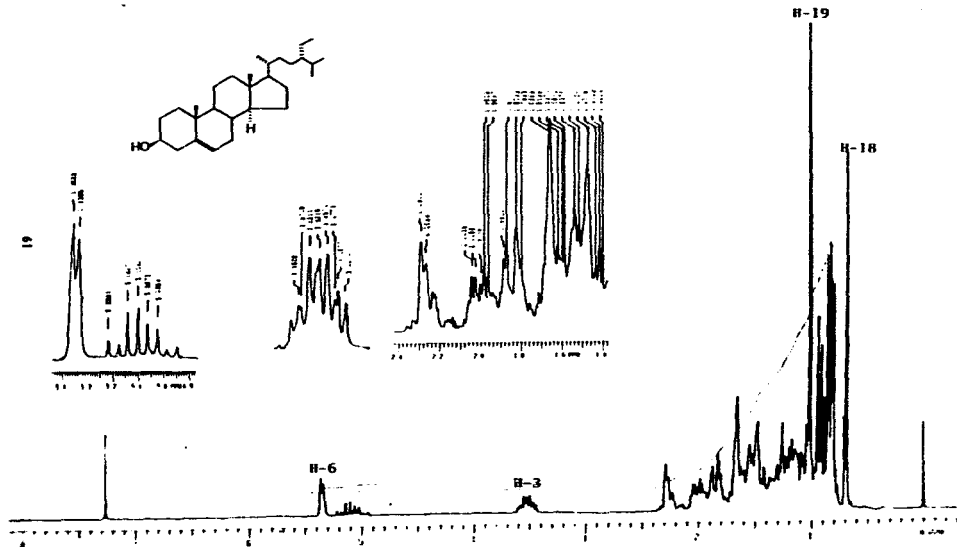
Debido a que el extracto de acetato de etilo resulto inactivo frente a *Artemia salina*, es conveniente el estudio de otras partes de la planta para poder explicar su uso como planta medicinal, utilizando diversas metodologías para el aislamiento de los compuestos que potencialmente puedan ser activos en esta especie.

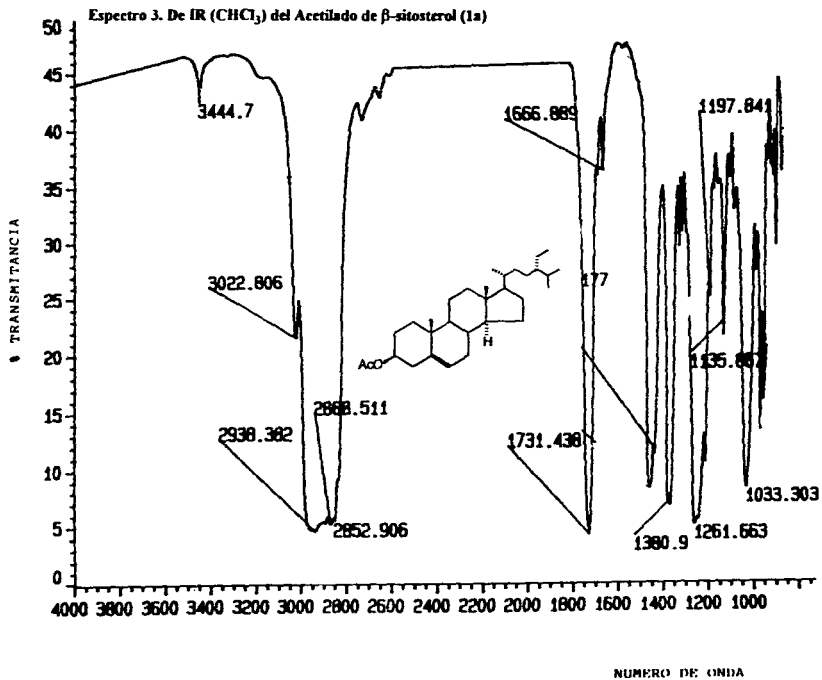
ESPECTROS

Espectro I. De IR (CHCl₃) de β-sitosterol (1)

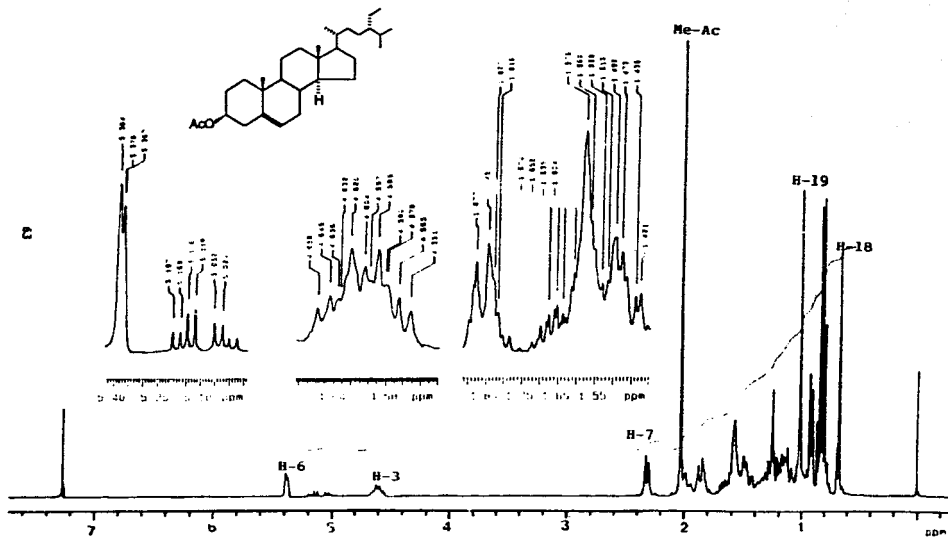


Espectro 2. DE RMN-1H (300MHz, CDCl₃, TMS) de β-sitosterol (1)

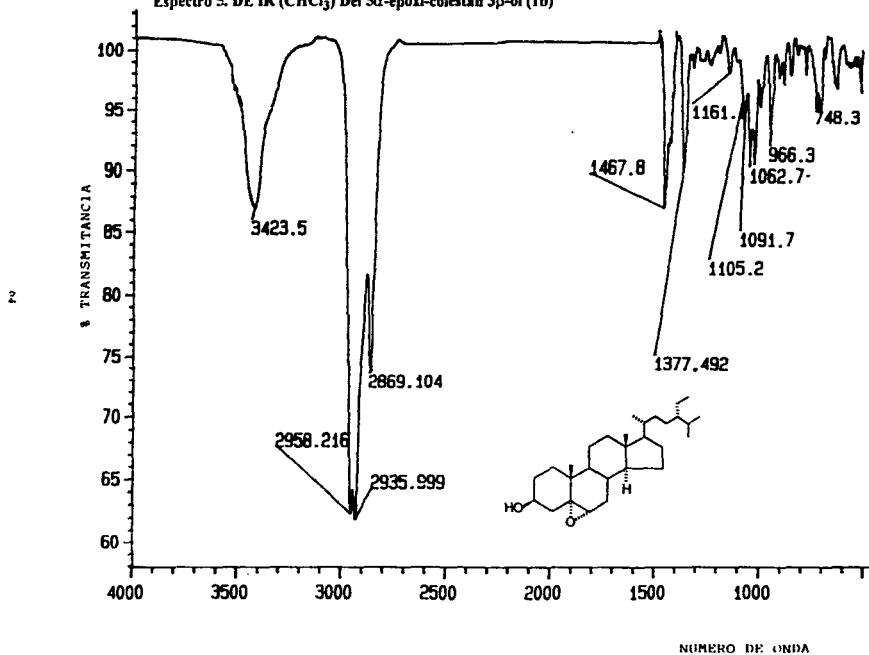




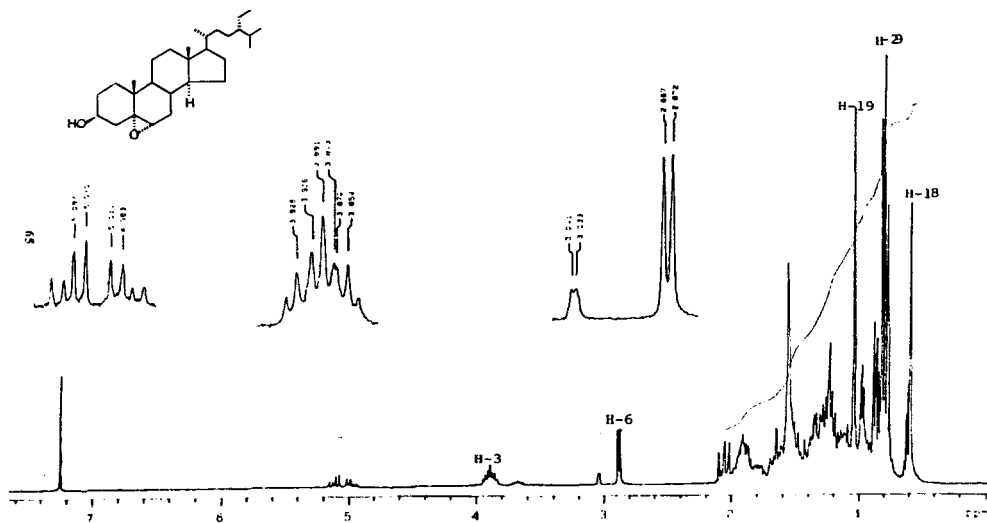
Espectro 4. De RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS) del Acetilado de β-sitosterol (1a)

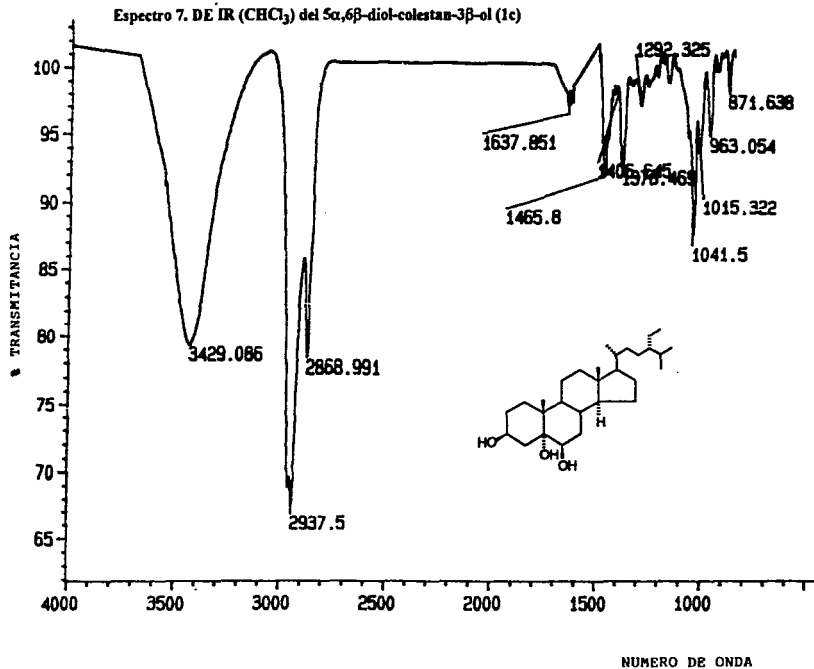


Espectro 5. DE IR (CHCl₃) Del 5 α -epóxi-colestan 3 β -ol (1b)

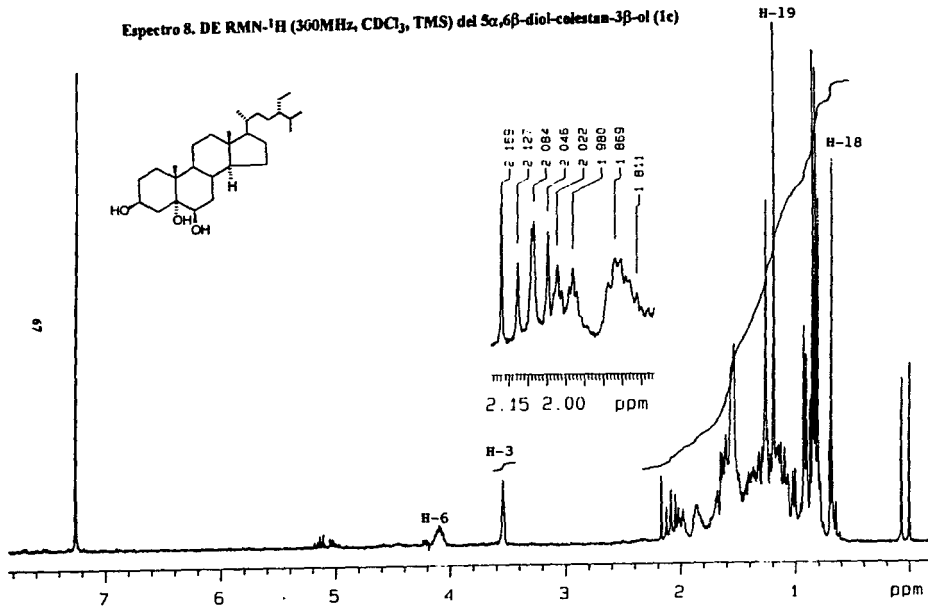


Espectro 6. DE RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS) del 5 α -epóxi-colestan-3 β -ol (1b)

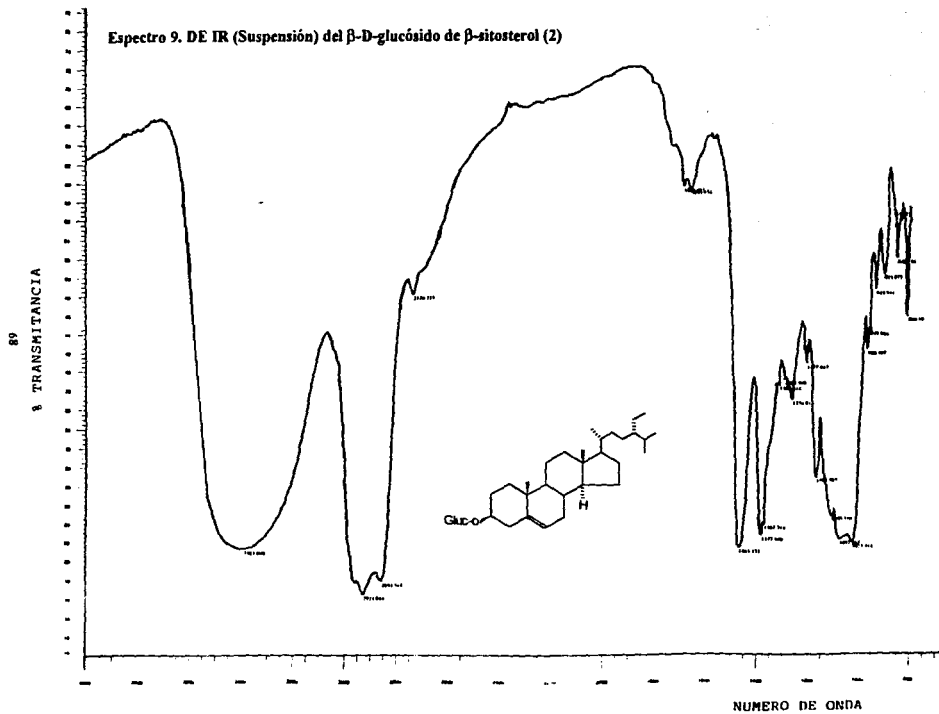




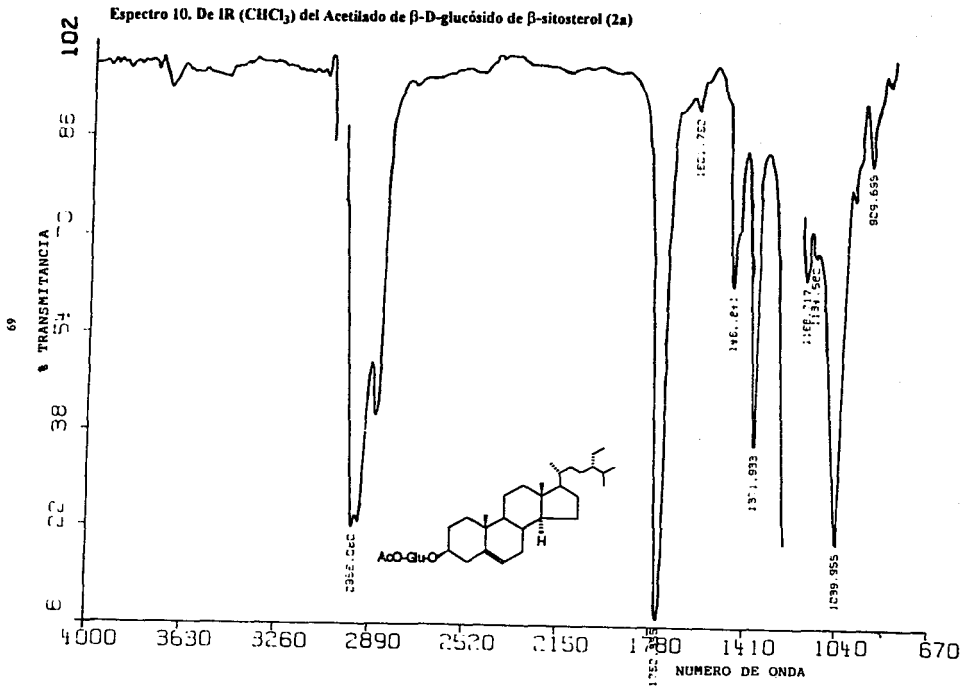
Espectro 8. DE RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS) del 5 α ,6 β -diol-colestan-3 β -ol (1c)



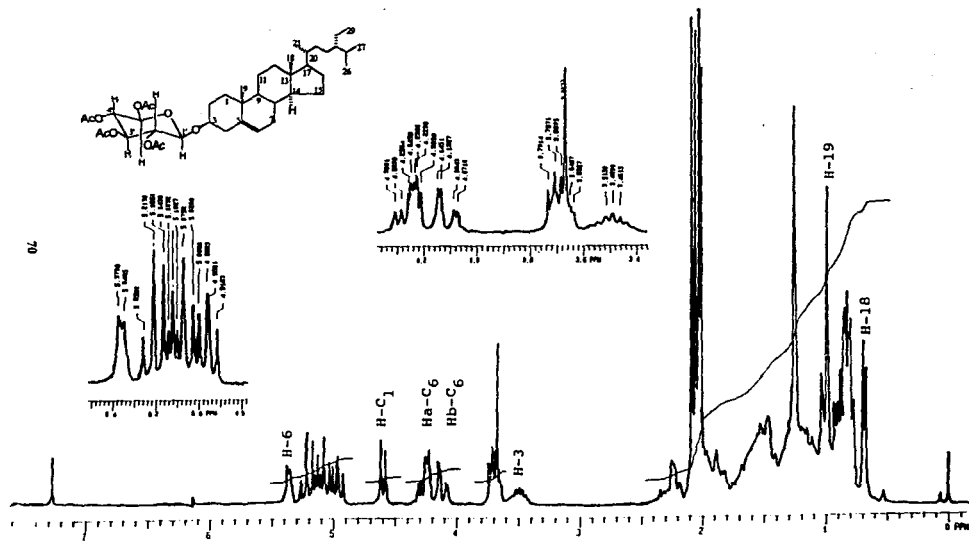
Espectro 9. DE IR (Suspensión) del β -D-glucósido de β -sitosterol (2)



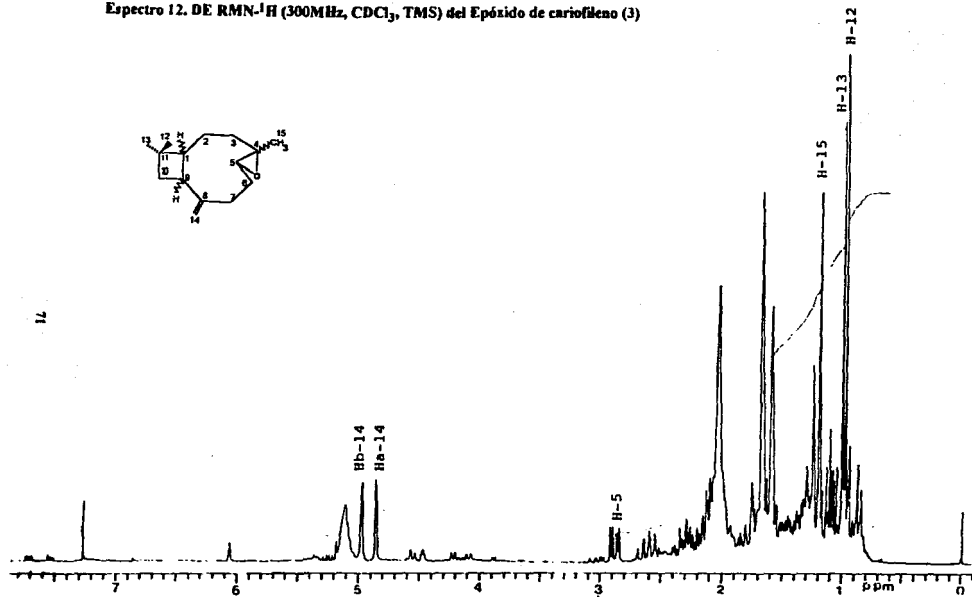
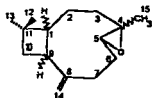
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro 11. DE RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS) del Acetilado de β-D-glucósido de β-sitosterol (2a)



Espectro 12. DE RMN-1H (300MHz, CDCl₃, TMS) del Epóxido de cariofileno (3)



GLOSARIO

Notaciones empleadas

Abreviaturas y símbolos

AMCPB	Acido meta cloro perbenzoico
$W_{1/2}$	Amplitud de la señal a la mitad de su altura
Ac_2O	Anhídrido acético
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
J	Constante de acoplamiento
C.C.F.	Cromatografía de capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
δ	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
E.M.	Espectrometría de masas
Hz	Hertz o ciclos por segundo
IR	Infrarrojo
$[M^+]$	Ión molecular
<i>m</i>	Multiplete
Ω	Número de insaturaciones
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN- 1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<i>s</i>	Singlete
<i>s.a.</i>	Singlete amplio
TMS	Tetrametil silano
<i>t</i>	Triplete

14. BIBLIOGRAFIA

1. Thomson, R.M.; "The Chemistry of Natural Products"; Blockie & Son Limited; 154-56; (1985)
2. Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R. and Rahma, S.K.; "Why are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized"; *J. Nat. Prod.* (1989) 52, 1189-1208
3. Tyler, V.E.; "Medicinal Plant Research: 1953-1987" *Planta Medica* (1988) 54, 95-100
4. Webster, L.G.; "Conspectus of a New Classification of the *Euphorbiaceae*"; *Taxon* (1975) 24, 593-601
5. Farnsworth N., Blomster N. and Messmer W.; "A phytochemical and Biological Review of the Genus *Croton*"; *Lloydia*, (1969) 32, 1-28
6. Ponsinet, G. et Ourisson, G.; "Etudes Chimio-Taxonomiques Dans la Famille des *Euphorbiacées-I*"; *Phytochemistry*, (1965) 4, 799-811
7. Abdel-Fattah, M.R.; "The Chemical Constituents and Economic Plants of the *Euphorbiaceae*"; *Bot. J. Linn. Soc.*, (1987) 94, 293-326
8. Mukherjee, K., Bhattscharjee, P. and Mehrotra, A.; "Triterpenoids of *Euphorbiaceae* Family: 1980-89"; *J. Sci. Ind. Res.* (1990) 40, 449-456
9. Romo de Vivar A.; "Productos Naturales de la Flora Mexicana"; Limusa; México D.F. (1985) 69-138, 155-182
10. Bruneton, J.; "Elementos de Fitoquímica y de Farmacognocia"; ACRIBIA; Mallorca, España; (1991) 5-10, 131-156, 298-346, 355-360

11. Domínguez, A.J.; "Métodos de Investigación Fitoquímica"; Limusa; México D.F. (1979) 81-89, 111-125, 211-228
12. Martínez G. M.; Contribución al conocimiento del género *Croton* (*Euphorbiaceae*) en el estado de Guerrero; Tesis de Licenciatura; (Taxonomía); Facultad de Ciencias UNAM; México D.F.; (1988)
13. McVaugh, R.; "*Euphorbiaceae novae novo-galiciane*"; *Brittonia*, (1961) 13, 145-205
14. Monte, F. J., Dantas, E. M. and Braz, R.; "New Diterpenoids from *Croton Argyrophylloides*"; *Phytochemistry*, (1988) 27, 3209-3212
15. Monte, F. J., Andrade, C. H., Craveiro, A., Et al; "New Tetracyclic Diterpenes from *Croton argyrophylloides*"; *J. Nat. Prod.*, (1984) 47, 55-58
16. Tiwari, K., Choudhary, R. and Pandey, G.; "3-methoxy-4,6-dihydroxymorphinandien-7-one, and Alkaloid from *Croton Bonplandianum*"; *Phytochemistry*(1981) 20, 863-864
17. Itokawa, H., Ichihara, Y., Kojima, H., Et al; "Nor-Clerodane Diterpenes from *Croton Cajacura*"; *Phytochemistry*, (1989) 28, 1667-1669
18. Baneji, A. and Nandi, G.; "Investigation of *Croton Caudatus* Geisel Isolation of Stigmastan-3,6-diones,5- α "; *J. Indian. Chem. Soc.*, (1988), 459
19. Mukherjee, R. And Edgardo, M.; "Cyclitols from *Croton celtidifolius*"; *Phytochemistri*
20. Marini, B. R. and Scarpati, M. L.; "Alkaloids of *Croton Draconoides*"; *Phytochemistry*, (1979) 18, 5199-5202
21. Tchissambou, L., Chiaroni, A., Riche, C., Et al; "Crotocorylifuran and Crotohaumanoxide, New Diterpenes from *Croton Haumanianus*"; *Tetrahedron*, (1990) 46, 5199-5202

22. Ratnayake, B. M., Wimalasiri, W. and Macleod, J.; "Ent-Kauranes and Oleananes from *Croton Lacciferus*"; *Phytochemistry*, (1988) 27, 869-871

23. Cai, Y., Evans, F., Roberts, M., Et al; "Poliphenolic Compounds from *Croton Lechleri*"; *Phytochemistry*, (1991) 30, 2033-2040

24. Chan, W., Taylor, D. and Willis, C.; "Terpenoids from the *Euphorbiaceae* Part I. The Structure of Crotonin, a Norditerpene from *Croton Lucidus*"; *J. Chem. Soc. (C)*, (1968), 2781-2785

25. Addae-Mensah, I., Waibel, R.; Achenbac, H., Et al; "A Clerodane Diterpene and Other Constituents of *Croton Megalocarpus*"; *Phytochemistry*, (1989) 28, 2759-2761

26. Rojas, E. T. and Rodriguez-Hahn, L.; "Nivenolide, a Diterpene from *Croton Niveus*"; *Phytochemistry*, (1978) 17, 574-575

27. Barnes, R. and Sociro, O.; "The Alkaloids of *Croton Salutaris*"; *Phytochemistry*, (1981) 20, 543-544

28. Itokawa, H., Ichihara, Y., Takeya, K., Et al; "Diterpenes from *Croton Salutaris*" *Phytochemistry*, (1991) 30, 4071-73

29. Craveiro, A. and Silveira, E.; "Two Cleistanthane Type Diterpenes from *Croton Sonderianus*"; *Phytochemistry*, (1982) 21, 2571-2574

30. McChesney, J. and Silveira, E.; "12-Hydroxyhardwickic Acid and Sonderianal, Neo-Clerodanes from *Croton Sonderianus*"; *Phytochemistry*, (1989) 28, 3411-3414

31. McChesney, J. and Clark, A.; "Antimicrobial Diterpenes of *Croton Sonderianus*, Hardwickic and 3,4-Secotrachylobanoic Acids"; *J. Nat. Prod.*, (1991) 54, 1625-1633

32. Bhakuni, D. and Dhar, M.; "Crotsparine, a New Prooporphines Alkaloid from *Croton Sparsiflorus Morong*"; *Experientia*, (1968) 24, 10-11
33. Bhakuni, D. and Dhar, M.; "Crotsparinine, a Dihydroprooporphine Alkaloid from *Croton Sparsiflorus*"; *Experientia*, (1969) 15, 354
34. Bhakuni, D., Satish, S., and Dhar, M.; "The Alkaloids of *Croton Sparsiflorus*"; *Phytochemistry*, (1970) 9, 2573-2580
35. Takahashi, S., Kurabayashi, M., Kitazawa, E.; Et al; "Plaunolide, a Furanoid Diterpene from *Croton Sublyratus*"; *Phytochemistry*, (1983) 22, 302-303
36. Wagner, H., Hörhammer, L. und Kiraly, I. C.; "Flavon-C-glykoside in *Croton Zambezicus*"; *Phytochemistry*, (1970) 9, 897
37. Sánchez, V., Sandoval, D., Herrera, P., Et al; "Alcaloides en Especies Cubanas del Género *Croton* L. I. Estudio Químico Preliminar"; *Rev. Cub. Farm.*, (1982) 16, 39-44
38. Hernández, S. J.; Estudio Químico de Algunas Especies *Euphorbiaceae* Medicinales Mexicanas; Tesis M. en C.; (Química Orgánica); Facultad de Química UNAM; México D. F.; 1990
39. Martínez, M.; "Plantas Medicinales de México"; Botas; 6ª Ed.; 1959; 84-85
40. Knights, B.A.; "Identification of Plant Sterols Using Combined GLC/Mass Spectrometry"; *J of G.C.*, (1967), 273-282
41. Rubinstein; L., Goad L.J., Clague, A.D.H., Et al; "The 220 Mhz Spectra of Phistosterols"; *Phytochemistry*, (1976) 15, 195-200
42. Thompson, M.J. and Dutky, S.R.; "NMR Spectra of C-24 Isomeric Sterols" *Phytochemistry*, (1972) 11, 1781-1790

43. Agrawal, P.K.; "NMR Spectroscopy in the Structure Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides" *Phytochemistry*, (1992) 31, 3007-3330
44. Barton, D.H.R., Buegsthler, A.W. and Lindsey, A.S., "Sesquiterpenoids Part. V The Stereochemistry of the Tricyclic Derivates of Caryophyllene", *J. Chem. Soc.* (1954), 4659
45. Barton, D.H.R., Buegsthler, A.W. and Nickon, A.; "Sesquiterpenoids. Part. VI The Absolute Configuration of Caryophyllene"; *J Chem. Soc.* (1954), 4665
46. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., et al; "Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents"; *Planta Medica*, (1982) 45, 31-34
47. Nakanishi, K. "Infrared Absortion Spectroscopy", 2^a edition, Holden-day, Inc, San Francisco USA, 1977
48. Joseph-Nathan, P. And Díaz, T. E. "Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear", Limusa-Wilay, México, 1970
49. Silverstein, R. M. "Spectrometric Identification of Organis Compounds", John-Wiley and Sons, Inc, Canada 1991
50. Harborne, J. D. "Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techiques of Plant Analysis, 2^a, Chapman and Hall, New York USA, 1984