



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FLAVONOIDES Y TRITERPENOS DE
Cnidoscolus tehuacanensis BRECKON
(EUPHORBIACEAE).

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N :

ELIZABETH ARREDONDO RAMIREZ

MARIA GUADALUPE CASTORENA ADAME



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



11
23
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FLAVONOIDES Y TRITERPENOS DE
Cnidoscolus tehuacanensis BRECKON
(EUPHORBIACEAE).

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
ELIZABETH ARREDONDO RAMIREZ
MARIA GUADALUPE CASTORENA ADAME



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : DRA. RACHEL MATA ESSAYAG.

VOCAL: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA-MIRANDA

SECRETARIO: M. en C. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

1er. SUPLENTE: M. en C. PERLA C. CASTAÑEDA LOPEZ.

2do. SUPLENTE Q.F.B. IRMA SUSANA ROJAS TOME

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

LABORATORIO 124, DEPTO DE FARMACIA, EDIFICIO E.

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.


ELIZABETH ARREDONDO RAMIREZ.

SUSTENTANTES :


MARIA GUADALUPE CASTORENA ADAME.

ASESOR : M. en C.  MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rachel Mata por darnos la valiosa e inmerecible oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo e introducirnos de esta forma en el grandioso mundo de la investigación en los productos naturales.

A la M. en C. Ma. Adelina Jiménez Arellanes por su amistad y su esmero por conducirnos en esta tesis, para ver cristalizada una más de nuestras metas propuestas.

Al Dr. Víctor Rico del Instituto de Ecología, A.C. de Jalapa, Ver., por identificar y proporcionar el material vegetal.

Al Dr. Federico del Rfo y a la M. en C. Isabel Chavez del Instituto de Química, por el registro de los espectros de RMN.

Al Dr. Guillermo Delgado del Instituto de Química y al Dr. Rogelio Pereda Miranda de la Facultad de Química, por proporcionar muestras auténticas.

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

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por su apoyo brindado a través del Proyecto IN 206795 otorgado a los doctores Rachel Mata y Rogelio Pereda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través del convenio No. 25776P - M.

A todos nuestros compañeros y amigos del laboratorio 124: Perlita Castañeda, Ledita Gómez, Susy Rojas, Marhita Macías, Perlita Sánchez, Tere Gutiérrez, Laurita Acevedo, Claudina Villarreal, Carmen, Griselda Ríos (Griseofulvina), Isabelita Rivero, Blanca Rivero, Mirza, Fausto Rivero, Daniel Chávez, Samuel Estrada y José Luis Trejo, por su amistad, apoyo y ayuda incondicional.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme el haber concluido una de las metas que me propuse en la vida.

A MI MAMA LOLITA

Por ser quién eres y porque gracias a ti he tenido la dicha de ver concluido uno de los proyectos que me propuse gracias a tu esfuerzo para que todos nos superáramos día con día, además de darte las gracias por tu paciencia, tu amor, cariño y comprensión; por tus valiosos consejos, por tu presencia y palabras de ánimo que tuve a mi lado en el momento preciso, por esto y por mucho más y porque estarás conmigo por siempre.

A MI PAPA JORGE

Por ser una persona muy especial en mi vida, por haber estado conmigo cuando más lo necesitaba y porque sigue y seguirá estando a mi lado, gracias también por su calidez humana.

A MI PAPA EDGAR

Por todo el cariño, amor y comprensión que me has brindado desde siempre, además de darte las gracias por todo tu apoyo, tu ejemplo que me ha servido de prototipo para esforzarme por ser una persona digna de confianza, tu valor para salvar las adversidades, por tus palabras que siempre llevaré conmigo: "*güerita, saldremos adelante*", y por la mejor herencia que me puedes dejar: mi carrera.

A MIS HERMANOS: TERE, MAGDA, CARMEN, DAMIAN Y FELIPE.

Por todos los momentos compartidos y los que faltan por compartir, todos reunidos.

A MIS SOBRINITOS

Jorge Eduardo, Larissa, Gaby e Irving: por sus travesuras que me hacen reír.

A TODOS MIS TIOS Y PRIMOS DE PACHUCA, HGO.

Por tener la dicha de contar con ustedes; por los momentos tan agradables que hemos pasamos juntos y por todo el apoyo que me han brindado.

A LILI MUÑOZ

Por tu amistad, tu ayuda incondicional, tu gran calidez humana, los consejos que me diste en el momento adecuado para orientarme, por tener la virtud de escuchar a la gente.

A MI QUERIDISIMA UNIVERSIDAD Y A MI FACULTAD DE QUIMICA.

A TODAS LAS MUJERES DEL MUNDO

Porque día con día demuestran su afán de superación y competitividad.

A todos aquellos que con sus consejos me alentaron a no desistir.

Elizabeth

A LA DOCTORA RACHEL MATA DE E.

Por haber iluminado mi camino cuando todo lo veía tan oscuro y ya estando con usted, por darme la oportunidad de conocer, sobre todo, su gran calidez humana y profesionalismo. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y todos los demás.

A ADE

Por los momentos que vivimos juntas, por todo tu apoyo y toda tu aplicación para que culminará esta tesis.

A LUPITA

Porque me diste la oportunidad de compartir tu tiempo y porque el presente vale más que el pasado.

A PERLITA C.

Por la asesoría que me diste cuando la necesite, por tu amistad y sencillez.

ELIZABETH

DEDICATORIAS

Queremos expresar de manera muy especial nuestra gratitud y cariño a la M. en C. Ma. Adeline Jimenez Arellanes (ADE) por el gran apoyo y comprensión otorgados en cada uno de los momentos de nuestro trabajo porque lo hiciste tuyo también, por mostrarnos un camino ejemplar a seguir en tu persona, queremos decirte que siempre te recordaremos como alguien especialísimo que tiende su mano sin esperar recompensa alguna. Siempre rogaremos por que DIOS te colme de bendiciones.

Gracias por todo lo que has compartido con nosotras.

Lupita y Ely

DEDICATORIAS

Ante todo y sobre todo quiero darte gracias a ti SEÑOR DIOS por concederme la dicha de tu presencia incondicional en cada momento de la vida que me has dado como regalo de incalculable valor, por hacerme feliz al ser tu hija, por compartir conmigo momentos difíciles que sin TÚ amorosa compañía no hubiera superado por darme a mis amados padres y hermanos y por permitirme seguir las huellas de tus pasos a lado de cada uno de los niños en quienes te he conocido y amado profundamente y ahora realizar uno de mis más preciados sueños por todo esto y más aún.

Gracias JESUS

Ma. Guadalupe

A la Dra Rachel Mata con una dedicatoria especial pues me ha dado la oportunidad de conocer y aprender muchas cosas a su lado al permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo, y además de apreciar su gran humanidad, de antemano pido disculpas por todos los momentos que pude contrariarla. Siempre la recordaré gratamente.

Con mucho cariño e inmensa amistad te dedico esta tesis ADE pues me has brindado tu mano de amiga incondicional. Gracias por permitirme acercarme a ti para conocer en ti a una valiosa persona.

Para mis queridísimas amigas Ledita, Perlita Castañeda, Marthita y Susilyn (vecinitas), gracias por los momentos que hemos pasado juntas, por su valioso tiempo en el asesoramiento para la escritura de esta tesis y sobre todo por que creyeron en mí. Que DIOS este acompañándolas siempre y que por medio de EL estemos siempre unidas.

A mi compañera de tesis Liz por darme la oportunidad de trabajar a su lado y pasar momentos gratos.

Ma. Guadalupe.

A mi mamá Petrita por darme la dicha de ser su hija, por compartir momentos de incalculable valor, por tu paciencia y amor incondicional gracias por legarme el preciado tesoro del sabor y por gozar de esta tan anhelada meta conmigo para toda la vida serás mi amada Madre.

Espero no defraudarte nunca.

A mi papá Paulo con todo mi amor; por su apoyo de incalculable valor, por transmitirme siempre tu ánimo de superación por regalarme tu presencia y simplemente porque has trabajado conmigo para realizar este sueño común. Gracias por todo lo que me has dado.

Siempre podremos salir adelante juntos con ayuda de Dios.

A mis amadísimos hermanos: Manuel, Tere (mi segunda mamá), José Luis, Héctor, Andrés, Agustín, Paulo. Gracias por su valiosa ayuda y por todo lo que hemos compartido juntos esperando que siempre se les cumplan sus más anheladas metas y por estar unidos en la alegría de realizar este proyecto de mi vida.

A mi mamá Cuca por su inmenso amor esperando que nos cuides desde el cielo en donde estoy segura que estas. Siempre te seguiré queriendo.

Con todo mi cariño para mis queridos sobrinos: Luis Manuel, Araceli, Chayo, César, Guillermo, Adolfo, Pedro, Alfredo, Emmanuel, Marina, José Luis, Bety, Betito, Alex, Lupita, Karen, Berenice, Héctor Fernandito, Lawrita, Jessica, Stephany, Agustín Paulo (¡Bienvenido!) los quiero mucho a todos y siempre los tendré en mi corazón esperando que este pequeño trabajo sirva de motivación para la superación de cada uno de ustedes.

A mis queridas cuñadas: Martha (mi hermana), Mary, Juanita, Andrea, Jose y para Marthita Carrillo queridísima amiga por ayudarme cuando más lo necesitaba y especialmente por confiar en mí.

A mis inolvidables amigos: Lupita Cruz, Mercedes Chalé, Padre Salvador Contreras, Madre Anita por su amistad desinteresada y por el ánimo que siempre me infundieron.

Ma. Guadalupe.

CONTENIDO

	Página
Lista de Cuadros	I
Lista de Espectros	III
Lista de Figuras	VI
Lista de Esquemas	VII
Lista de Gráficas	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
I. ANTECEDENTES	
1.1. Antecedentes del género <i>Cnidoscolus</i>	2
1.2. Antecedentes fitoquímicos del género <i>Cnidoscolus</i>	4
1.3. Antecedentes de <i>Cnidoscolus tehuacanensis</i>	8
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	11
III. PARTE EXPERIMENTAL	14
1. Material Vegetal	15
2. Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar	15
3. Análisis cromatográficos	16
4. Ensayos biológicos	18
4.1. Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.	18
4.2. Determinación de la actividad alelopática del extracto, fracciones y compuestos puros.	18
5. Aislamiento y purificación de los compuestos.	20
5.1 Fraccionamiento de la fracción primaria D.	20

5.1.1 Aislamiento y purificación del Acetato del moretenol (18).	20
5.1.2 Aislamiento del moretenol (19) y β -sitosterol (20).	20
5.1.3 Obtención de los compuestos 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21) y 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22).	22
5.1.4 Aislamiento del 3,7-éter dimetilico del camperol (23)	23
5.2 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria E.	24
5.2.1 Obtención del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24)	24
5.3 Identificación del β -D-glucositolsterol (25)	24
6. Caracterización de los compuestos aislados.	26
6.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	26
6.1.1 Puntos de fusión.	26
6.1.2 Espectros de IR.	26
6.1.3 Espectros de masas.	26
6.1.4 Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .	26
6.1.5 Obtención de derivados acetilados.	26
6.1.6 Saponificación	27
6.1.7 Prueba de Liebermann-Buchard.	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	28
1. Identificación del compuesto Acetato de moretenol (18).	34
2. Identificación del compuesto moretenol (19).	37
3. Identificación de 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21).	39
4. Identificación del 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22).	44
5. Identificación del 3,7-éter dimetilico del camperol (23).	48
6. Identificación del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24).	54
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	59

VI ESPECTROS

63

VII. BIBLIOGRAFIA

93

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Secciones y distribución geográfica del género <i>Cnidoscolus</i> .	2
Cuadro 2 Actividad biológica de metabolitos secundarios aislados de <i>C. phyllacanthus</i> y <i>C. multilobus</i> .	5
Cuadro 3 Fraccionamiento primario del extracto CHCl ₃ -MeOH total de <i>Cnidoscolus tehuacanensis</i> (Breckon).	16
Cuadro 4 Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.	17
Cuadro 5 Agentes cromogénos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	17
Cuadro 6 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria D.	21
Cuadro 7 Resumen del fraccionamiento de la fracción DO-DP.	22
Cuadro 8 Resumen del fraccionamiento de la fracción terciaria DO-DP IX	23
Cuadro 9 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria E.	25
Cuadro 10 Rendimiento de los derivados acetilados.	27
Cuadro 11 Efecto del extracto, fracciones de <i>C. tehuacanensis</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	29

Cuadro 12	Efecto del extracto y fracciones de <i>C. tehuacanensis</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Echinochloa crusgalli</i> .	32
Cuadro 13	Estructuras y rendimiento de los compuestos aislados del extracto CHCl ₃ -MeOH de <i>Cnidocolus tehuacanensis</i> (Breckon).	33
Cuadro 14	Constantes espectroscópicas del acetato de moretenol (18).	36
Cuadro 15	Constantes físicas y espectroscópicas del moretenol (19).	38
Cuadro 16	Constantes espectroscópicas de 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21).	42
Cuadro 17	Constantes espectroscópicas de 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22).	46
Cuadro 18	Constantes espectroscópicas de 3,7-éter dimetilico del camperol (23).	50
Cuadro 19	Constantes espectroscópicas de 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24).	56

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1	Espectro IR del Acetato del moretenol (18)	63
Espectro 2	Espectro de RMN- ¹ H del Acetato del moretenol (18)	64
Espectro 3	Espectro de RMN- ¹³ C del Acetato del moretenol (18) Modalidad APT	65
Espectro 4	Espectro de IR comparativo del Acetato del moretenol (18)	66
Espectro 5	Espectro de IR para el moretenol (19)	67
Espectro 6	Espectro RMN- ¹ H para el moretenol (19)	68
Espectro 7	Espectro RMN- ¹³ C para el moretenol (19)	69
Espectro 7a	Espectro RMN- ¹³ C modalidad DEPT para el moretenol (19)	70
Espectro 8	Espectro IR de 7,3',4'- éter trimetillico del eriodictiol (21)	71
Espectro 9	Espectro UV de 7,3',4'- éter trimetillico del eriodictiol (21)	72
Espectro 10	Espectro de masas de 7,3',4'- éter trimetillico del eriodictiol (21)	73
Espectro 11	Espectro de RMN- ¹ H de 7,3',4'- éter trimetillico del eriodictiol (21)	74

Espectro 12	Espectro de RMN- ¹³ C de 7,3',4'- éter trimetilico del eriodictiol (21)	75
Espectro 13	Espectro IR del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	76
Espectro 14	Espectro UV del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	77
Espectro 15	Espectro de masas del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	78
Espectro 16	Espectro de RMN- ¹ H del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	79
Espectro 17	Espectro de RMN- ¹³ C del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	80
Espectro 17a	Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT del 3,7,4'-éter-trimetílico del camperol (22)	81
Espectro 18	Espectro IR del 3,7-éter-dimetílico del camperol (23)	82
Espectro 19	Espectro UV del 3,7-éter-dimetílico del camperol (23)	83
Espectro 20	Espectro de masas del 3,7-éter-dimetílico del camperol (23)	84

Espectro 21	Espectro de RMN- ¹ H del 3,7-éter-dimetílico del camperol (23)	85
Espectro 22	Espectro RMN- ¹³ C modalidad APT del 3,7-éter-dimetílico del camperol (23)	86
Espectro 23	Espectro IR del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)	87
Espectro 24	Espectro UV del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)	88
Espectro 25	Espectro RMN- ¹ H del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)	89
Espectro 26	Espectro RMN- ¹³ C del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)	90
Espectro 26a	Espectro modalidad DEPT del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)	91
Espectro 27	Espectro de RMN- ¹ H para el acetilado del compuesto (24)	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 "Mala mujer", <i>Cnidocolus tehuacanensis</i> .	9
Figura 2 Distribución geográfica de <i>Cnidocolus tehuacanensis</i> en la República Mexicana.	10
Figura 3 COSSY para el 7,3',4'-éter trimetillico del eriodictiol (21)	41
Figura 4 NOE diferencial para 5,7-éter dimetillico del camperol (23)	51
Figura 4a NOE diferencial para 5,7-éter dimetillico del camperol (23)	52
Figura 5 Posibles estructuras para el compuesto 24	57

LISTA DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1	Patrón de fragmentación de la 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21)	43
Esquema 2	Patrón de fragmentación del 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22)	47
Esquema 3	Patrón de fragmentación del 3,7-éter dimetilico del camperol (23)	53
Esquema 4	Patrón de fragmentación del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24)	58

LISTA DE GRAFICAS

		Página
Gráfica 1	Efecto del extracto y fracciones primarias sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	30
Gráfica 2	Efecto del extracto, fracciones primarias sobre el crecimiento radicular de <i>Echinochloa crusgalli</i> .	31

LISTA DE ABREVIATURAS

IX

TMS : Tetrametilsilano

CDCl₃ : Cloroformo deuterado

DMSO-d₆ : Dimetilsulfóxido hexadeuterado

Piridina-d₅ : Piridina pentadeuterada

EMIE : Espectro de masas obtenido por impacto electrónico

IR : Infrarrojo

UV : Ultravioleta

RMN-¹H : Resonancia magnética nuclear de hidrógeno

RMN-¹³C : Resonancia magnética nuclear de carbono 13

s : singulete

d : doblete

dd : doble de doble

m : multiplete

t : triplete

J : Constante de acoplamiento

MHz : Mega Hertz

Hz : Hertz

p.f. : Punto de fusión

mL : Mililitros

ppm : Partes por millón

δ : Desplazamiento químico

D₂O : Agua deuterada.

L : Litros

°C : Grados Centígrados

CIM : Concentración Inhibitoria Mínima

CL₅₀ : Concentración Letal media

COSSY : Resonancia magnética homonuclear (¹H) bidimensional (correlated spectroscopy)

HETCOR : correlación heteronuclear

KBr : Bromuro de Potasio

m/z : Relación masa/carga

Kg : Kilogramos

g : Gramos

mg : Miligramos

µg : Microgramos

cm : Centímetros

AcOEt : Acetato de etilo

MeOH : Metanol

Hex : Hexano

R_f : Factor de retención

DEPT : Distortionless enhancement by polarization transfer

NOESY : Nuclear overhauser effect spectroscopy diferencial

CHCl₃-MeOH : Cloroformo-metanólico

I.-ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES

1.1 Antecedentes del Género *Cnidoscolus*.

Aunque el género *Cnidoscolus* es frecuentemente confundido con especies del género *Jatropha*; a causa de la influencia de Mueller, quien trató al género *Cnidoscolus* como una sección precedente del género *Jatropha* este parecido ubica al género *Cnidoscolus* en la la misma subfamilia Crotonoideae según las clasificaciones generales de Pax y Hoffman (1931) y Webster (1975). Pax, en el Pflanzenreich (1910), reconoce 44 especies de *Cnidoscolus* y lo divide en seis secciones (Cuadro1), basándose principalmente en las características del androceo (Mc Vaugh, 1944). Sin embargo debido a las características de los segmentos perianteos de las flores Mueller señala que la diferencia principal para el género *Jatropha* reside en la presencia de pistilos cognados en sus flores (Breckon, 1979)

Cnidoscolus es digno de consideración como un género independiente caracterizado por la presencia de glándulas petiolares distintivas, vellosidades epidérmicas punzantes y una envoltura floral blanca (Mc Vaugh., 1944).

Cuadro 1. Secciones y distribución geográfica del género *Cnidoscolus*.

	Sección	Especies	Distribución
I	<i>Vilfoliae</i>	19	Sudamérica
II	<i>Homosae</i>		-----
III	<i>Oligandra</i>	3	Sur de Brasil
IV	<i>Platyandrae</i>	1	Cuba
V	<i>Jussieuia</i>		-----
VI	<i>Calyptriosolen</i>	21	-----

Actualmente el género *Cnidocolus* cuenta con aproximadamente 50 especies (Breckon., 1979). De estas especies *C. multilobus* es conocido popularmente como mala mujer lisa y *C. tehuacanensis* como mala mujer. Desde el punto de vista medicinal las especies de *C. stimulosus*, *C. urens* y *C. souzae* se utilizan como agentes antialérgicos, antimicrobianos y diuréticos, respectivamente (Seigler et al., 1969, Martínez., 1959, Von., 1973). Y las especies de *C. chayamansa* y *C. aconitifolius* se emplean como alimento por su contenido en proteínas y carbohidratos (Booth et al., 1992, Donkoh., 1990).

1.2 Antecedentes fitoquímicos del género *Cnidocolus*.

A la fecha se han descrito en la literatura algunas investigaciones acerca de la composición proteínica y química de algunas especies del género *Cnidocolus*.

De *C. chayamansa* y *C. aconitifolius* (Booth et al., 1992, Yeh et al., 1987, Donkoh et al., 1990) se ha determinado la composición proteica debido a que estas dos especies son muy empleadas como fuentes alimenticias por su alto contenido en carbohidratos y proteínas.

Por otro lado, los estudios fitoquímicos tendientes a determinar el contenido metabólico secundario sobre el género *Cnidocolus* son escasos. A continuación se describen los metabolitos secundarios aislados de este género.

De la raíz de *C. urens*; se aislaron e identificaron los compuestos xochitoldiona (1); isoxochitlolona (2) (Dominguez et al., 1992). En la raíz de *C. texanus*, se detectó la presencia de secáridos (Rouse et al., 1954), además se aislaron de las mismas especies los metabolitos secundarios linamarina (3), el acetato de la β -amirina (4) y la amirina (5) (Seigler et al., 1969). En las vellosidades de esta especie se detectó la presencia de serotonina (Lookadoo et al., 1991); la histamina también se aisló de las vellosidades de la especie de *C. oligandrus* (Cordeiro et al., 1983). Por otro lado se reportó la presencia de un principio cienogénico y de los ácidos linoleico, oleico, palmítoleico, palmítico, esteárico y mirístico de las semillas de *C. stimulosus* (Seigler et al., 1969).

Del látex de *C. elasticus* se han caracterizado el acetato y cinamato de lupeol (6) y (7), respectivamente (Dominguez et al., 1982) y el β -fenil propionato de lupeol (8) (Cabellero et al., 1984).

Además de la corteza de *C. phyllacanthus* se aislaron varios derivados tricíclicos del tipo benzocicloheptano (Endo et al., 1991 b), tales como el éter metílico de la favelina (9), la favelina (10) y la deoxofavelina (11). De esta misma especie, Endo y colaboradores (1991 e, 1992) aislaron derivados tetracíclicos del

ciclopropano como la favelanona (12) y un derivado tetracíclico del ciclobutano, la neofavelanona (13).

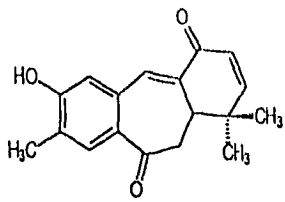
Otra especie recientemente investigada es *C. multilobus*. de la cual se aisló el acetato de moretenilo (14), el acetato de lupeol (6), el moretenol (15), la moretenona (16) y el β -sitosterol (17) (Delgado et al., 1994).

Adicionalmente a los compuestos 2, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 aislados de *C. phyllacanthus* y *C. multilobus* se les exploró su actividad biológica (citotóxica y antiinflamatoria) (Endo et al., 1991a y 1991 b, Domínguez et al., 1992 y Delgado et al., 1994), los resultados obtenidos de estas evaluaciones se citan en el Cuadro 2.

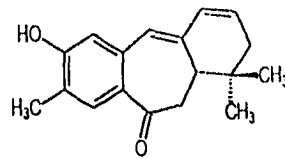
Cuadro 2. Actividad biológica de los metabolitos secundarios aislados de *C. phyllacanthus* y *C. multilobus*

Compuesto	Actividad Biológica	Referencia
Acetato de moretenilo (14)	Antiinflamatoria	Delgado et al., 1994
Moretenol (15)	Antiinflamatoria	Delgado et al., 1994
Isoxochillolona (2)	Antibacteriana (<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	Domínguez et al., 1992
Favelanona (12)	Citotóxico (Leucemia de móridos P-388)	Endo et al., 1991a
Neofavelanona (13)	Citotóxico (Leucemia de móridos P-388)	Endo et al., 1991 a
Favelina (10)	Citotóxico (Leucemia de móridos P-388)	Endo et al., 1991 b
Eter metílico de favelina (9)	Citotóxico (Leucemia de móridos P-388)	Endo et al., 1991 b
Deoxifavelina (11)	Citotóxico (Leucemia de móridos P-388)	Endo et al., 1991 b

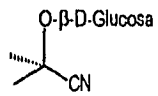
Estructuras de metabolitos secundarios aislados del género *Cnidocolus*



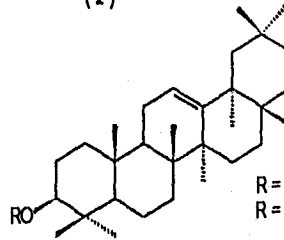
(1)



(2)

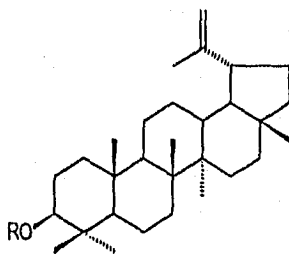


(3)



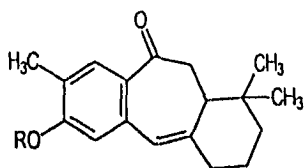
R = OAc (4)

R = H (5)

R = CH₃C(=O) (6)R = C₆H₅CH=CH-C(=O) (7)R = C₆H₅CH-C(=O) (8)

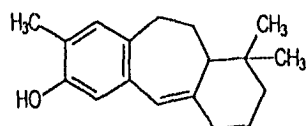
Estructuras de metabolitos secundarios aislados del género *Cnidoscolus*.

(Continuación)

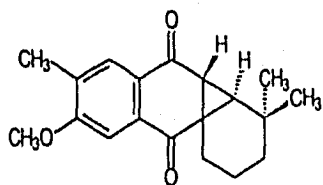


R = CH₃ (9)

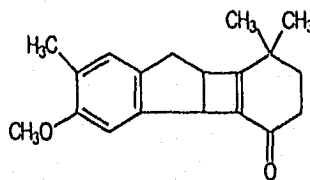
R = H (10)



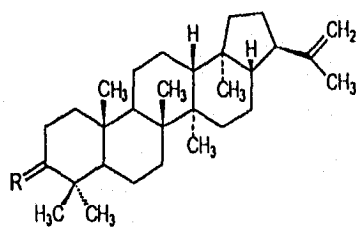
(11)



(12)



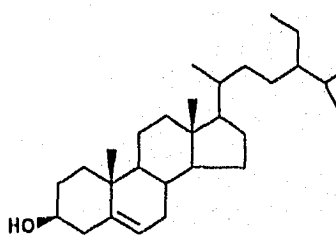
(13)



R = β-OAc / H (14)

R = O (15)

R = β-OH / H (16)



(17)

1.3 ANTECEDENTES DE *Cnidoscolus tehuacanensis*.

La especie de *Cnidoscolus tehuacanensis* Breckon, pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, en México se le conoce popularmente como mala mujer (Figura 1).

Esta especie es endémica de la República Mexicana y se distribuye en el Valle de Tehuacán (Actepec y Sierra de Zapotitlán, Puebla y Cuicatlán, Oaxaca) (Figura 2).

C. tehuacanensis es un arbusto que crece en suelos arenosos y de piedra caliza, se localiza a 750 y 1800 msnm; mide en promedio de 0.5 a 3.5 m de alto con tronco muy duro y rígido desde la base, de ramas bajas, densas y extendidas, el troco base mide de 3 a 4 cm de diámetro, sus hojas son alternas de forma ovoide y palmeada que miden 7-12 cm de ancho, sus flores son blancas pequeñas, sus frutos de forma elipsoidal de color amarillo claro y las semillas son de forma elíptica, la característica principal de esta especie es la presencia de vellosidades amarillentas abundantes tanto en la hoja como en el tallo. Esta especie florece en verano. Generalmente se le asocia con *Celtis pallida*; *Actinocheita filicina* y *Manihotoides pauciflora*.



Figura 1. "Mala mujer", *Cnidoscolus tehuacanensis*.

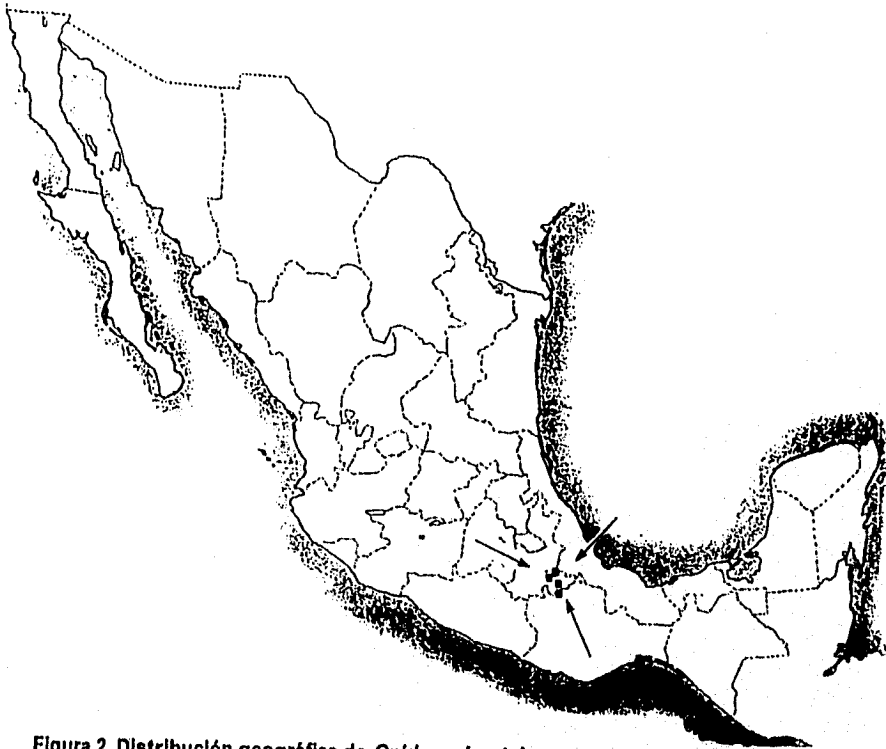


Figura 2. Distribución geográfica de *Cnidoscolus tehuacanensis* en la República Mexicana.

II.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Los resultados obtenidos en una investigación previa, conducente a la determinación de la potencialidad antimicrobiana de 30 extractos orgánicos de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana, permitieron demostrar que el extracto CHCl₃-MeOH de las partes aéreas de *Cnidoscolus tehuacanensis*, presentaba actividad específica contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*. La concentración inhibitoria mínima (MIC) del extracto fue de 400 µg/mL (Gutiérrez et al., 1996).

Con base en estos resultados y debido a que no existe ninguna investigación química y/o biológica de esta especie en la literatura, se decidió realizar el estudio químico del extracto CHCl₃-MeOH de la especie medicinal en cuestión con la finalidad de obtener los compuestos que pudieran ser potencialmente responsables de la actividad antifúngica demostrada por el extracto orgánico y de esta manera contribuir al conocimiento integral de la flora medicinal mexicana.

La obtención de metabolitos secundarios con actividad antifúngica contribuiría a la solución de uno de los problemas graves de salud pública, ya que las micosis sistémicas y superficiales en la actualidad se han incrementado enormemente debido a problemas de inmunosupresión como es el caso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), diabetes y trasplantes de órganos por tan solo mencionar unos ejemplos y los fármacos empleados para el tratamiento de estas enfermedades son poco selectivos, poco eficaces y de elevado costo.

Tomando en cuenta estos antecedentes y considerando que los extractos vegetales con propiedades biológicas demostradas constituyen fuentes valiosas de principios activos, el presente trabajo tiene como objetivos particulares:

- 1.- Recopilación de la información bibliográfica necesaria acerca de los aspectos biológicos, etnobotánicos y taxonómicos de *Cnidoscolus tehuacanensis* Breckon.
- 2.- Efectuar las operaciones preliminares como son la recolección del material vegetal, desecación y fragmentación.

- 3.- Preparar el extracto orgánico de la planta (partes aéreas) vía maceración, de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlo mediante los métodos cromatográficos adecuados.
- 4.- Separar y purificar el mayor número de constituyentes posibles a partir de las diferentes fracciones obtenidas.
- 5.- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los productos aislados.
- 6.- Determinar el efecto del extracto, fracciones así como de algunos de los compuestos puros aislados sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus* con la finalidad de buscar metabolitos secundarios con posible actividad herbicida.
- 7.- Determinar la toxicidad del extracto, de las fracciones y de los compuestos aislados para las larvas del crustáceo *Artemia salina* Leach.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

1.- Material Vegetal

El material vegetal (partes aéreas) de *Cnidocolus tehuacanensis* Breckon se recolectó 5 Km al Sur de Zapotillán, Puebla, en Diciembre de 1993 y fue identificada por el Dr. Victor Rico del instituto de Ecología, AC., Jalapa Ver. Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario del Instituto de Ecología, en Jalapa, Veracruz con Voucher J.A Zavala 63-XAL. La planta se secó a temperatura ambiente y pulverizó en un molino de cuchillas, modelo Willey. 4.

2.- Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar.

El material vegetal seco y molido (2.6 Kg) se extrajo cuatro veces, con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (volumen total de 28.5 L), dejando entre cada extracción un período de 48 hrs, al cabo de este tiempo los extractos resultantes se filtraron y concentraron al vacío, obteniéndose 186.65 g. El residuo resultante, se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (1.3 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, cloroformo-metanol y metanol, en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 92 fracciones de 500 mL cada una, combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares.

En el Cuadro 3 se resumen los sistemas de elución empleados y los grupos de fracciones obtenidas.

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto CHCl_3 -MeOH total de *Cnidocolus tehuacanensis*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-13	1 - 11	A	5.09
	80:20	14 - 19	12 - 13	B	3.9
Hex- CHCl_3	60:40	20 - 31	14 - 16	C	5.35
	40:60	32 - 36	17 - 42	D	87.62
CHCl_3	100	37 - 42	43 - 51	E	25.17
CHCl_3 -MeOH	99:1	43 - 47	52 - 56	F	23.59
	95:5	48 - 56			
	90:10	57 - 64	57 - 61	G	12.56
	80:20	65 - 73	62 - 67	H	14.08
	70:30	74 - 79	68 - 80	I	7.81
	60:40	80 - 85	81 - 92	J	6.48
	50:50	86 - 91			
MeOH	100	92			

3.- Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio y aluminio recubiertas de gel de sílice (60 GF 254 Merck), así como varios sistemas eluyentes y diferentes agentes cromógenos. (Cuadros 4 y 5)

Cuadro 4. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
I	Hex / CHCl ₃	Diversas
II	CHCl ₃ / MeOH	Diversas
III	CHCl ₃	100%
IV	MeOH	100%

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico	12 g de sulfato cérico. 22.2 mL de H ₂ SO ₄ 350 g de hielo picado.	Stahl, 1969
H ₂ SO ₄ (10 %)	10 mL de H ₂ SO ₄ concentrado 90 mL de H ₂ O destilada	Stahl, 1969
Tricloruro de aluminio (AlCl ₃) 5 % eq.	5.0 g de tricloruro de aluminio 100 mL de agua	Wannan, 1985

* En todos los casos para el desarrollo de color fue necesario calentar aproximadamente 2 minutos a 110 ° C.

4. Ensayos Biológicos

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

Este ensayo biológico se realizó usando huevecillos de *Artemia salina* Leach, empleando el método descrito por Meyer y colaboradores (1982).

Desarrollo de las larvas: Los huevecillos de *Artemia salina* se incubaron en salmuera por 48 horas. Con la finalidad de proporcionar a las larvas un desarrollo adecuado para realizar el ensayo.

Preparación de la muestra: Se pesaron 20 mg del extracto, fracción y/o compuesto a evaluar y se disolvieron en 2 mL del solvente apropiado. De la solución patrón se transfirieron 500, 50 y 5 μ L a 3 frascos viales y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente o al vacío. Cada concentración se preparó por triplicado.

Bioensayo: Se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los viales que contenían las muestras a evaluar, se aforó a 5 mL con salmuera, obteniéndose concentraciones finales de 1000, 100 y 10 μ g/mL. Los frascos viales conteniendo las artemias se mantuvieron con iluminación artificial durante 24 hrs., transcurrido este tiempo se procedió a contar el número total de crustáceos sobrevivientes para calcular la CL_{50} ó el porcentaje de mortalidad. Para el primer caso se utiliza el programa de análisis de probabilidad de Finney.

Cabe mencionar que para considerar a un extracto o fracción activos, la CL_{50} debe ser menor a 1000 μ g/mL y para el caso de un compuesto puro la CL_{50} debe ser menor a 200 μ g/mL (Anderson et al., 1991).

4.2 Determinación de la actividad alelopática del extracto y fracciones.

La actividad fitoinhibidora de los extractos y fracciones se realizó midiendo el efecto de estos sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Los bioensayos se realizaron siguiendo la metodología descrita por Anaya et al., 1990. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en un solvente orgánico adecuado, preparándose soluciones a dos diferentes concentraciones

(500 y 50 ppm), 4mL de las muestras a evaluar se vertieron en cajas Petri conteniendo un disco de papel filtro (Walman No 1), el solvente se dejó evaporar al vacío o a temperatura ambiente. Posteriormente, se pusieron a germinar 10 semillas de las 2 especies vegetales de prueba, escogidas al azar, humedeciendo previamente el papel filtro con 4 mL de agua destilada. Se hizo el mismo procedimiento para los controles los cuales contenían únicamente solvente. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas a las 24 hrs para la especie *Amaranthus hypochondriacus* y 48 hrs para *Echinochloa crusgalli*. Se efectuaron 4 réplicas, para todos los casos.

5. Aislamiento y purificación de los compuestos

5.1 Fraccionamiento de la fracción primaria D.

La fracción primaria D (87.6 g) (Ver Cuadro 3), se recromatografió en una columna abierta, utilizándose como adsorbente 897 g de gel de sílice (gránulos de 0.063- 0.2 mm), el proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-CHCl₃, CHCl₃-MeOH y MeOH (diferentes proporciones). Se colectaron un total de 196 fracciones de 500 mL cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares.

5.1.1 Aislamiento y purificación del Acetato de moretenol (18)

De las fracciones secundarias (DJ y DK, 86.7 g), se obtuvieron 15.0 g del compuesto **18** el cual precipitó como un polvo blanco con punto de fusión de 200-204 °C.

5.1.2 Aislamiento del moretenol (19) y β-sitosterol (20).

20 g de las fracciones secundarias DO-DP (Cuadro 6) fueron recromatografiadas en una columna abierta, utilizándose como adsorbente 200.4 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con hexano-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-MeOH y MeOH (diferentes proporciones) (Cuadro 7).

Se colectaron un total de 124 fracciones de 70 mL cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron similitud cromatográfica.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria D.

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Clave
Hexano	100	1-24	1 - 6	DA
			7 - 9	DB
			10 - 11	DC
			12	DD
			13 - 20	DE
			21 - 25	DF
			25 - 26	DG
Hex-CHCl ₃	90:10	25 - 55	27 - 41	DH
			42 - 62	DI
	85:15	56 - 68	63 - 69	DJ
	80:20	69 - 100	70 - 101	DK
	70:30	101 - 111	102 - 116	DL
	60:40	112 - 128	117	DM
			118 - 122	DN
			123 - 136	DO
	55:45	129 - 141	137 - 146	DP
	50:50	142 - 151	147 - 150	DQ
	40:60	152 - 157	151 - 167	DR
30:70	158 - 167	168 - 175	DS	
CHCl ₃	100	168 - 176	176 - 178	DT
CHCl ₃ -MeOH	80:20	177 - 187	179 - 186	DU
			187 - 189	DV
	50:50	188 - 192	190 - 193	DW
MeOH	100	193 - 196	194 - 196	DX

De las fracciones terciarias DO y DP III-VII (Ver Cuadro 7), eluidas con mezcla hexano-CHCl₃ (diferentes proporciones) se aislaron y purificaron 460 mg del compuesto **19** el cual se obtuvo como un polvo blanco de punto de fusión 159-161°C. De manera adicional el compuesto **20** cristalizó de las fracciones terciarias DO -DP VII-VIII (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento de la fracción DO y DP.

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Clave
Hex-CHCl ₃	98:2	1-7	1-16	DO-DP I
	95:5	8-14	17-24	DO-DP II
	80:20	15-20	25-29	DO-DP III
	65:35	21-31	30-34	DO-DP IV
	55:45	32-82	35-81	DO-DP V
	50:50	83-93	82-90	DO-DP VI
	40:60	94-102	91-102	DO-DP VII
	20:80	103-113	103-120	DO-DP VIII
CHCl ₃	100	114-119	121-124	DO-DP IX
CHCl ₃ -MeOH	50:50	120-124		

5.1.3 Obtención de los compuestos 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21) y 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22).

5.0 g de la fracción terciaria DO-DP IX (Cuadro 7) fueron recromatografiados sobre una columna abierta empacada con 189 g de gel de sílice (tamaño de partícula 0.063-0.2 mm). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-CHCl₃, CHCl₃ y CHCl₃-MeOH y MeOH en diferentes proporciones. Como resultado de este proceso cromatográfico se obtuvieron 164 fracciones de 200 mL cada una, combinándose aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar. El Cuadro 8 resume el fraccionamiento de la fracción terciaria DO-DP IX.

La fracción f (88 mg) (Cuadro 8), se obtuvo al eluir la columna con CHCl₃-hexano (90:10), se decoloró con carbón activado y posteriormente se realizaron sucesivas cromatografías preparativas en capa fina empleando como sistema de elución hexano-AcOEt (65:35), dicho proceso permitió el aislamiento y purificación de 28.4 mg del compuesto 21 bajo la forma de unos cristales

blancos opacos en forma de agujas con un punto de fusión de 165 - 166 °C y 44 mg del compuesto 22 bajo la forma de agujas amarillas opacas con un punto de fusión de 150 - 152 °C.

5.1.4 Aislamiento del 3,7-éter dimetilico del camperol (23) de la fracción secundaria DS.

De la fracción secundaria DS obtenida al eluir la columna con una mezcla de CHCl₃-hexano (70:30) (Cuadro 6), cristalizó un polvo de color amarillo canario, obteniéndose 130 mg del compuesto 23 con un punto de fusión de 243 - 245 °C.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento de la fracción terciaria DO-DP IX.

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	1 - 22	1 - 69	a
	90:10	23 - 37		
	85:15	38 - 50		
	75:25	51 - 64		
Hexano- CHCl ₃	60:40	65 - 75	70 - 94	b
	50:50	76 - 88		
	30:70	89 - 111	95 - 98	c
	25:75	112 - 119	99 - 120	d
	20:80	120 - 142	121 - 122	e
	10:90	143 - 150	123 - 135	f
CHCl ₃	100	151 - 156	138 - 156	g
CHCl ₃ - MeOH	80:20	157 - 162	157	h
	50:50	163 - 184	158 - 163	i

5.2 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria E.

5.2.1 Obtención del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24).

25.17 g de la fracción primaria E (Cuadro 3) fué sometida a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta usando como adsorbente sílica gel (503.34 g). La elución se efectuó con hexano, CHCl_3 - MeOH y MeOH en diferentes proporciones. Se recolectaron 154 fracciones de un volumen de 250 mL, éstas se compararon por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que presentaron similitud cromatográfica.

De la fracción secundaria E-14 (Cuadro 9) la cual fue eluida en MeOH 100 % precipitaron de manera espontánea 106 mg del compuesto 24 en forma de cristales de color amarillo pálido, con punto de fusión $> 250^\circ\text{C}$, solubles en MeOH.

Por otro lado de las fracciones secundarias E-3 y E-4 (Cuadro 8) precipitaron de manera espontánea cristales de color blanco. La purificación del mismo se efectuó mediante cromatografía preparativa (empleando placas de sílica gel de 20 X 20 cm y 0.25 mm de espesor) utilizando como sistema de elución hexano- CHCl_3 (60:40), obteniéndose 31.6 mg del compuesto 18, el cual fue previamente aislado de la fracción primaria D como un compuesto mayoritario.

5.3 Identificación del β -D-glucositolsterol (25).

En la fracción primaria G (Cuadro 3) se detectó la presencia de β -D-glucositolsterol como compuesto mayoritario por comparación cromatográfica con una muestra auténtica.

Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria E.

Eluyente	Proporción (%)	Fraciones	Fraciones combinadas	Clave	
Hexano	100	1 - 19	1 - 35		
	90:10	20 - 33	36 - 40		
	80:20	34 - 44	41 - 44		
Hex-CHCl ₃	60:40	45 - 63	45	E-1	
	50:50	64 - 77	46 - 48	E-2	
	40:60	78 - 96	49 - 57	E-3	
CHCl ₃	100	97 - 114	58 - 62	E-4	
			63 - 68	E-5	
CHCl ₃ -MeOH	90:10	115 - 118	69 - 75	E-6	
			70-30	76 - 79	E-7
			50-50	80	E-8
				81 - 83	E-9
				84-95	E-10
				96 - 97	E-11
				98 - 99	E-12
MeOH	100	153 - 154	100 - 107	E-13	
			108 - 114	E-14	
			115 - 119	E-15	
			120 - 154	E-16	

6. Caracterización de los compuestos aislados.

6.1 Determinación de las Constantes Físicas, Espectroscópicas y Espectrométricas.

6.1.1 Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

6.1.2 Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de Perkin - Eimer, modelo 599, en pastilla de KBr.

6.1.3 Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlett-Packard 5890, serie II. El voltaje para el registro de los espectros de masas fue de 70 V.

6.1.4 Los espectros de RMN-¹H; RMN-¹³C se registraron en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente CDCl₃ y piridina-d₅ y como referencia interna TMS. Estos últimos y los espectros de masas se determinaron en el Instituto de Química de la UNAM.

6.1.5 Obtención de derivados acetilados.

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos **21** y **24** se utilizó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. En los dos casos la mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 hrs o más tiempo y al término de este, los productos acetilados fueron separados de la manera convencional (Shriner et al., 1986). En el Cuadro 10 se citan los compuestos acetilados, así como su rendimiento y punto de fusión.

Cuadro 10. Rendimiento de derivados acetilados.

Compuesto	Peso del compuesto (mg)	Peso del derivado acetilado (mg)	Punto de fusión (°C)
(21)	5	2	108 -110
(24)	37.3	17.3	146 -149

6.1.6 Saponificación.

A 18 mg del compuesto **18** se le agregaron 5 mL de metanol y 1 mL de KOH al 50 % metanólico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por un tiempo de 15 hrs.

Al cabo de este tiempo, se adicionaron 2 mL de HCl 1N y posteriormente se llevó a cabo una partición con CHCl_3 (tres veces, con 5 mL cada una); la combinación de los extractos orgánicos obtenidos se evaporaron a sequedad al vacío para obtener 20 mg de un producto sólido constituido por una mezcla de moretenol y otro constituyente.

6.1.7 Prueba de Liebermann-Buchard para triterpenos y esteroides.

A 1 mg de los compuestos **18** y **19** contenidos en un tubo de ensayo respectivamente se adicionaron 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de CHCl_3 . Posteriormente se adicionó por las paredes del tubo de ensayo sumergido en hielo una gota de ácido sulfúrico y se observó la formación de un anillo pardo rojizo en la interfase que indicó prueba positiva para este ensayo.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Al extracto CHCl_3 -MeOH y fracciones primarias D y E de *C. tehuacanensis* se les determinó la actividad alelopática, esta evaluación se realizó midiendo el efecto del extracto y fracciones sobre el crecimiento radicular en dos especies de malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* a las concentraciones de 50 ppm y 500 ppm, respectivamente. Los resultados de estas evaluaciones biológicas no fueron significativas a las concentraciones evaluadas. Los datos obtenidos se muestran en los Cuadros 11 y 12. (Gráficas 1 y 2).

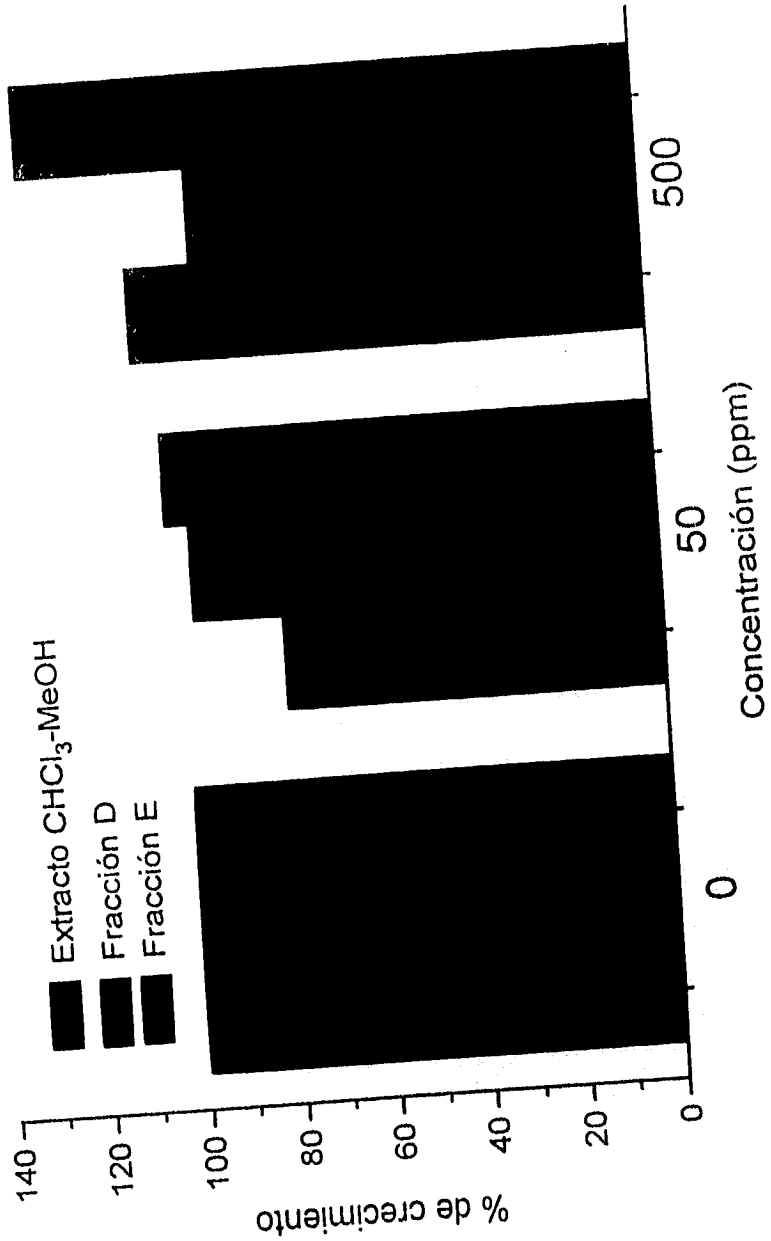
Adicionalmente se le determinó la toxicidad contra el crustáceo de *Artemia salina* Leach. Los resultados no fueron significativos ya que los valores de LC_{50} determinados para el extracto y las fracciones evaluadas fueron > 1000 ppm.

Cuadro 11. Efecto del extracto y fracciones de *C. tehuacanensis* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*

Muestra	Tratamiento	% Crecimiento
Exto CHCl_3 -MeOH	Control	100
	50 ppm	79.56
	500 ppm	108.39*
Fracción primaria D	Control	100
	50 ppm	98.2
	500 ppm	94.7
Fracción primaria E	Control	100
	50 ppm	103.32*
	500 ppm	130*

* Inducen estimulación en el crecimiento radicular.

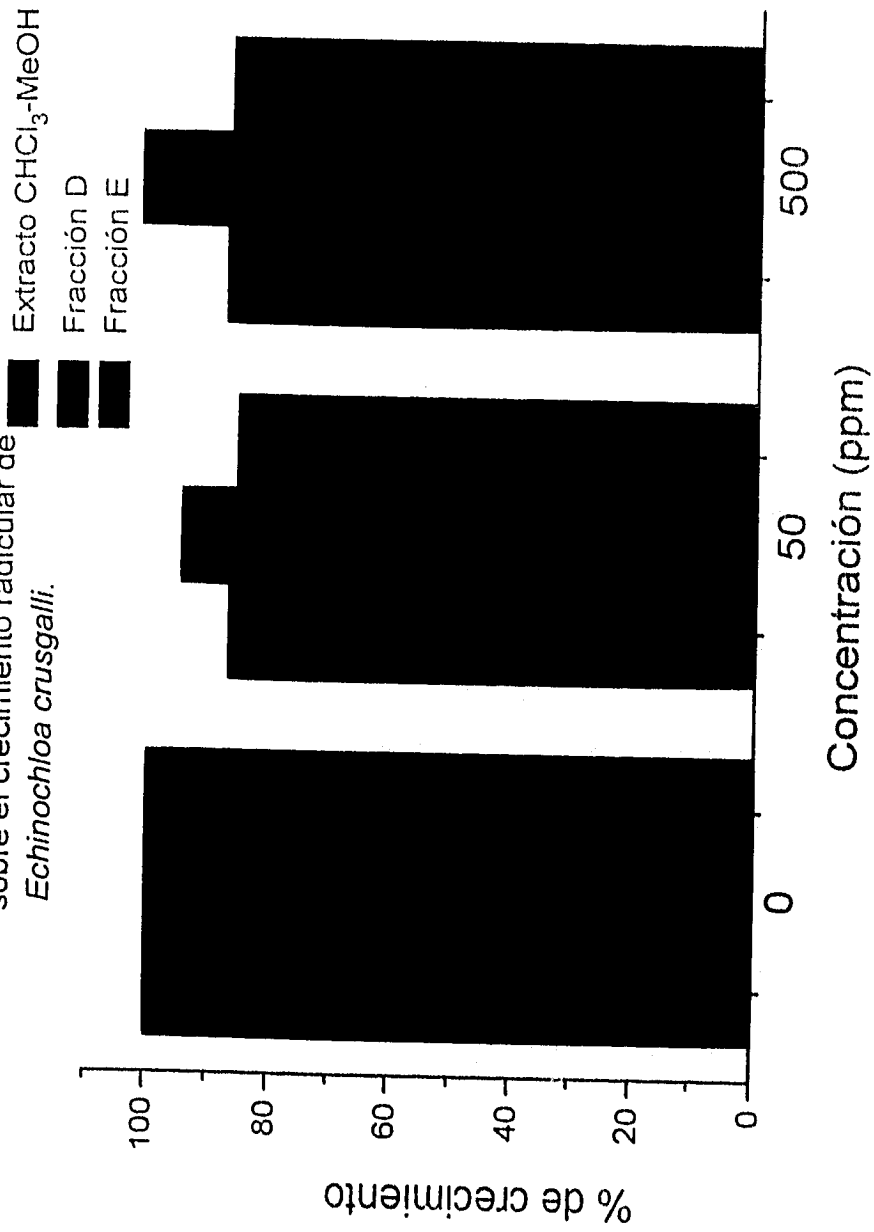
Gráfica 1.- Efecto del extracto y fracciones primarias sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*.



Gráfica 2.- Efecto del extracto, fracciones primarias

sobre el crecimiento radicular de

Echinochloa crusgalli.



Cuadro 12. Efecto del extracto y fracciones *C. tehuacanensis* sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*.

Muestra	Tratamiento	% Crecimiento
Exto. CHCl ₃ -MeOH	Control	100
	50 ppm	87.01
	500 ppm	88
Fracción primaria D	Control	100
	50 ppm	94.67
	500 ppm	101.83*
Fracción primaria E	Control	100
	50 ppm	85.85
	500ppm	87.41

* Inducen estimulación en el crecimiento radicular

De acuerdo a estos resultados se decidió realizar el estudio fitoquímico convencional del extracto de las partes aéreas de *C. tehuacanensis*, con la finalidad de obtener los principios responsables de la actividad antifúngica ya que el extracto orgánico mostró actividad específica contra el hongo *Trychophyton mentagrophytes* en una investigación previamente realizada en el extracto orgánico (Gutiérrez et al., 1996).

El fraccionamiento del extracto CHCl₃-MeOH permitió la obtención de 10 fracciones primarias (sección experimental, Cuadro 3); de donde se aislaron cuatro flavonoides [(7,3',4'- éter trimetillico del eriodictiol (21), 3,7,4'-éter trimetillico del camperol (22), 3,7- éter dimetillico del camperol (23), 3,5,7- éter trimetillico del camperol (24)], 2 triterpenoides [(acetato de moretenol (18) y moretenol (19)); y 2 esteroides [(β-sitosterol (20) y β-D-glucositolsterol (25)]. De manera general los compuestos aislados fueron identificados y caracterizados mediante sus características físicas, espectroscópicas y espectrométricas. En el Cuadro 13 se

resumen las estructuras y los rendimientos de los compuestos aislados en relación a planta seca.

Cuadro 13. Estructuras y rendimiento de los compuestos aislados del extracto CHCl_3 -MeOH de *Cnidioscolus tehuacanensis* Breckon.

Compuesto	Estructura	Peso (g)	% en Relación a la planta seca
3,7-éter dimetilico del camperol (23)		0.13	0.005
3,5,7-éter trimetilico del camperol (24)		0.106	0.0040
7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21)		0.034	0.0013
3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22)		0.06	0.0023
acetato de moretenol (18)		15.0	0.576
moretenol (19)		0.460	0.0177

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

1. Identificación del compuesto Acetato de moretenol (18).

El producto 18 se aisló al recromatografiar la fracción primaria D (Ver Parte experimental; Cuadro 6). Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión 200-204°C. Su fórmula molecular se estableció como $C_{32}H_{52}O_2$ por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C (Cuadro 14).

El espectro de IR (Cuadro 14, Espectro 1) presentó bandas de absorción características para el enlace C-H (2940 y 1244 cm^{-1}), metilos geminales (1374 cm^{-1}), carbonilo de éster (1736 cm^{-1}) y para metileno olefínico terminal (1640 y 882 cm^{-1}).

El espectro de RMN- 1H presentó un perfil típico de un triterpenoide de tipo hopano (Mahato y Kundu, 1994) y a continuación se describe, el análisis de este espectro (Cuadro 14, Espectro 2):

- a) En la zona comprendida entre δ 0.76 -1.66 se observaron siete singuletes atribuibles a siete grupos metilos los cuales debían estar unidos a carbonos cuaternarios; una de estas señales debía corresponder a un metilo sobre doble ligadura de acuerdo al desplazamiento químico que presentaba (δ 1.66).
- b) En δ 2.01 se observó un singulete característico para un grupo acetato.
- c) Adicionalmente, se observa un doblete dobleteado ($J = 7.7$ y 11 Hz) en δ 4.49 asignable al protón geminal de una función éster.

El éster se ubicó en la posición tres con base en consideraciones biogénicas. El patrón de acoplamiento indicaba la disposición β del grupo éster.

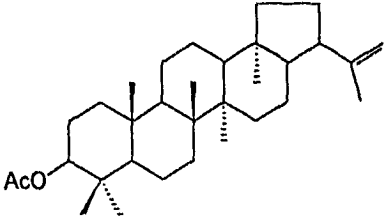
- d) Finalmente, se observó la presencia de un sistema AB (δ 4.68, d, $J = 2.3$ Hz; δ 5.8 Hz, d, $J = 2.3$ Hz), que integraba para dos protones correspondientes a los hidrógenos olefínicos de un metileno terminal.

El espectro de RMN- ^{13}C modalidad APT (Espectro 3) mostró 18 señales negativas de las cuales once debían corresponder a once metilenos (δ 37.81, δ 23.71, δ 18.21, δ 34.26, δ 25.16, δ 27.47, δ 35.58, δ 20.96, δ 40.00, δ 29.86)

presentes en la molécula y las siete señales restantes debían corresponder a siete carbonos cuaternarios (δ 38.43, 37.12, 40.89, 42.98, 42.86, 50.80, 170.87); además se observaron 14 señales positivas (δ 16.13, 17.98, 19.27, 21.21, 27.94, 38.11, 47.99, 48.35, 50.39, 55.44, 80.98), ocho de estas señales debían corresponder a los grupos metilos evidenciados en el espectro de RMN-¹H y seis a los metinos presentes de la molécula (C-3, C-5, C-9, C-13, C-17, C-21).

Las características espectroscópicas antes mencionadas y la comparación de las mismas con las de una muestra auténtica de acetato de moretenol (Ver Espectro 4) obtenida de *Cnidocolus multilobus*, permitieron identificar al compuesto como acetato de moretenol (Delgado et al., 1994, Chawla et al., 1991). Es importante mencionar que se ha descrito en la literatura que este compuesto presenta actividad antiinflamatoria (Chawla et al., 1991).

Cuadro 14. Constantes espectroscópicas del Acetato de moretenol (18).

	
IR $V_{m\acute{a}x}$ (KBr) cm^{-1} (Espectro 1)	2940, 2867, 1736, 1640, 1374, 1244 y 882.
RMN-1H δ ($CDCl_3$) (Espectro 2)	4.49 (dd, H-3, J = 11 y 7.7 Hz) 4.68 (d, H-29, J = 2.4 Hz), 4.55 (d, H-29', J = 5.8 Hz) 2.01 (s, CH_3CO), 1.66 (s, CH_3), 1.37 (s, CH_3), 1.01 (s, CH_3), 0.92 (s, CH_3), 0.83 (s, CH_3), 0.81 (s, CH_3) 0.76 (s, CH_3).
RMN-^{13}C ($CDCl_3$) (Modalidad APT) (Espectro 3)	170.87 (CO), 150.88 (C-22), 109.29 (C-29), 80.98 (C-3), 55.44 (C-5), 55.44 (C-17), 50.39 (C-9), 48.35 (C-13), 47.99 (C-21), 42.98 (C-14), 42.86 (C-18), 40.89 (C-8), 40.00 (C-19), 38.43 (C-4), 37.81 (C-1), 37.12 (C-20), 27.94 (C-23), 27.47 (C-12), 25.16 (C-11), 23.71 (C-2), 21.21 ($COCH_3$), 20.96 (C-16), 19.27 (C-26), 18.21 (C-6), 17.98 (C-24), 16.13 (C-25).

2.- Identificación del moretenol (19).

El compuesto 19 se aisló al recromatografiar la fracción secundaria DO y DP (Ver parte experimental, Cuadro 7). Este producto se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión 198-200°C. Su fórmula molecular se estableció como $C_{30}H_{50}O$, por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C . Las constantes físicas y espectroscópicas del producto se resumen en el Cuadro 15. El compuesto reaccionó en forma positiva frente al reactivo de Liebermann-Burchard. Su espectro de IR (Cuadro 15, Espectro 5) presentó bandas de absorción características para OH (3378 y 3247 cm^{-1}), C-H saturado (2922, 2852 y 1456 cm^{-1}), grupo metilo geminal (1380 cm^{-1}) y grupo metileno terminal (1650 y 882 cm^{-1}). Los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C mostraron el perfil típico de un triterpenoide y fueron muy similares a los del compuesto 18. Las principales diferencias fueron las siguientes:

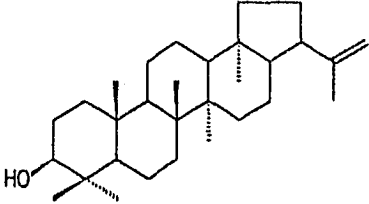
a) En δ 3.19 se observó un doblete dobleteado, con constante de acoplamiento de 16.2 y 5.1 Hz que integraba para un protón, esta señal se asignó al hidrógeno unido al carbono de la función carbinólica (C-3).

b) En el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 7) se observó una señal en δ 79.03 correspondiente al metino en C-3.

Estas características espectroscópicas (IR, RMN- 1H , RMN- ^{13}C) y consideraciones de tipo quimiotaxonómicas nos permitieron identificar al compuesto como el moretenol, este compuesto ha sido aislado de *C. multilobus* (*Euphorbiaceae*) (Delgado et al., 1994) y en *Pluchea lanceolata* (*Compositae*) (Chawla et al., 1991).

Es importante mencionar que se realizó c.c.f comparativa de este compuesto con el producto obtenido de saponificación del acetato de moretenol (18), observándose que ambos presentaban el mismo valor de Rf.

Cuadro 15. Constantes espectroscópicas del moretenol (19).

	
IR V_{máx} (KBr) cm⁻¹ (Espectro 5)	3378, 3247, 2922, 2852, 1680, 1640, 1564, 1466, 1380, 882.
RMN-¹H δ (CDCl₃) (Espectro 6)	3.19 (dd, H-3, J = 16.2 Hz y 5.1 Hz), 1.67 (s, C=C-CH ₃), 1.25 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), y 0.78 (s, 3H), 4.68 (d, 1H, H ₂₉ J = 2.4 Hz); 4.56 (dd 1H, H ₂₉ J = 1.5 Hz y 4.2 Hz).
RMN-¹³C δ (CDCl₃) (Espectro 7)	170 (CO), 150.88 (C-22), 109.70 (C-29), 79.0 (C-3), 55.28 (C-5), 50.42 (C-9), 48.26 (C-13), 47.99 (C-17), 39.01 (C-21), 42.98 (C-14), 42.86 (C-18), 40.89 (C-8), 40.00 (C-19), 38.86 (C-4), 37.81 (C-1), 37.12 (C-10), 35.57 (C-15), 34.74 (C-7), 29.70 (C-20), 27.85 (C-23), 27.42 (C-12), 25.11 (C-11), 23.71 (C-2), 20.93 (C-16), 19.27 (C-26), 18.21 (C-6), 17.98 (C-24), 16.13 (C-25).

3. Identificación del 7,3',4'-éter trimetillico del eriodictiol (21).

El fraccionamiento en columna abierta de la fracción DO-DP (Ver parte experimental, Cuadro 6), permitió obtener la fracción DO-DP IX, la cual se sometió a una cromatografía nuevamente en una columna abierta de gel de sílice, de donde se obtuvo la fracción f. Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción f (Ver parte experimental, Cuadro 8), permitieron el aislamiento del compuesto 21, como agujas de color blanco con un punto de fusión de 165-166°C. Las constantes espectrométricas y espectroscópicas utilizadas para su identificación se resumen en el Cuadro 16. La fórmula molecular del producto natural se estableció como $C_{16}H_{18}O_6$ por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C . Su espectro de IR (Espectro 8) presentó señales para hidroxilo (3458 cm^{-1}), C-H (2942 cm^{-1}), C=O de γ -pirona (1658 cm^{-1}) y anillo aromático (1598 cm^{-1}).

Los espectros de UV, EM, RMN- 1H y RMN- ^{13}C (Espectros 9,10, 11 y 12), permitieron proponer que el producto natural era el 7,3',4'-éter trimetillico del eriodictiol (21). Las observaciones más importantes que sustentaron esta propuesta fueron las siguientes:

a) La presencia en el espectro de RMN- 1H (Espectro 11) de las señales en δ 5.4 (dd, $J = 12.90$ y 3.0 Hz.), 3.14 (dd, $J = 17.25$, 12.9 Hz) y 2.80 (dd, $J = 17.5$, 3.1 Hz), las cuales debían corresponder a un sistema ABX. Adicionalmente es importante mencionar que en el experimento COSSY (Figura 3) se observó una clara correlación entre el conjunto de señales recién descritas.

En el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 12) las señales asignables a C-2 y C-3 se observaron en δ_c 78.5 y 43.5, respectivamente (Harborne et al., 1975).

b) En ambos espectros de RMN (Espectros 11 y 12) se observó la presencia de tres grupos metoxilo (δ_H 3.81, 3.90 y 3.92 y δ_c 56.0, 56.0, 55.6) los cuales debían corresponder a los metoxilos ubicados en C-3', C-4' y C-7.

c) También se observó en el espectro de RMN-¹H entre δ 6.88-6.99 las señales para un sistema ABX que integraba para tres protones. Estas señales fueron asignadas a los hidrógenos 2', 5' y 6' del anillo B. Los fragmentos en m/z 151 y 164 (Esquema 1) presentes en el espectro de masas, confirmaron que la flavanona tenía el anillo B disustituido con dos grupos metoxilos. Es importante hacer notar que el fragmento m/z 151 representa uno de los iones diagnóstico para la identificación de una flavanona disustituida en el anillo B (Harborne et al., 1986). Adicionalmente en este espectro se observaron dos dobletes ($J = 2.1$) centrados en δ 6.09 correspondientes a un sistema AB. Estas señales eran asignables a los H-6 y H-8 del anillo A los cuales de acuerdo al desplazamiento químico debían encontrarse entre dos funciones oxigenadas. El fragmento m/z 167 (Esquema 1) observado en el espectro de masas y que se genera por una ruptura de tipo Retro Diels-Alder era consistente con la presencia de dos grupos oxigenados en el anillo A; uno de ellos correspondió a uno de los metoxilo evidenciado claramente en el espectro de RMN-¹H y de un grupo hidroxilo el cual debía encontrarse en C-5. El argumento más importante para ubicar este último grupo fue la presencia de un singulete en δ 12.02, la cual es diagnóstica para un hidroxilo en C-5 quelatado con el grupo carbonilo en C-4.

Con base en el análisis anterior la estructura del compuesto **21** se estableció como la 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona ó 7,3',4' éter trimetillico del eriodictiol. Este compuesto se ha descrito como un derivado sintético de la ciclización de 2',6'-dihidroxichalcona (Miles y Main, 1989) y además ha sido aislada previamente de *Notholaena limitanea* variedad mexicana (Wollenweber et al., 1980).

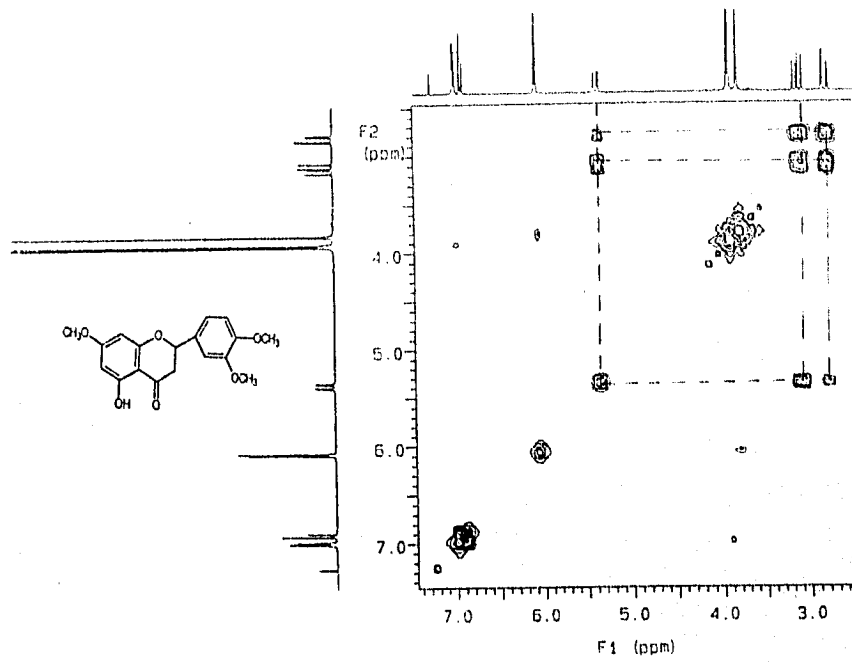
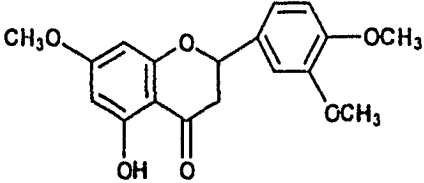
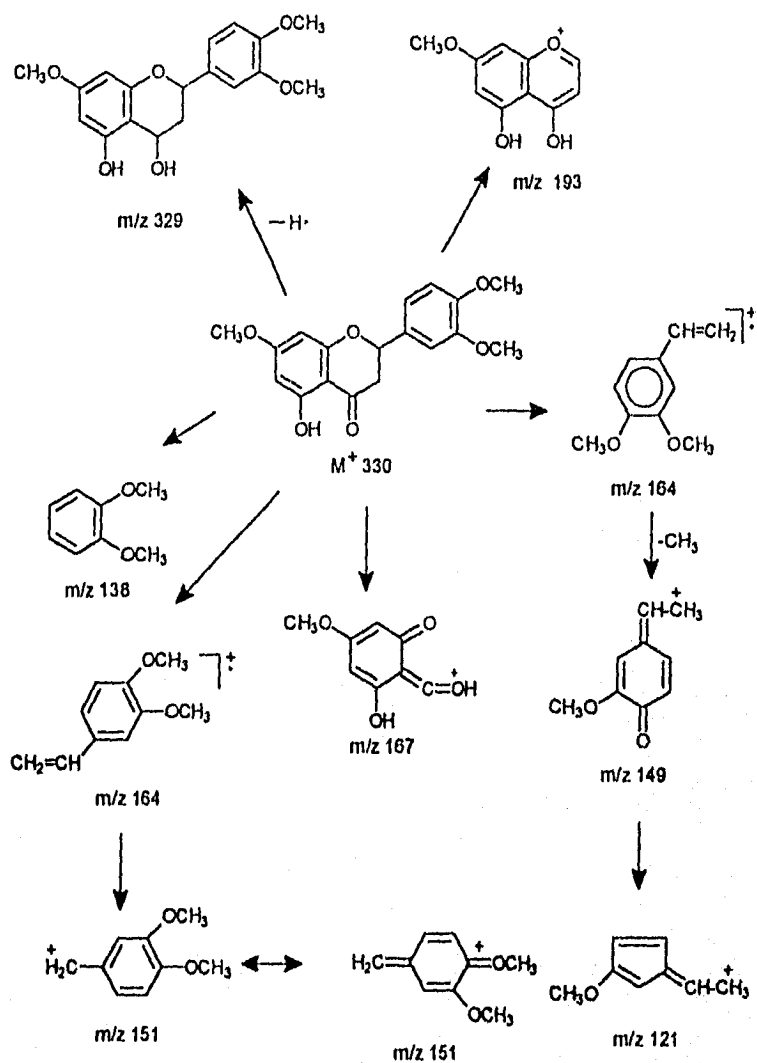


Figura 3. COSY para 5-hidroxi - 7,3',4' - trimetoxiflavanona (21)

Cuadro 16. Constantes espectroscópicas del 7,3',4'-éter trimetilico del eriodictiol (21).

	
IR Vmax (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 8)	3458, 3084, 3000, 2942, 2844, 1658, 1588.
UV (MeOH) nm (Espectro 9)	285
EMIE, m/z (Espectro 10)	330 [M ⁺ (79.5)]; 329 [M ⁺ -H (23)]; 193 [M ⁺ -C ₆ H ₁₀ O ₂ (13)]; 167 (6.55); 164 [M ⁺ -C ₆ H ₆ O ₄ (65.6)]; 151 (100); 149 (19.7); 138 (9.8); 121 (4.9)
RMN- ¹ H, J (CDCl ₃) (Espectro 11)	5.4, dd, J = 12.90 Hz. y J = 3.0 (H-2); 3.14, dd, J = 17.25 y J = 12.9 Hz. (H-3a); 2.80, dd, J = 3.1 y 17.5 (H-3b); 6.07, s, (H-6 y H-8), 6.98, m (H-2'-H-6'); 3.92, 3.90, 3.81 (3-OCH ₃); 12.021, s (OH-5)
RMN- ¹³ C, δ (CDCl ₃) (Espectro 12)	43.3 (C-3), 79.2 (C-2), 94.28 (C-8), 95.14 (C-6), 103.14 (C-10), 109.5 (C-5'), 111.2 (C-2'), 118.8 (C-6'), 130.82 (C-1'), 149.4 (C-4'), 149.55 (C-3'), 162.81 (C-9), 164.16 (C-5), 195.87 (C-4), 56.0, 56.0, 55.6 (3-OCH ₃) y 167.9 (C-9).



Esquema 1. Patrón de fragmentación del 7,3',4'-éter trimetílico del eriodictol (21).

4.- Identificación del compuesto 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22)

Sucesivas cromatografías en columna y en placa preparativa de la fracción secundaria DO-DP (Ver Cuadro 7 y 8, sección experimental), permitieron el aislamiento y purificación del compuesto 22 como agujas amarillas con p.f = 150-152°C. Su fórmula molecular se estableció como $C_{18}H_{18}O_8$ por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C .

El espectro de IR (Cuadro 17, Espectro 13), presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3416 cm^{-1}), C-H (2922 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1656 cm^{-1}) y anillo aromático (1598 cm^{-1}).

Por otro lado, el espectro de UV (Cuadro 17, Espectro 14) mostró dos bandas de absorción típicas para flavonas (Markham, 1982) a 267 y 344.6 nm. Las características espectroscópicas antes mencionadas, el comportamiento cromatográfico mostrado por el producto natural, al ser revelado con solución de $AlCl_3$ al 5 %, así como consideraciones de tipo quimiotaxónomico (Ismail et al., 1977) permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto (Harborne et al., 1988 y Harborne, 1994; Markham., 1985). Adicionalmente, los espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C mostraron un perfil típico para flavonoides, los cuales confirmaron lo propuesto (Harborne et al., 1986); y fueron muy similares a los del compuesto 23. Las diferencias principales para el compuesto 22 fueron las siguientes:

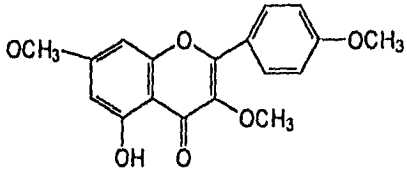
a) En el espectro de RMN- 1H , se observó una señal adicional en δ 3.86, que integraba para tres hidrógenos, atribuible a un grupo metoxilo unido al anillo aromático.

b) Por otra parte, el espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 17, Espectro 17), mostró una señal adicional en δ 55.41 que de acuerdo al desplazamiento químico observado, debía corresponder a un grupo metoxilo ubicado en C-4', la señal para este último carbono apareció en δ 161.67.

Tomando en cuenta las señales observadas en el espectro de RMN-¹H y RMN-¹³C así como el comportamiento cromatográfico y las bandas observadas en el espectro de UV, el compuesto **22** se identificó como el 3,7,4'-éter trimetilico del camperol, el cual ya había sido aislado previamente de *Aframomun giganteum* K.Schum (Vidari et al., 1971), de *Sideritis cystosiphon* (Svent). (Fernández et al., 1988), de *Haplopappus sonorensis* (Encarnación et al., 1989) y de *Hyptis albida* H.B.K. (Pereda-Miranda y Delgado, 1990).

Cabe destacar sin embargo, que este estudio constituye el primer reporte de la presencia de este metabolito en el género *Cnidocolus* y específicamente en *C. tehuacanensis*.

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas del 3,7,4'-éter trimetilico del camperol (22).

	
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} (Espectro 13)	3416, 2922, 1656, 1598.
UV (CHCl_3 -MeOH 1:9) nm (Espectro 14)	267, 344.6
EMIE, m/z (Espectro 15)	328 [M^+ (100)]; 327 [M^+ -H (81.7)]; 297 [M^+ - OCH_3 (8.69)], 285 [M^+ - COCH_3 (40)], 269 (3.4), 167 (7), 166 (1.4), 164 (1.87); 135 (7.8); 122 (0.934); 121 (0.934); 71 (2.8).
RMN- ^1H , δ (CDCl_3) (Espectro 16)	12.65 (s, OH-5), 8.07 (d, H-2', H-6', J = 9.3 Hz), 7.02 (d, H-3', H-5', J = 9.0 Hz), 6.44 (d, H-6, J = 2.4 Hz), 6.35 (d, H-8, J = 2.4 Hz), 3.89 (s, - OCH_3), 3.87 (s, OCH_3) y 3.86 (s, OCH_3).
RMN- ^{13}C , δ (CDCl_3) (Espectro 17)	178.8 (C-4), 161.67 (C-4'), 165.42 (C-7), 162.04 (C-5), 156.75 (C-9), 155.90 (C-2), 138.8 (C-3), 130.14 (C-2', C-6'), 97.82 (C-6), 92.16 (C-8), 122.82 (C-1'), 114.06 (C-3', C-5'), 106.06 (C-10), 55.40, 55.77, 60.11 (3- OCH_3).

5. Identificación del compuesto 3,7-éter dimetilico del camperol (23).

El compuesto **23**, se aisló como agujas de color amarillo intenso, con punto de fusión de 243-246°C. Su fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_6$ se estableció por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C . Este compuesto precipitó de forma espontánea de la fracción secundaria DS, la cual se obtuvo al recromatografiar la fracción primaria D (Ver Cuadro 6, sección experimental).

El espectro de IR (Cuadro 18, Espectro 18) presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3244 cm^{-1}), C-H (2945 cm^{-1}), C=O de γ -pirona (1658 cm^{-1}) y anillo aromático (1598 cm^{-1}). El espectro de UV (Cuadro 18, Espectro 19), mostró dos bandas de absorción características para flavonoles a 347.6 nm y 267 nm (Markham, 1982).

Los espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C (Espectro 21 y Espectro 22) mostraron que el producto natural era un derivado del 3 éter metílico del camperol (Harborne et al., 1986).

El espectro de RMN- 1H en piridina- d_5 (Cuadro 18, Espectro 21), presentó las siguientes señales:

- a) En δ 3.46 y δ 3.64 se observaron dos singuletes asignables a 2 grupos metoxilo.
- b) En δ 13.37 se observó una señal que integró para un protón, que de acuerdo a su desplazamiento químico era asignable al OH quelatado en C-5.
- c) En δ 7.87 y 7 se observaron dos dobletes ($J = 9.0\text{ Hz}$) cada uno integrado para dos protones característico de un sistema A_2B_2 de un anillo aromático para-sustituido. La presencia del anillo aromático disustituido se confirmó en el espectro de masas al observar los fragmentos en m/z 121, 118, 94 y 93 (Espectro 20, Esquema 3).
- d) En δ 6.38 y 6.29 se observó un sistema atribuible a los hidrógenos H-6 y H-8. La magnitud de la constante de acoplamiento (1.7 Hz) era consistente con la disposición meta de estos dos hidrógenos ubicados en el anillo A. El

desplazamiento químico de H-6 y H-8 evidenciaban la presencia de un grupo metoxilo en el C-7 (Harborne et al., 1986). La posición de este metoxilo se confirmó al registrar los Efectos nucleares de Overhauser diferencial (NOEDIF) (Ver Figura 4). En este experimento se irradió el singulete que aparece en δ 3.46 observándose que se exaltaban las señales que correspondían a los protones H-6 (δ 6.38) y H-8 (6.29). Adicionalmente la ubicación del metoxilo en C-7 se confirmó en el espectro de masas al observar los fragmentos en m/z 167, 138, 122, (Ver esquema 3).

e) En δ 4.63 se observa un singulete ancho asignado a un OH en C-4'. Estas evidencias indicaban claramente que la molécula tenía dos grupos metóxilos uno de los cuales fue asignado al C-7 del anillo A restando por ubicar el otro metoxilo, el cual podía estar ubicado en la posición 5,3 ó 4' de la molécula. Con la finalidad de ubicar este grupo metoxilo, se decidió realizar el experimento NOE-diferencial (Ver Figura 4a), en donde se irradió el metoxilo en δ 3.6 y observándose la exaltación de una de las ramas del sistema A_2B_2 (δ 7.88).

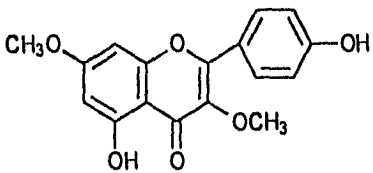
Una evidencia adicional que indicaba que el metoxilo se encontraba en C-3 fue confirmado por el espectro de masas (Esquema 3) al observarse un pico en m/z de 271 [M-43]'.

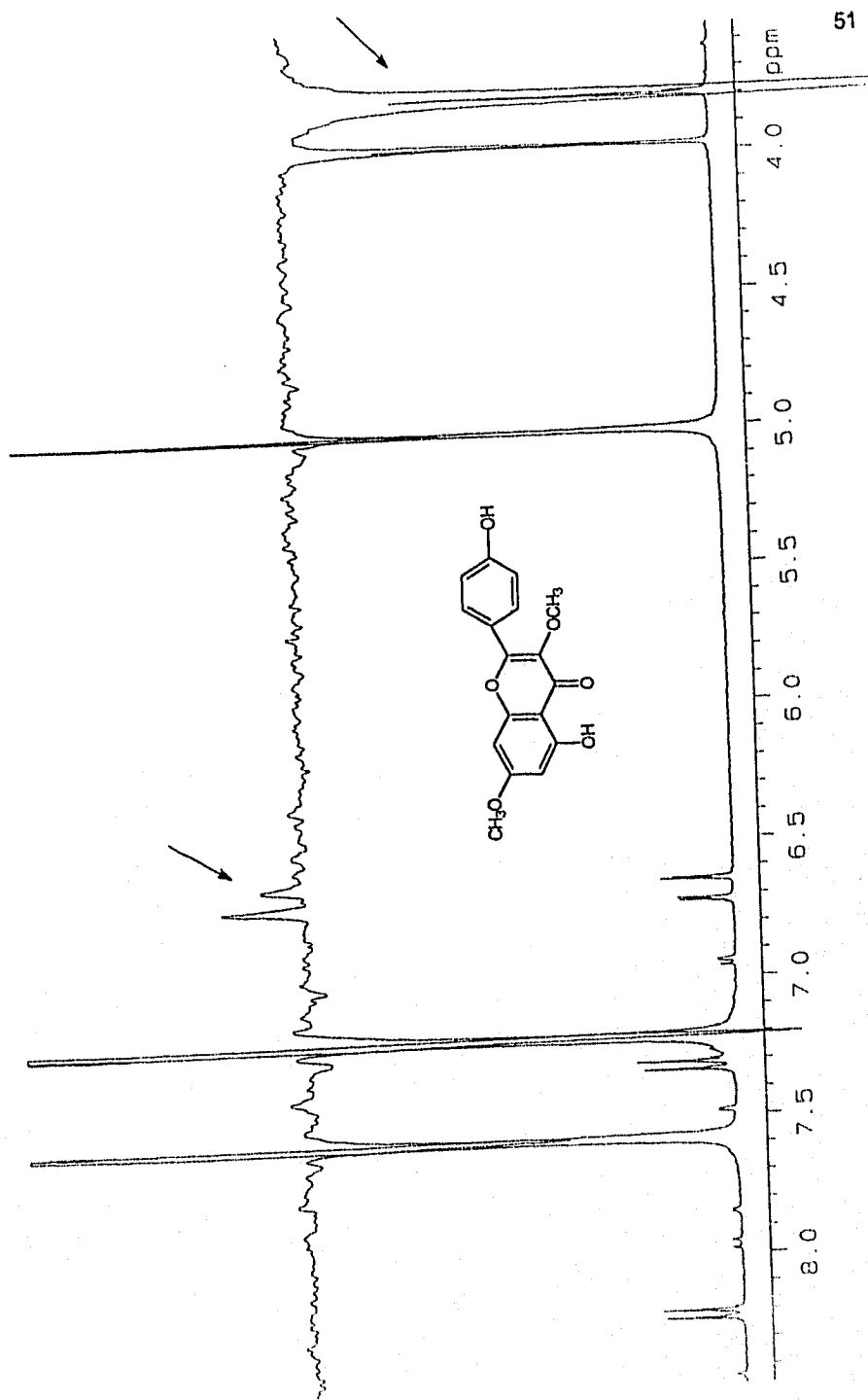
El espectro de RMN ^{13}C modalidad APT (Espectro 22) mostró 6 señales positivas las cuales fueron asignadas a los metinos y metilos de los carbonos C-2' y C-6' (δ 131.05), C-3' y C-5' (116.50), C-6 (98.4), C-8 (92.54), OCH_3- (δ 59.99) y OCH_3- (δ 55.98). Además se observaban 9 señales negativas que de acuerdo a los desplazamientos químicos debían corresponder a los C-4 (δ 179.14), C-7 (δ 165.89), C-4' (162.53), C-5 (161.95), C-9 (157.20), C-2 (156.72), C-3 (141.9), C-1' (121.61) y C-10 (106.5).

El análisis detallado de los espectros de IR, UV, el espectro de masas y la comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura (Urbatsch et al., 1976; Herz et al., 1973, Rodríguez et al., 1972) permitieron identificar al compuesto como 3,7-éter dimetilico del camperol.

A la fecha este compuesto ha sido aislado de las especies *Heterotheca inuloides* Cass y *Arnica alpina* ssp *attenuata* (Schmidt et al., 1993), *Cistus palinhæ* (J. de Pascual et al., 1983), *Ambrosia eriocentra* (Gray) Payne (Hertz et al., 1973) y de *Ericameria diffusa* (Urbatsch et al., 1976). Es importante subrayar que no había sido aislado en la especie *Cnidocolus*.

Cuadro 18. Constantes espectroscópicas del 3,7-éter dimetilico del camperol (23).

	
IR ν max (KBr) cm^{-1} (Espectro 18)	3228, 2918, 1660, 1588.
UV (MeOH) nm (Espectro 19)	347.6 y 267.
RMN- ^1H , δ (Piridina d_6) (Espectro 21)	13.37 (s, OH-5), 7.87 (d, H-2' y H-6', J = 9.0 Hz), 7 (d, H-3' y H-5' J = 8.4 Hz) 6.29 (d, H-8, H-6 J = 1.5 Hz), 3.64 (s, -OCH ₃), 3.46 (s, -OCH ₃).
RMN- ^{13}C , δ (CDCl ₃) (Espectro 22)	131.05 (C-2' y C-6'), 116.50 (C-3' y C-5'), 98.4 (C-6), 92.54 (C-8), 59.99 (-OCH ₃), 55-98 (-OCH ₃) y 162.53 (OH-C-4').
EMIE, m/z (Espectro 20)	314 [M ⁺ (100)]; 313 [M ⁺ - H (84.9)]; 296 [M-H ₂ O (15.87)]; 285 [M-CO-H (15.07)]; 283 [M-OCH ₃ (9.52)] ⁺ ; 271 [M-CH ₃ -CO (30.15)]; 138 [M-CO (3.96)] 166 (3.16); 148 (1.58); 121 (14.28).



51

Figura 4. Efecto Nuclear de Overhauser diferencial para el compuesto 23.

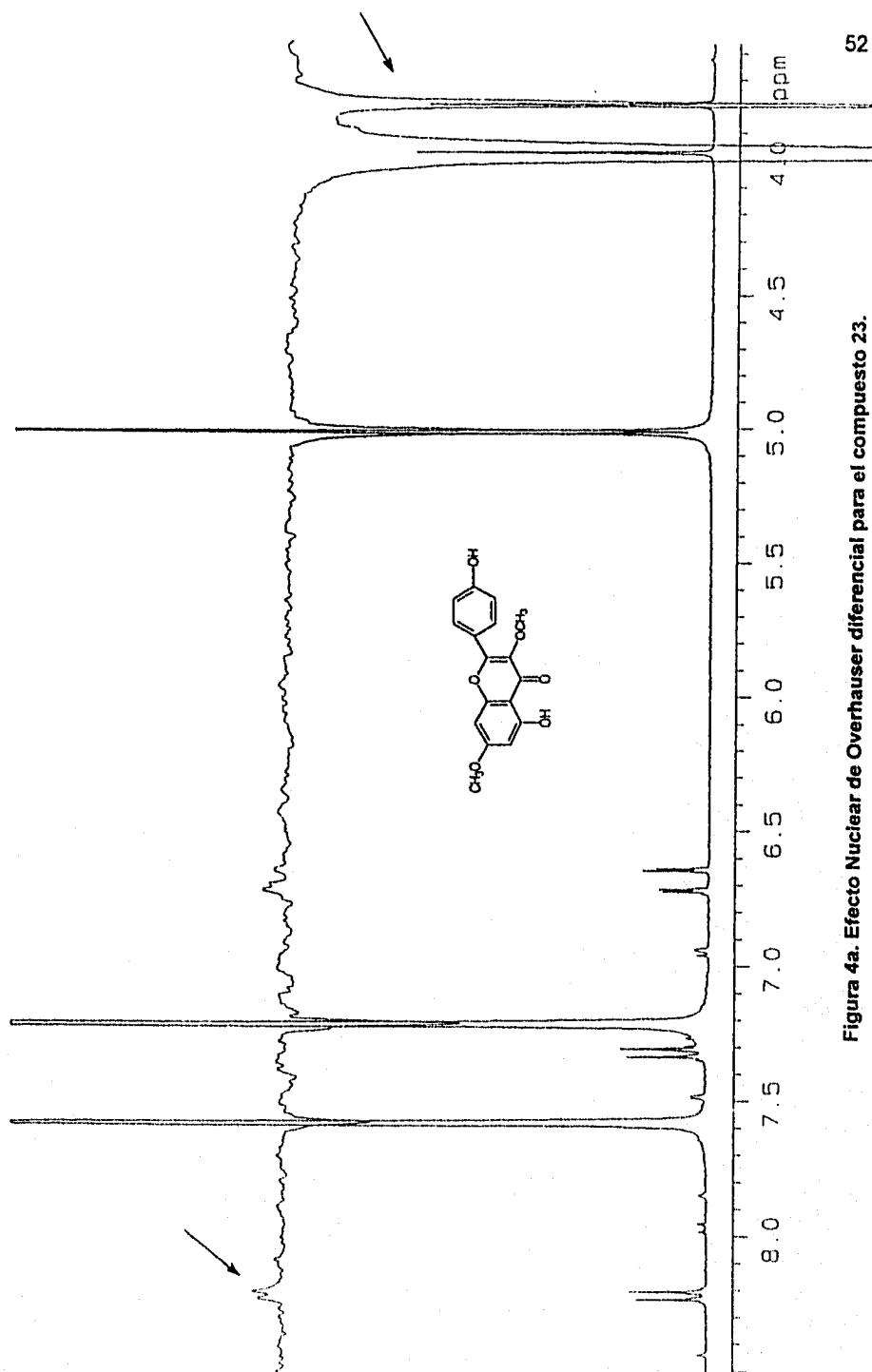
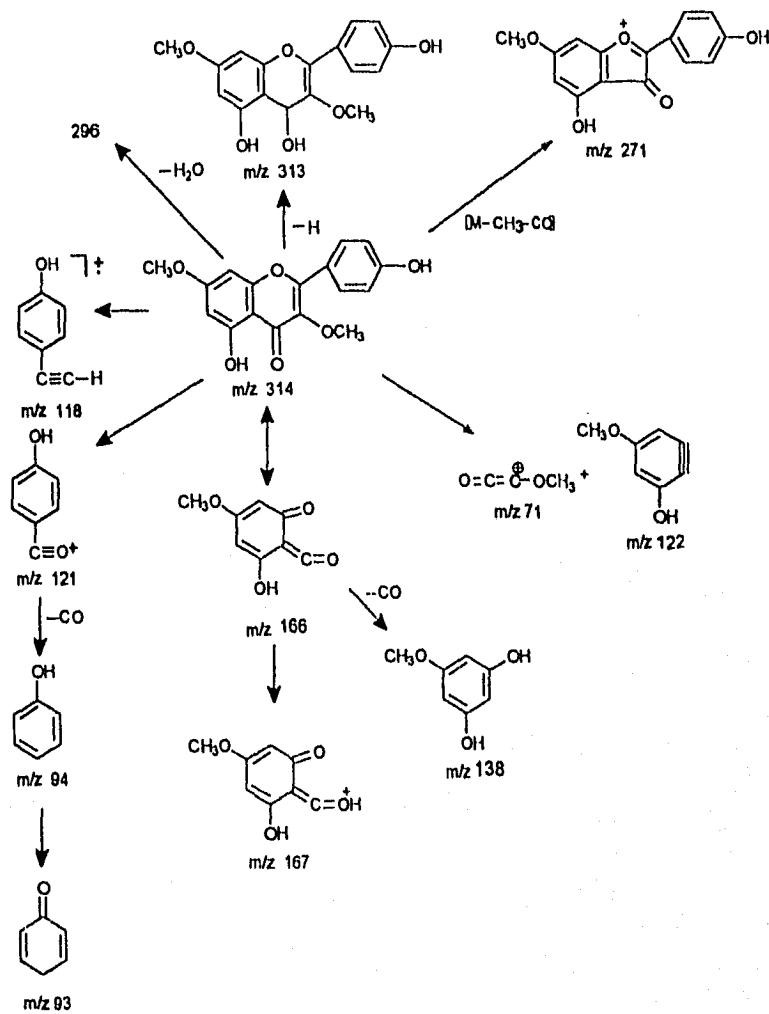


Figura 4a. Efecto Nuclear de Overhauser diferencial para el compuesto 23.



Esquema 3. Patrón de fragmentación del 3,7-éter dimetílico del camperol (23).

6. Identificación del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24).

El fraccionamiento en columna abierta de la fracción primaria E, permitió la obtención de la fracción E-14 (Ver Cuadro 9), la cual fue eluida con MeOH (100%). De esta última fracción se obtuvo el compuesto 24 el cual precipitó de forma espontánea, este producto se aisló como un sólido amorfo, de color crema, con punto de fusión mayor a 250°C y soluble en MeOH. Su fórmula molecular se estableció como $C_{18}H_{16}O_6$ por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C .

El espectro de IR (Cuadro 19, Espectro 23) mostró bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3433 cm^{-1}), C-H (2997.6 y 2932 cm^{-1}), C=O de γ -pirona (1632 cm^{-1}) y anillo aromático (1594 cm^{-1}).

Por otro lado, el espectro de UV (Cuadro 19, Espectro 24) mostró 2 bandas de absorción a 262.7 y 336.7 nm generados por el sistema benzolito del anillo A (Banda II) y por el sistema cinamolito del anillo B (Banda I), respectivamente. Estas bandas son características para flavonas.

El análisis detallado de los espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C (Cuadro 19, Espectros 25 y 26), sugirieron que el producto 24 era un derivado del 3-éter trimetilico del camperol, el cual mostró gran similitud en sus características espectroscópicas con el compuesto 23. Las evidencias que permitieron determinar las diferencias estructurales son las siguientes:

- a) Ausencia de la señal para el OH quelatado entre δ 12-13.
- b) La presencia de un singlete en δ 9.52, esta señal debía corresponder a un OH no quelatado el cual debía estar ubicado en C-4'. La ubicación del grupo OH en C-4' fue también corroborado en el espectro de masas, al observarse los fragmentos en m/z de 118, 121 (Esquema 4).
- c) Por otro lado, la ausencia de la señal característica para H-3 de una flavona (Markham, 1982) o de un hidroxilo de un flavonol, sugería que la molécula era un éter metílico de flavonol.

Estas evidencias sugirieron claramente que el compuesto 24 tenía en su estructura 3 grupos OMe y un grupo OH, sin embargo, restaba por determinar el patrón de sustitución en la molécula, el cual se estableció mediante el análisis del

patrón de fragmentación generados en el espectro de masas ya que existían 3 posibles estructuras (Ver Figura 5). De esta Figura, la estructura A se descarta por ausencia de la señal del OH quelatado en el espectro de RMN-¹H ya que esta señal aparece en δ 12.0. La estructura B mostró el patrón de fragmentación esperado, los fragmentos más importantes y que ayudaron a ubicar la posición del grupo OH y del grupo metoxilo fueron los picos en m/z 118, 121, 285, 181, 154 y 136 (Esquema 4). Adicionalmente las estructuras propuestas A y C se descartaron por el patrón de fragmentación obtenido en el espectro de masas del compuesto 24 (Esquema 4), ya que ambos compuestos tendrían que presentar fragmentos en m/z 121, 164, correspondientes a la porción cinamollo de la molécula.

Con la finalidad de ubicar de manera inequívoca la posición del grupo hidroxilo, se decidió preparar el derivado acetilado (Espectro 27), este espectro mostró las siguientes diferencias con respecto al producto natural:

- i) La señal para el grupo acetato en δ 2.32 confirmó la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula original.
- ii) Por otro lado se observó un desplazamiento para-magnético de las señales asignadas al sistema A₂B₂ del anillo aromático para-sustituido, estas señales aparecen en δ 7.22 (H-3' y H-5'), δ 8.16 (H-2' y H-6').

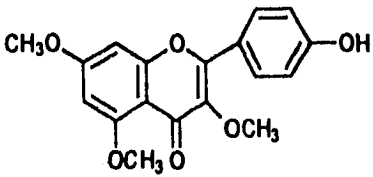
La preparación del derivado acetilado fue decisivo para determinar la posición del grupo OH en la molécula.

El análisis del espectro DEPT (Espectro 26a) confirmó la presencia en la molécula de 3 metóxilos ubicados en C-3, C-5 y C-7 (δ 59.53, δ 56.27 y δ 55.73), un carbono con un grupo OH (δ 161).

Con base en el análisis anterior, el comportamiento cromatográfico, los datos obtenidos de IR y UV y la comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura (Harborne 1986, Harborne 1994 y Urbatsch et al., 1976), permitieron identificar al compuesto como el 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24), el cual ha sido obtenido previamente de *Ericameria diffusa* (Urbatsch et al., 1976), sin embargo esta investigación constituye el primer

reporte de la presencia de este metabolito en el género *Cnidocolus* y específicamente en *C. tehuacanensis*.

Cuadro 19. Constantes espectroscópicas del 3,5,7-éter trimetilico del camperol (24).

	
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} (Espectro 23)	3433, 2932, 1632, 1594
UV (MeOH) nm (Espectro 24)	262.7 y 336.7
RMN- ^1H , δ (CDCl_3 -DMSO) (Espectro 25)	9.52 (s, OH-4'), 6.95 (dd, H-3', H-5' J = 9 Hz), 7.95 (dd, H-2' y H-6' J = 9 Hz), 3.74 (s, OCH ₃), 3.82 (s, OCH ₃), 3.85 (s, OCH ₃), 6.45 (d, J = 2.4 Hz), 6.25 (d, J = 2.4 Hz).
RMN- ^{13}C (Espectro 26)	174 (C-4), 161 (C-4'), 164 (C-7), 159 (C-5), 153.5 (C-9), 160 (C-2), 141 (C-3), 96 (C-6), 129.73 (C-2', C-6'), 121 (C-1'), 115.58 (C-3', C-5'), 110 (C-10), 92.54 (C-8), 55.73, 56.2, 59.5 (3-OCH ₃).

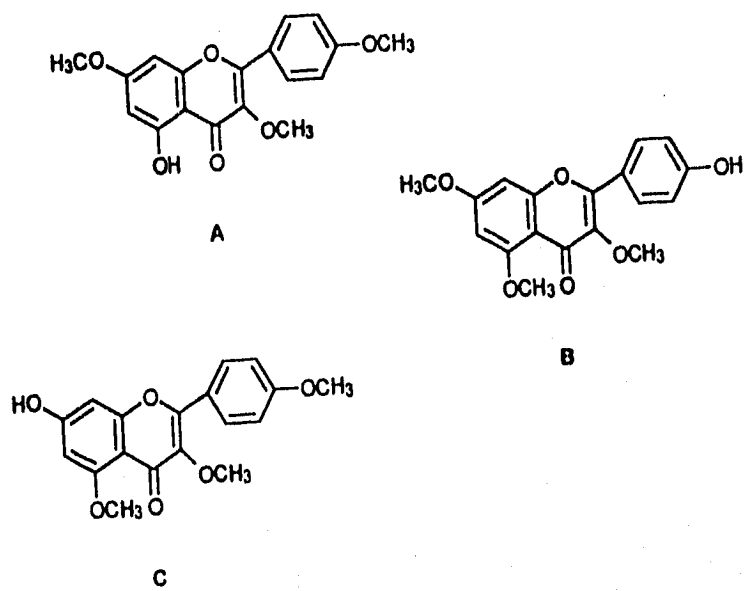
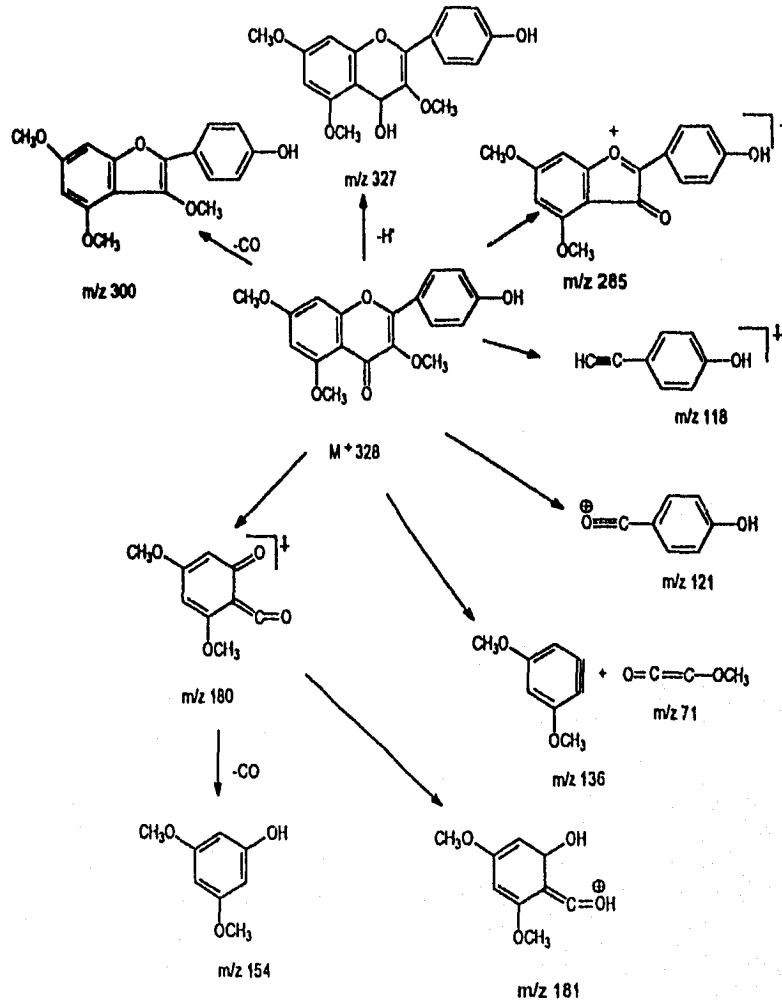


Figura 5.-Posibles estructuras para el compuesto 24.



Esquema 4. Patrón de fragmentación del 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24)

V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El presente estudio fitoquímico constituye la primera investigación del contenido metabólico de la especie endémica *Cnidocolus tehuacanensis*, el extracto $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1) de esta especie permitió el aislamiento de tres derivados metílicos del camperol (3,7,4'- éter trimetílico del camperol (22), 3,7-éter dimetílico del camperol (23) y 3,5,7-éter trimetílico del camperol (24), una flavanona (5-hidroxi-7,3',4' trimetoxiflavanona (21), dos triterpenos: acetato de moretenol (18) y moretenol (19) y dos esteroides (β -sitosterol y β -D-glucositolsterol). Todos los compuestos representaron productos naturales conocidos.

El extracto orgánico no mostró actividad sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, ni toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* Leach. por lo que esta especie vegetal no constituye una fuente potencial de compuestos con actividad fitotóxica, ni citotóxica. Dado que el extracto orgánico mostró actividad específica contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*, esta especie vegetal puede constituir una fuente potencial de principios con actividad antifúngica.

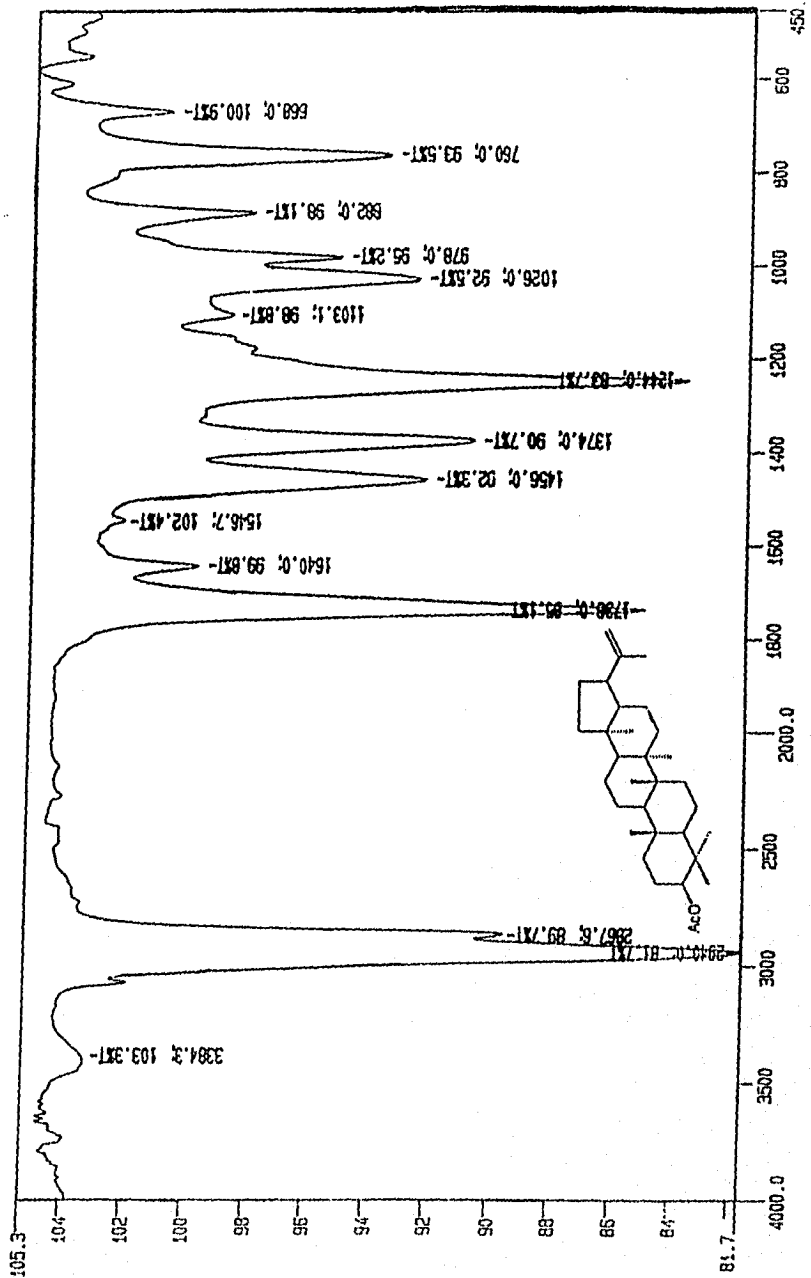
Recomendaciones:

a) Determinar la actividad antifúngica de los compuestos aislados, con la finalidad de identificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica mostrada por el extracto orgánico.

b) Aislar y caracterizar otras flavonas y triterpenos presentes en buena cantidad en las fracciones de mayor polaridad; estableciendo un método adecuado para su separación y purificación, ya que no se lograron separar adecuadamente por los métodos cromatográficos convencionales, dado que estos se obtuvieron como una mezcla de compuestos. Además determinar la actividad antifúngica de los mismos.

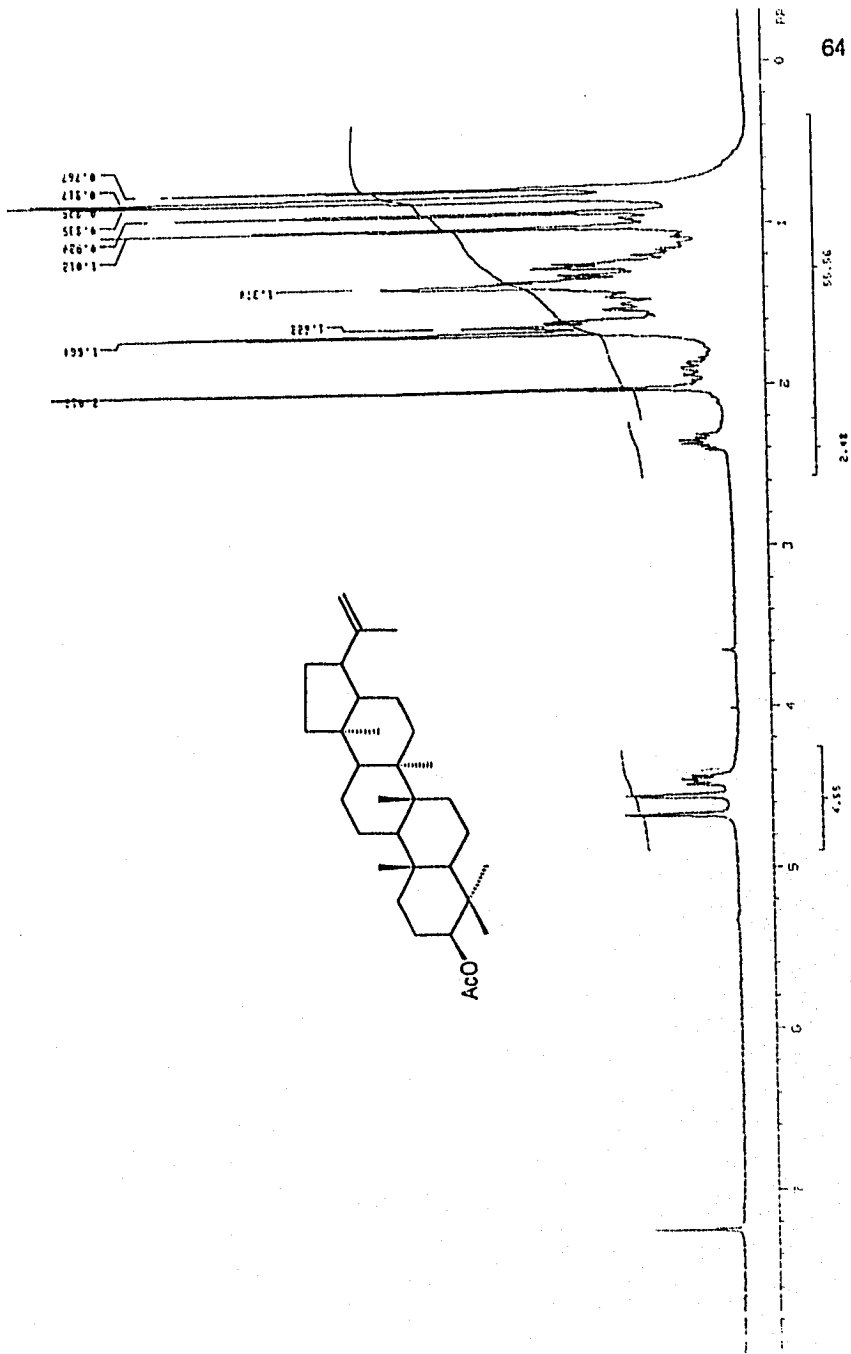
c) En la literatura se ha descrito que flavonoides como el camperol (Amtzen et al., 1974), presentan actividad sobre la fotosíntesis por lo que también es necesario explorar la actividad fotosintética de los derivados metílicos del camperol aislados de *C. tehuacanensis*.

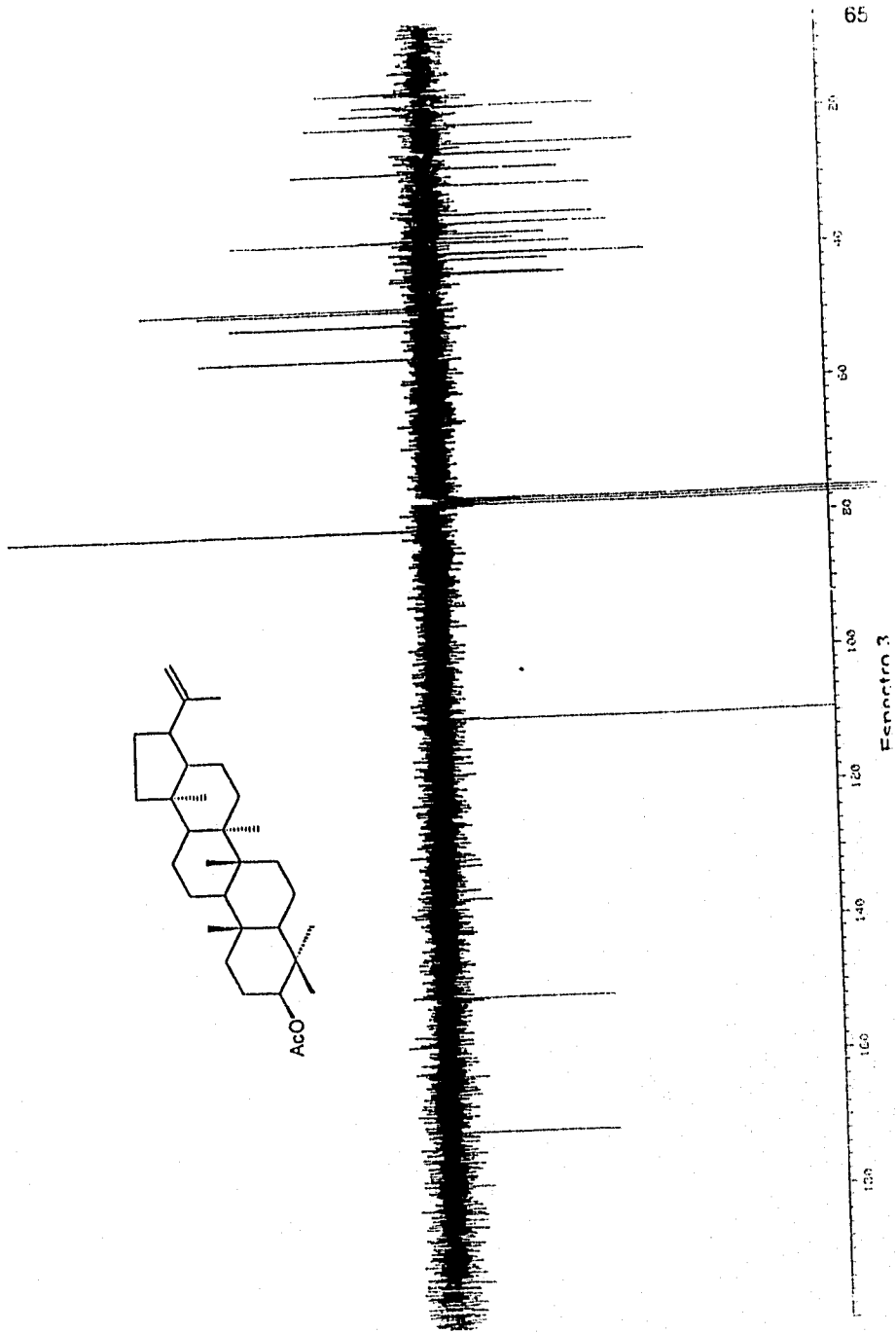
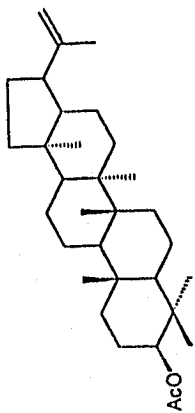
VI.- ESPECTROS

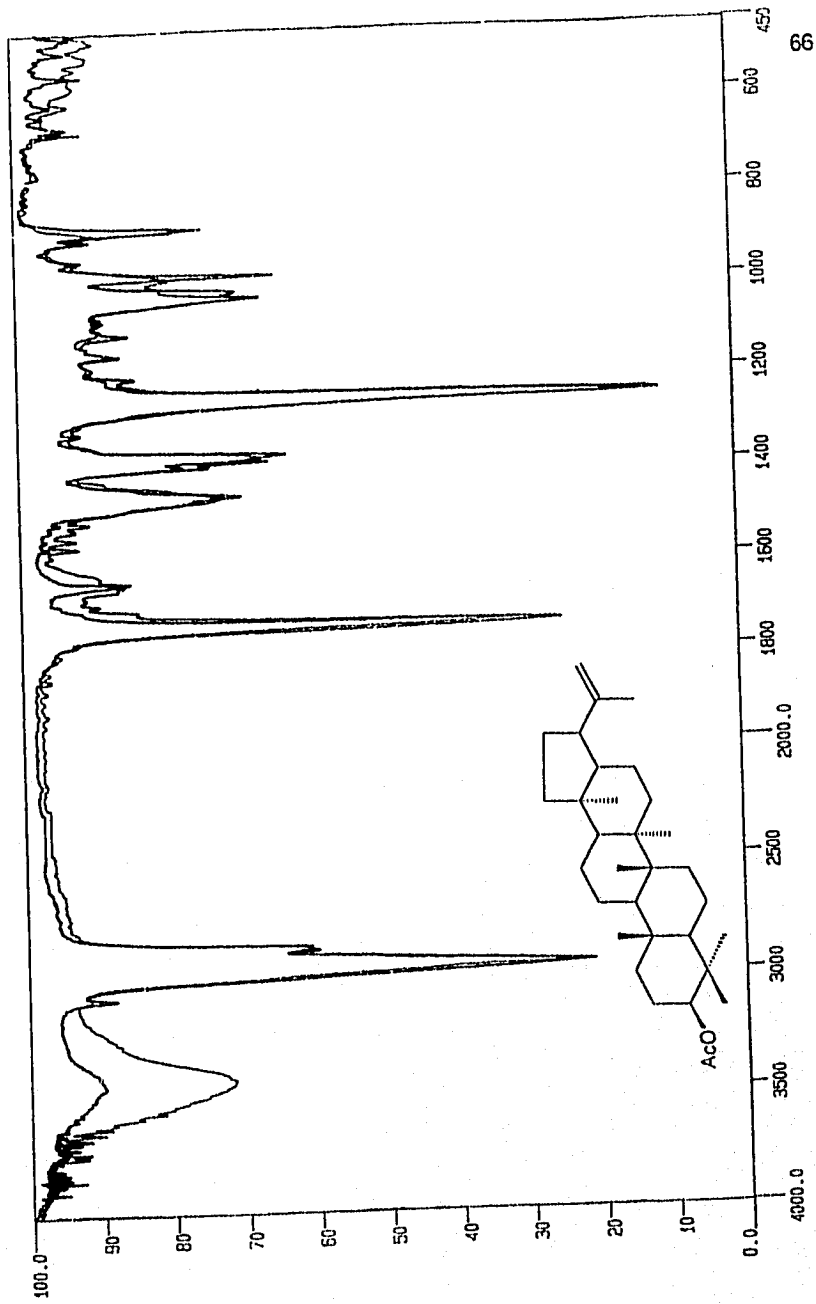


69

Espectro 1

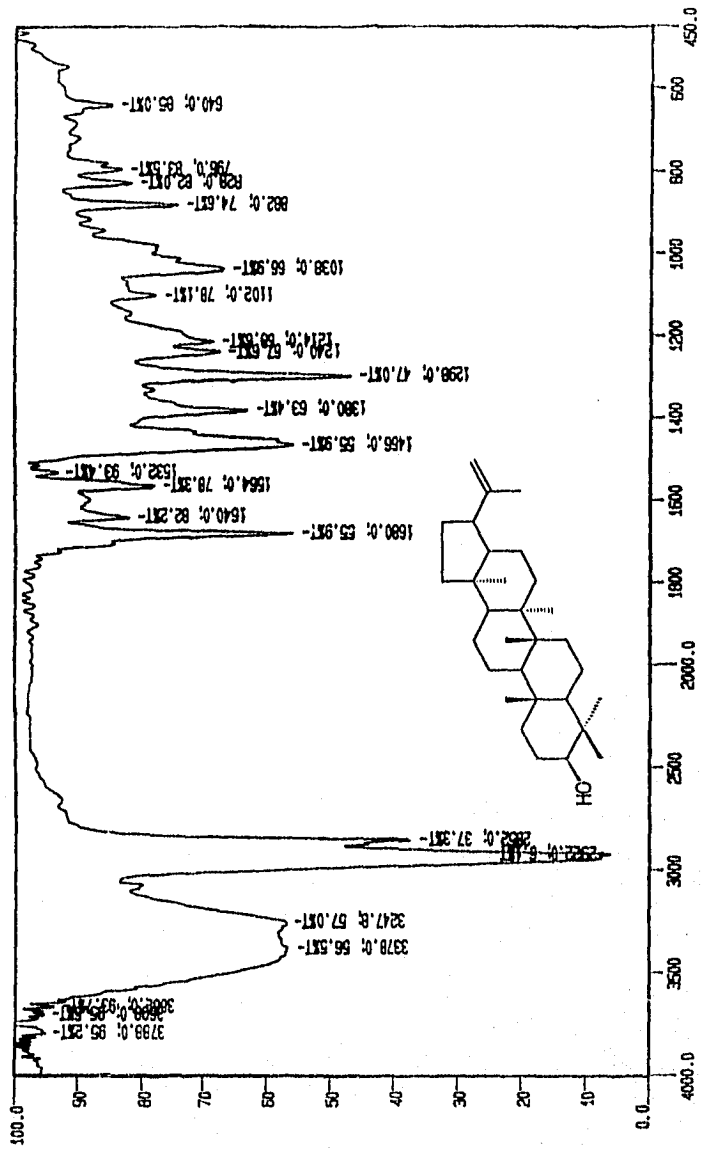


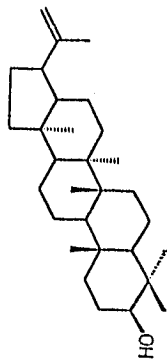




Espectro 4

Espectro 5





3.619
3.641
3.663

3.66 PDM

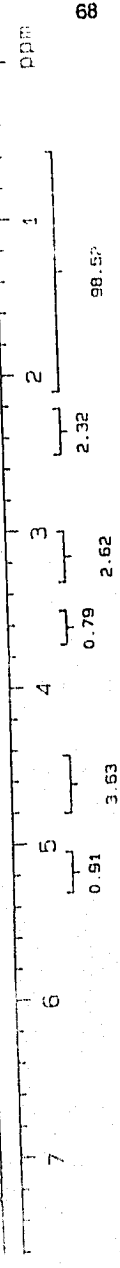
4.573
4.568
4.564
4.559

4.68 4.64 4.60 PDM

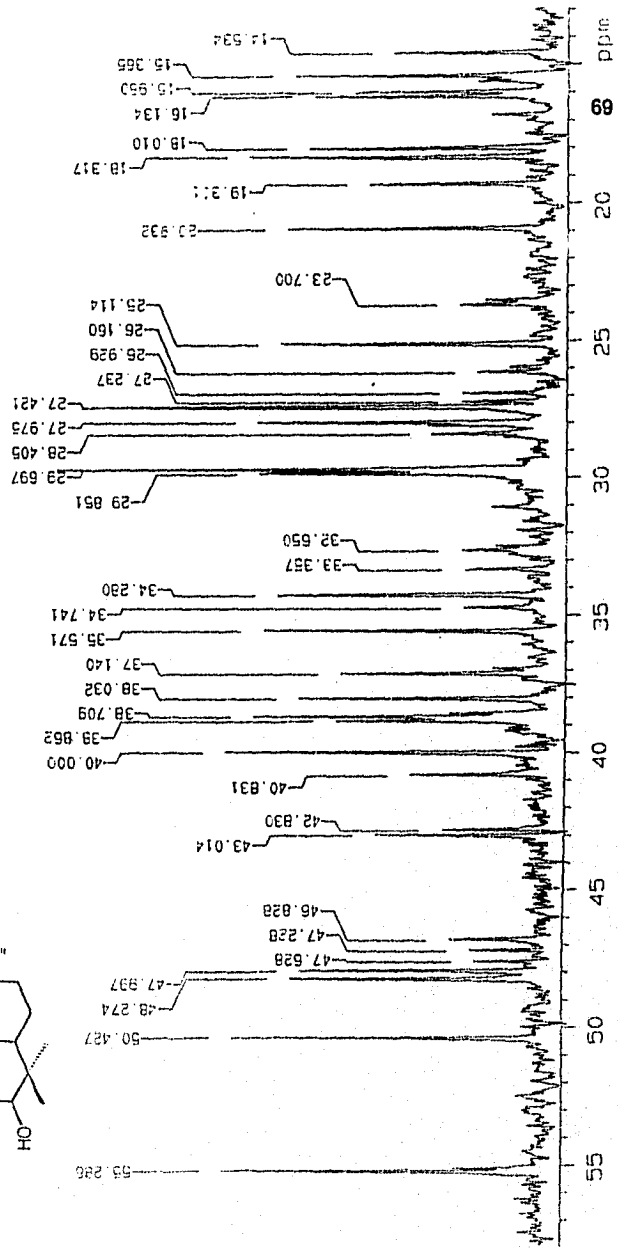
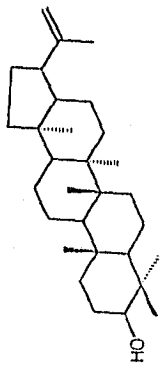
4.591

5.171
5.194

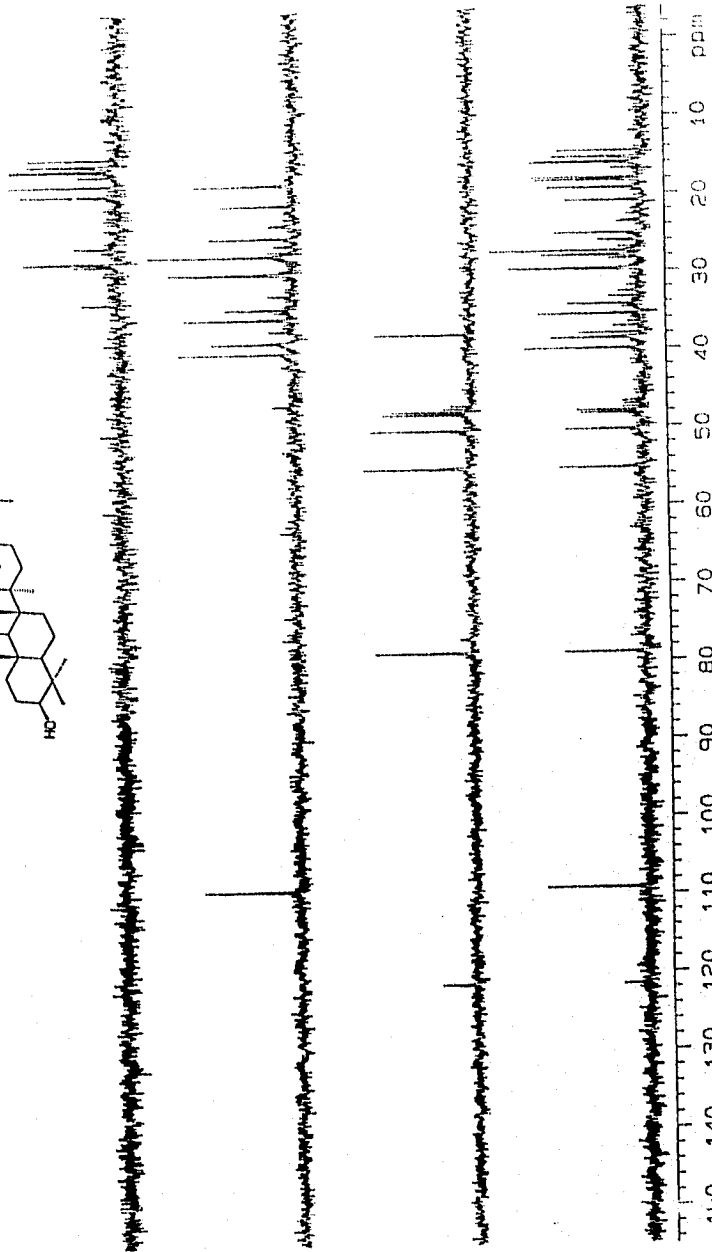
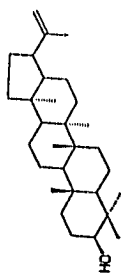
5.17 PDM



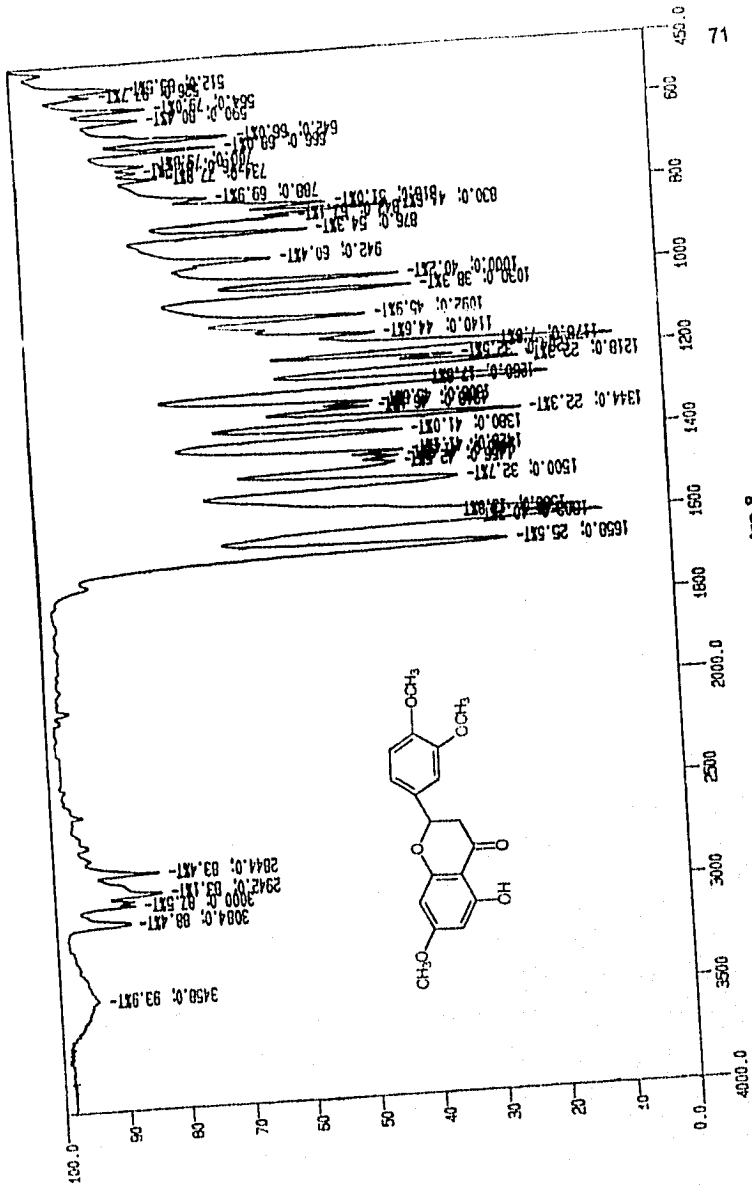
Espectro 6



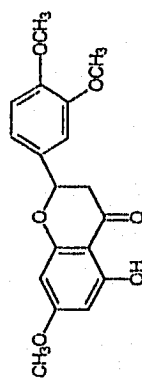
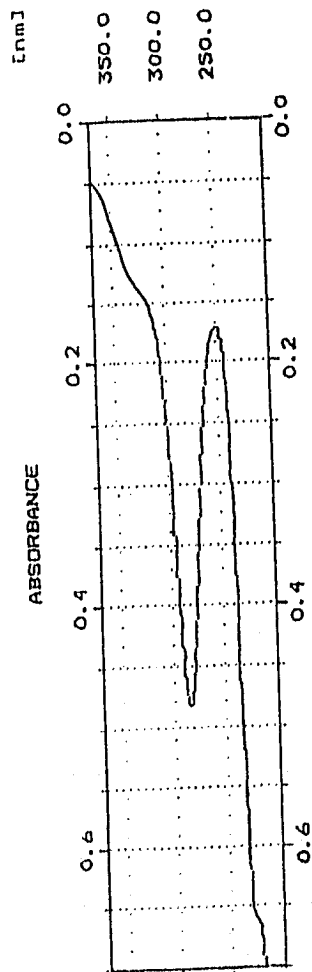
Espectro 7



Espectro 7a



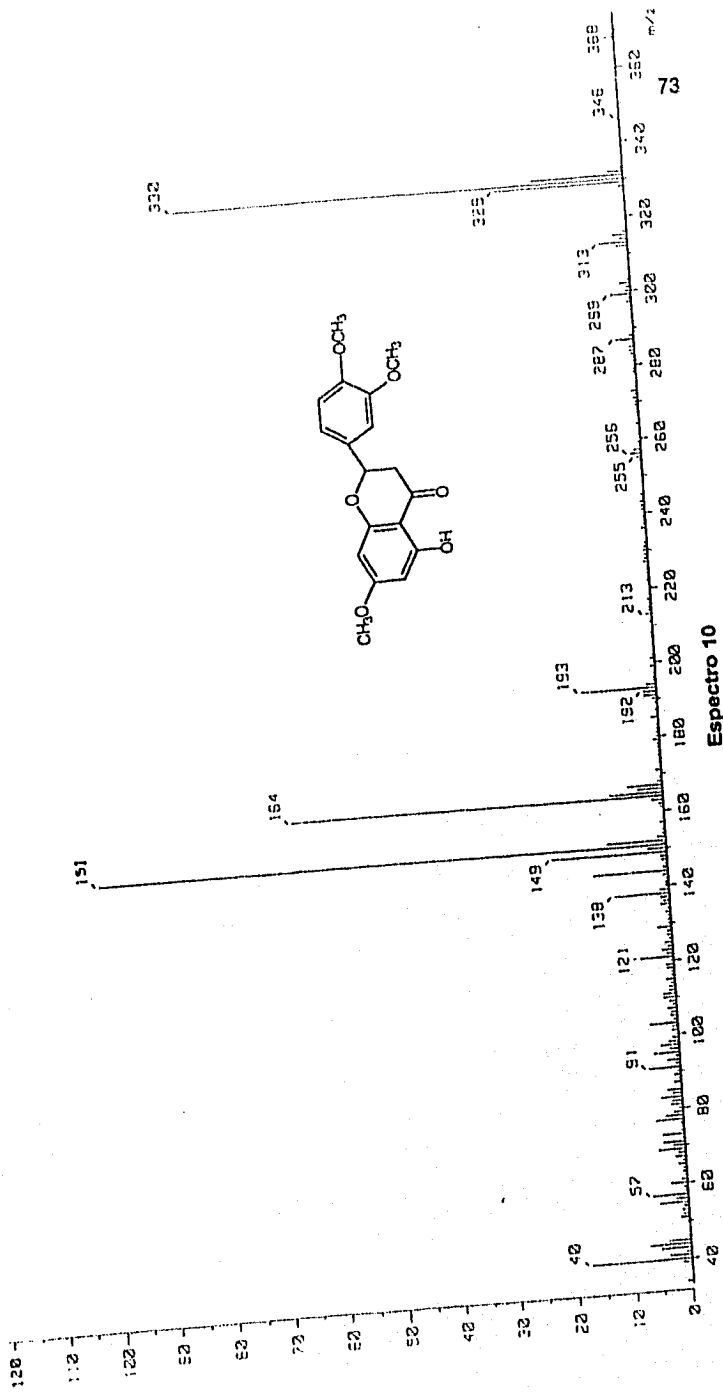
Espectro 8

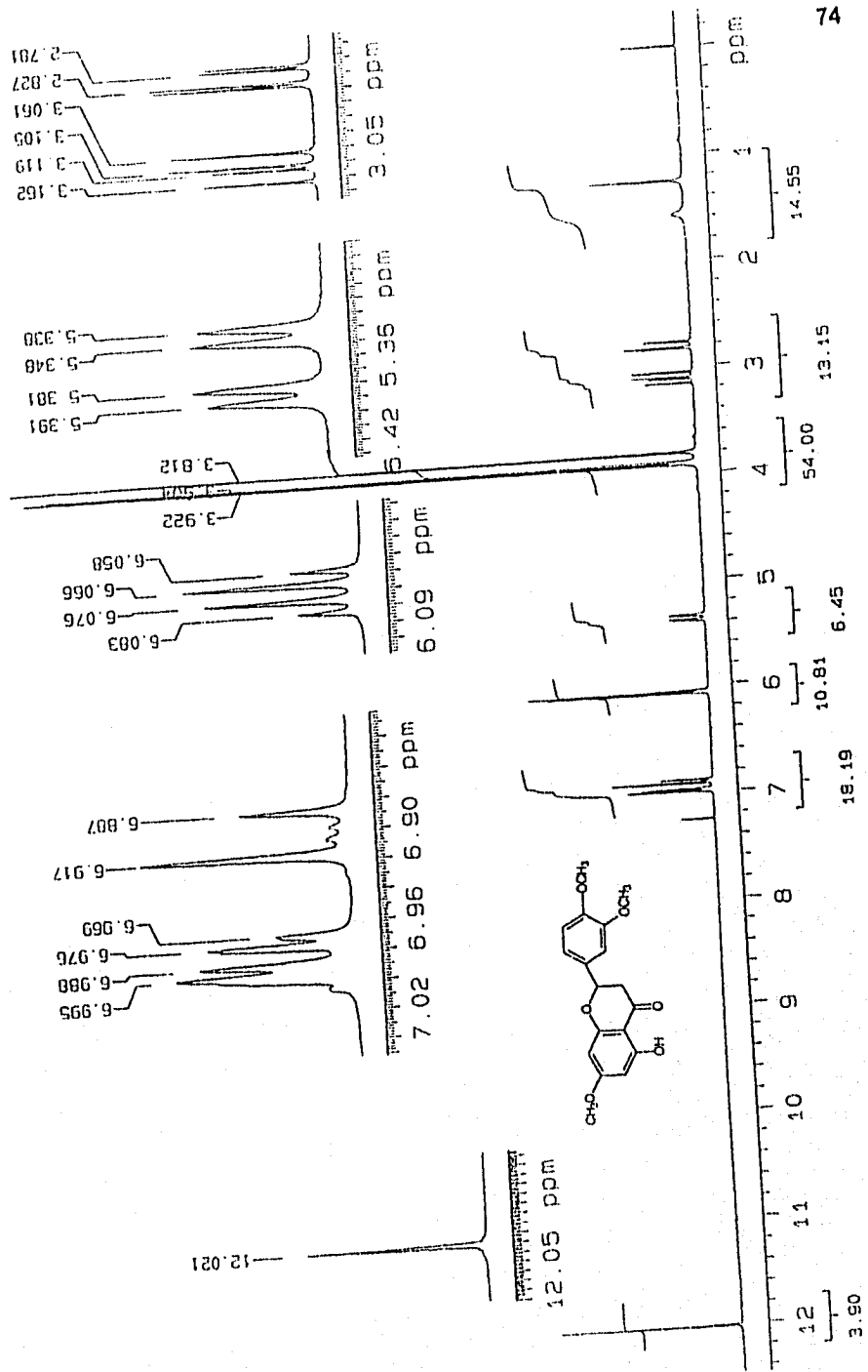


WAVELENGTH (MAX) 285.0 nm
 WAVELENGTH (MIN) 251.0 nm
 WAVELENGTH (MAX) 200.7 nm

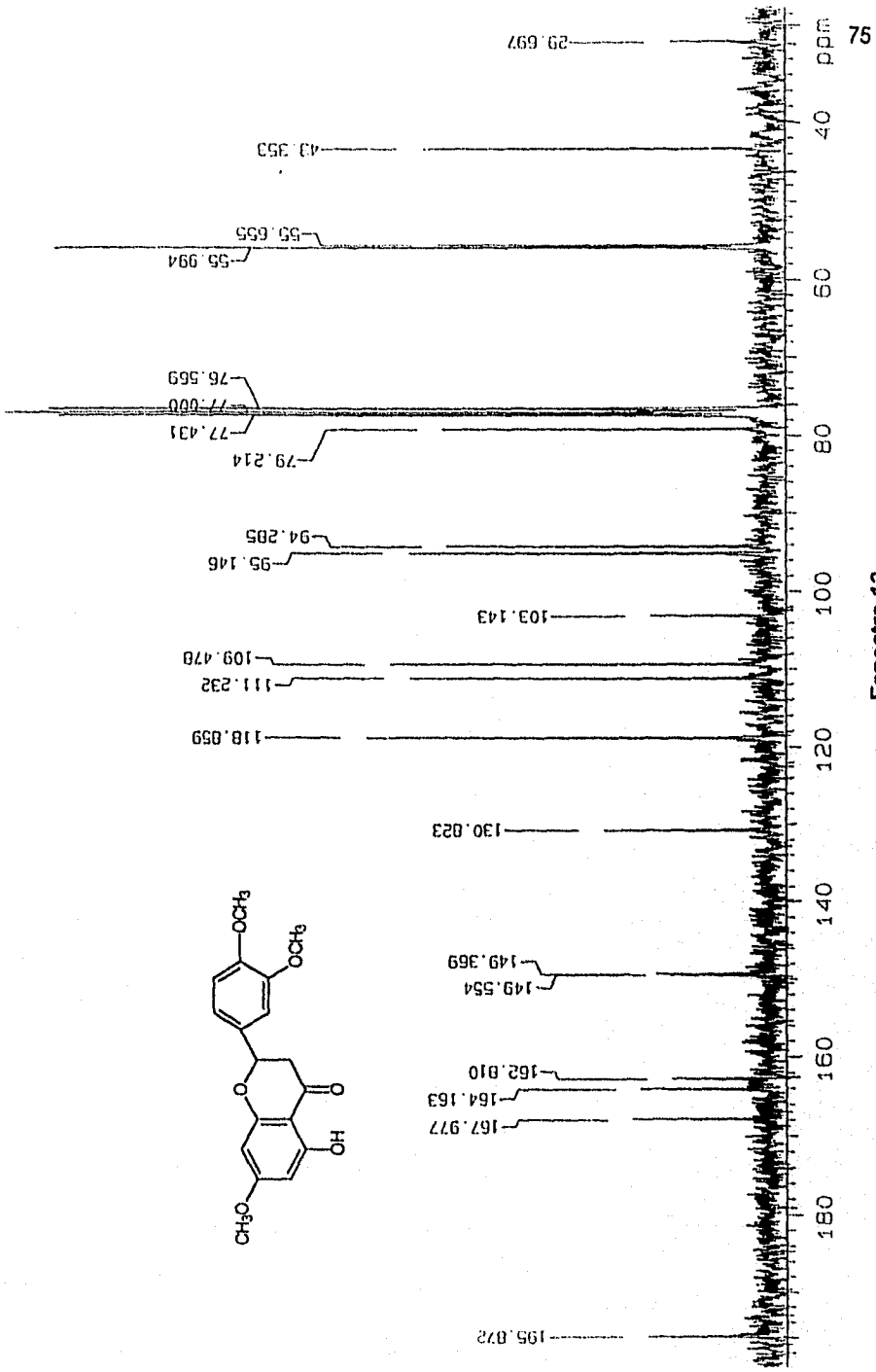
DATA
 ABS 0.485
 ABS 0.172
 ABS 1.212

Espectro 9

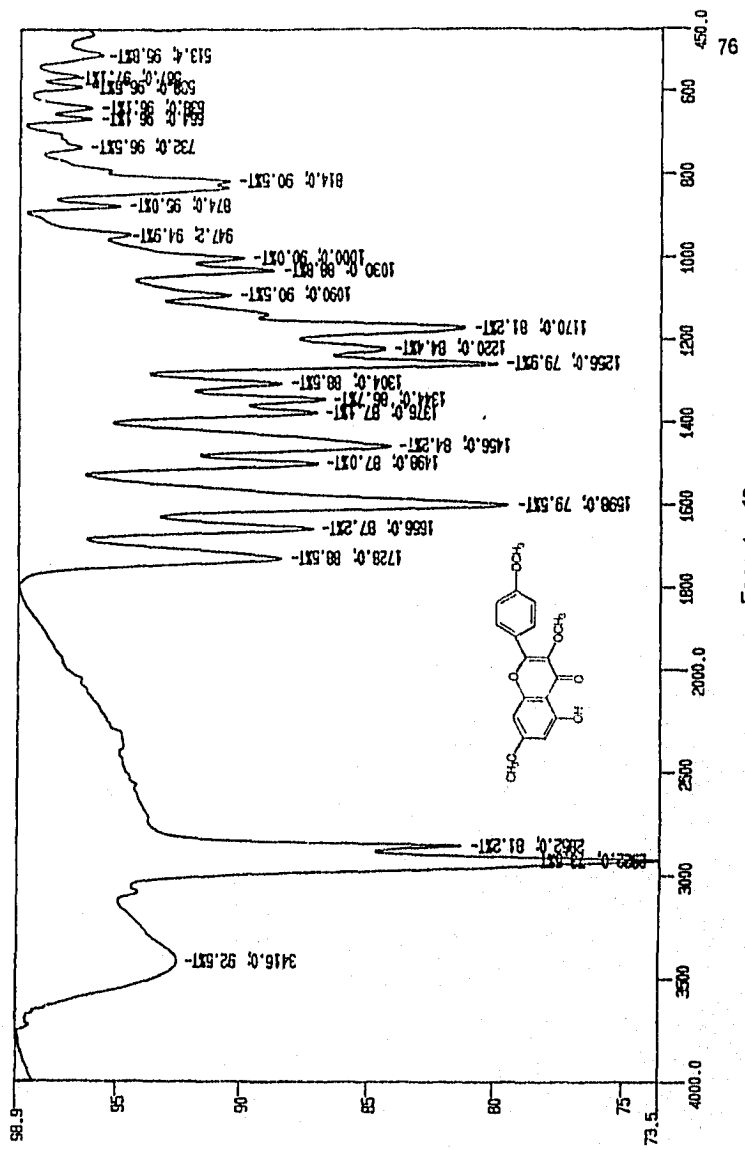


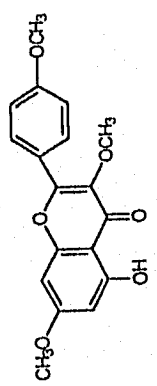
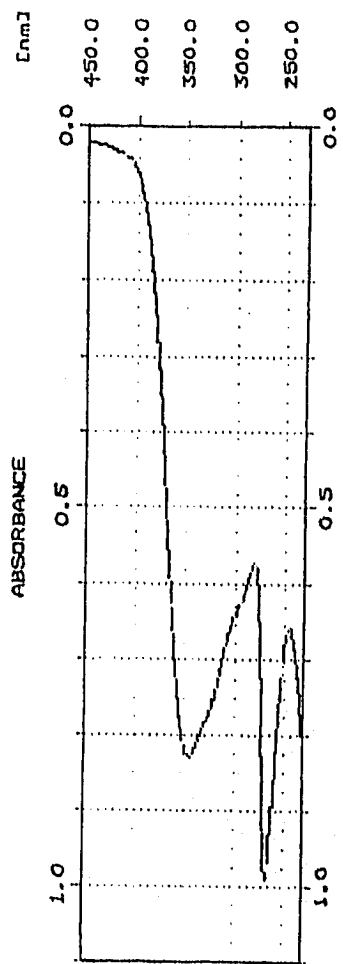


Espectro 11



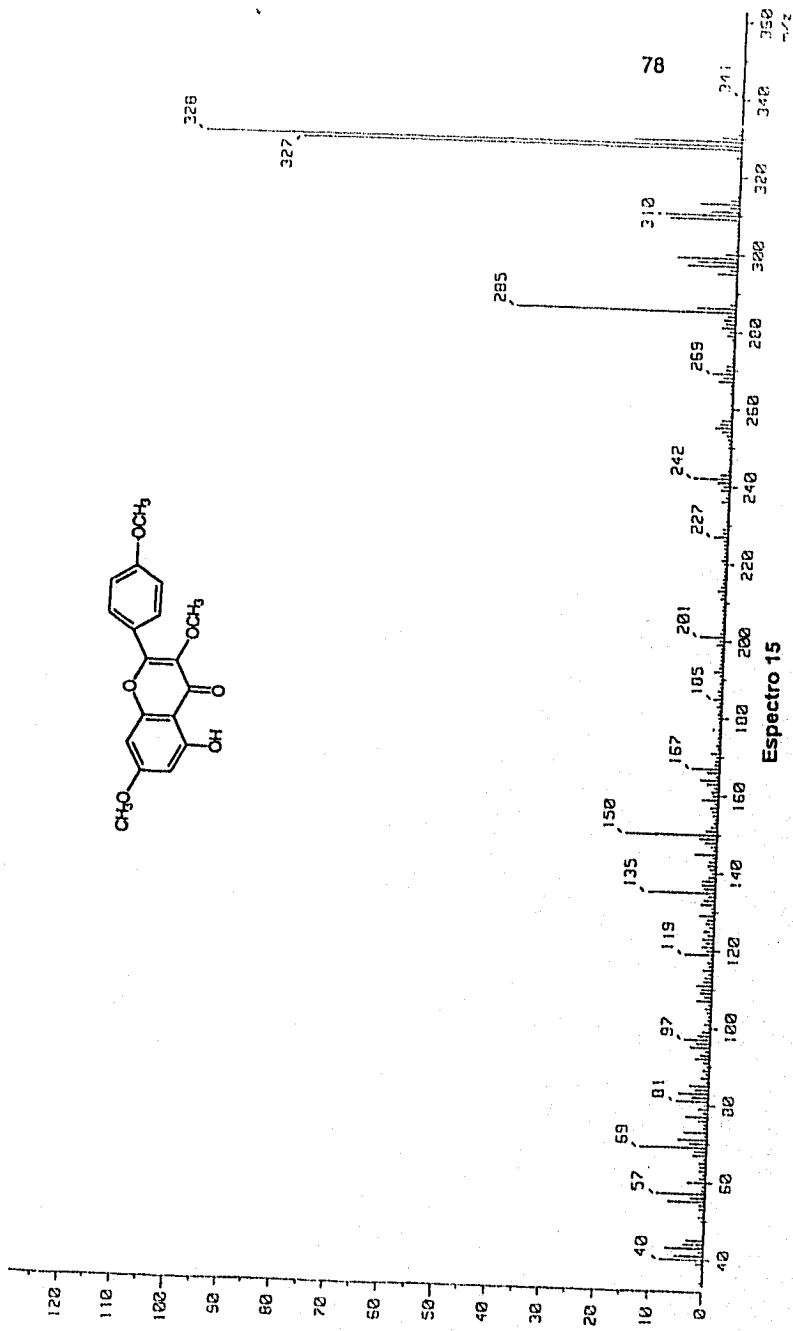
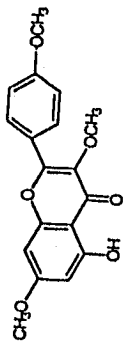
Espectro 12

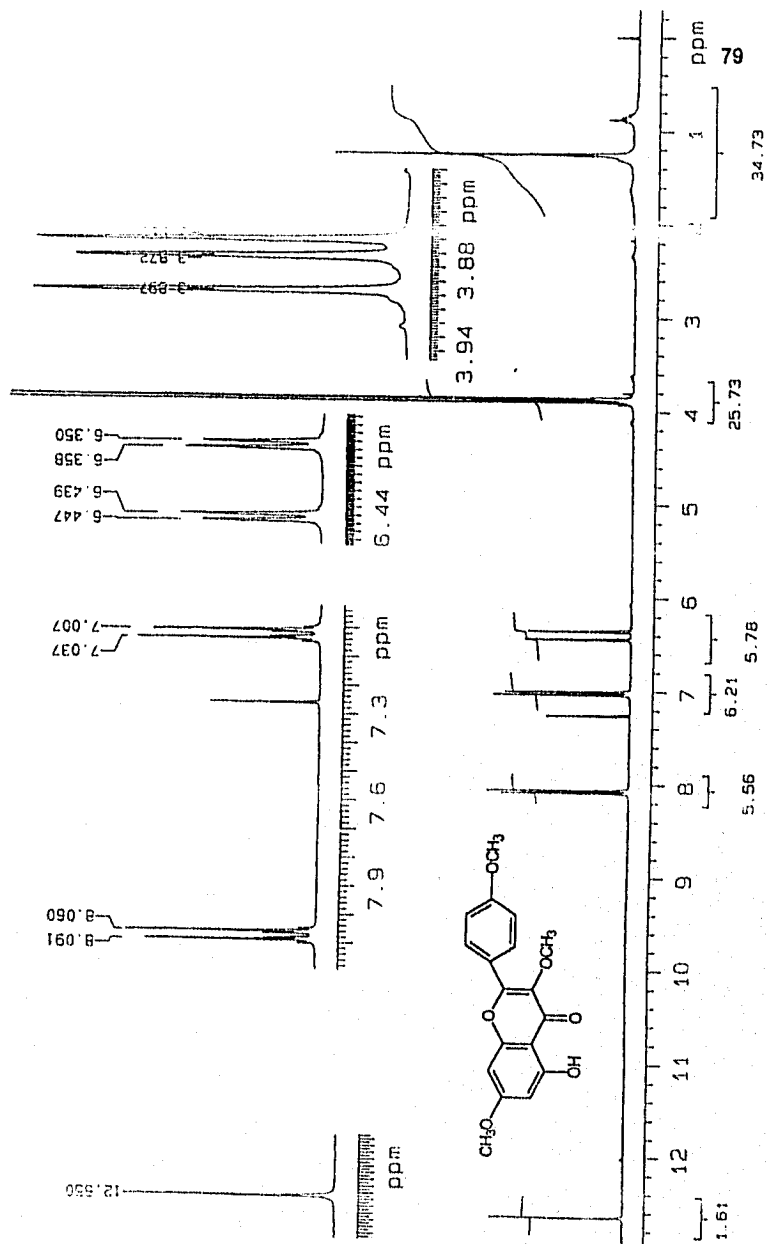




WAVELENGTH	DATA
344.6 nm (MAX)	0.832 ABS
281.1 nm (MIN)	0.573 ABS
267.1 nm (MAX)	0.993 ABS
245.5 nm (MIN)	0.661 ABS

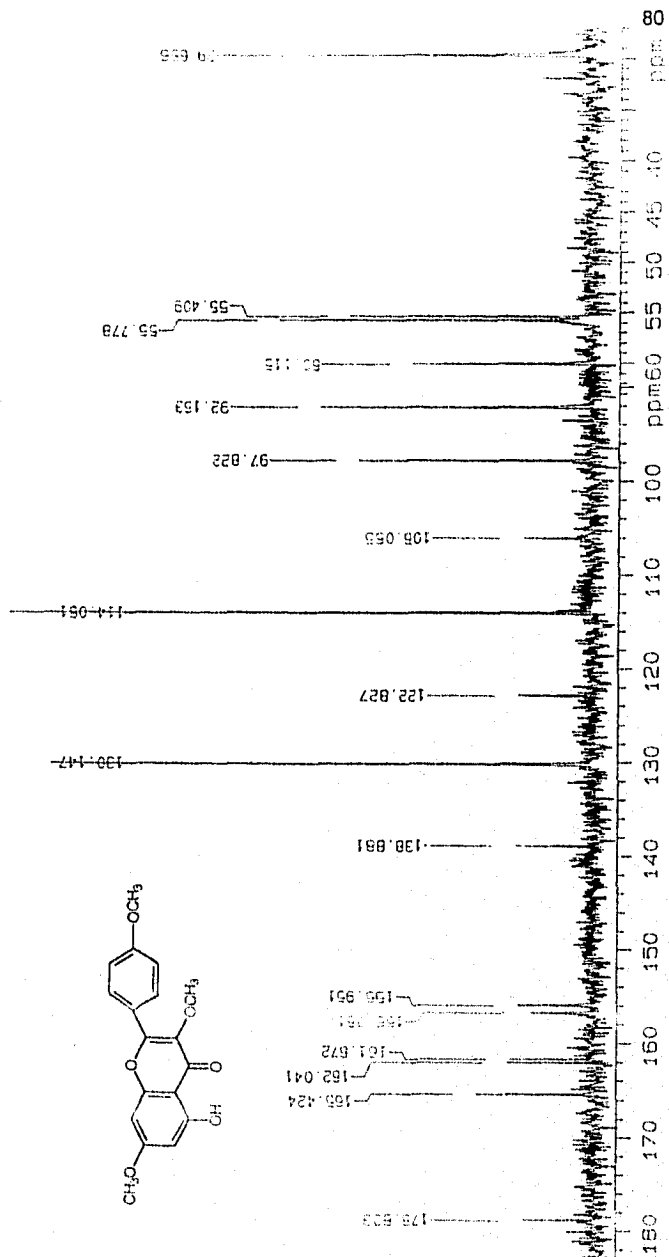
Espectro 14



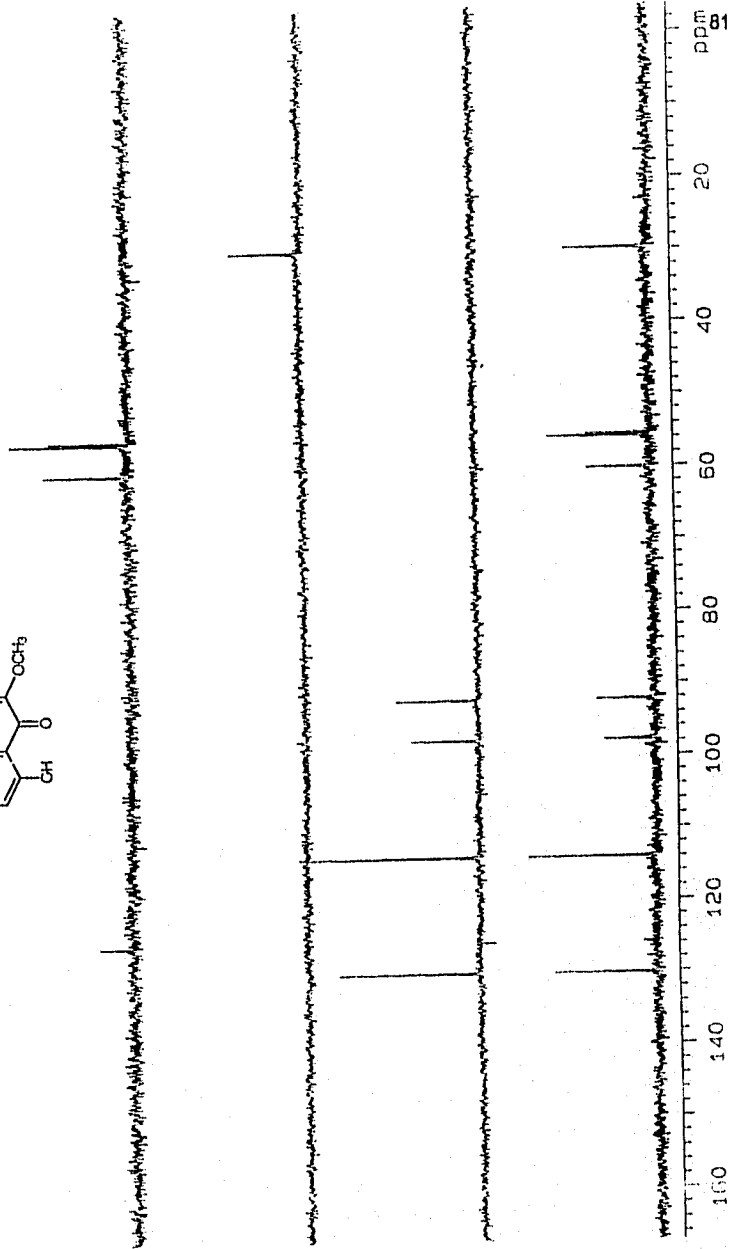
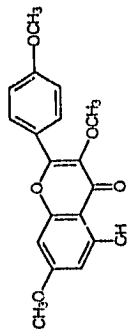


Espectro 16

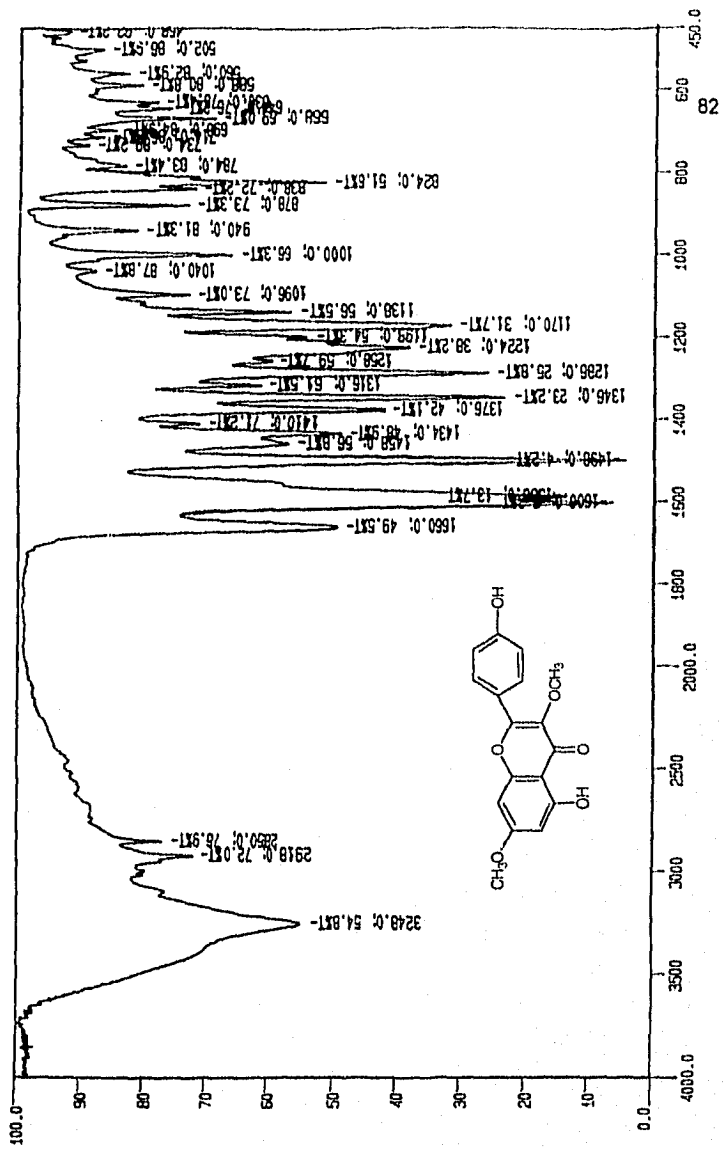
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

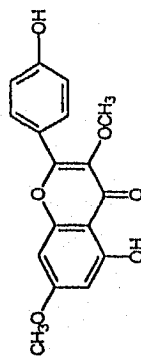
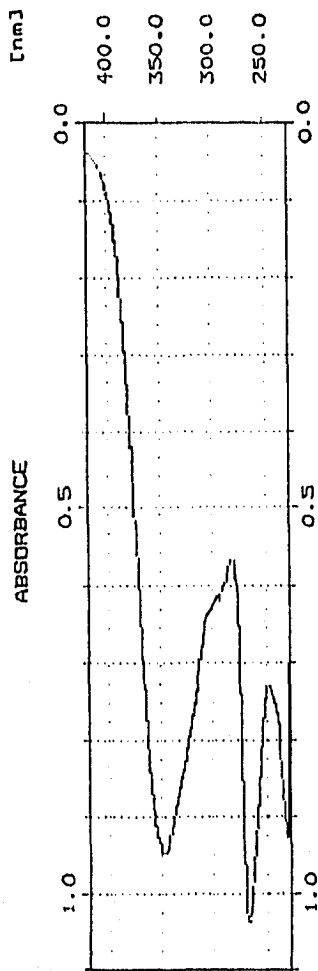


Espectro 17



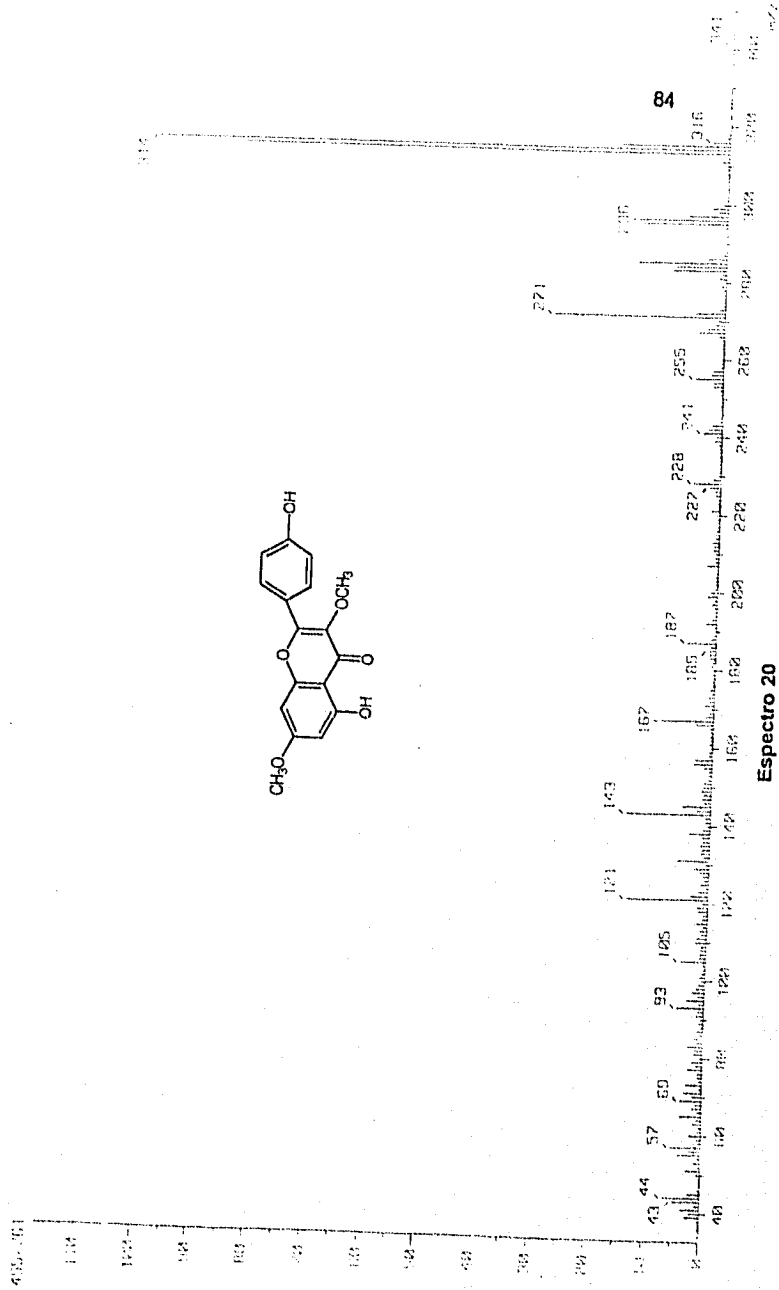
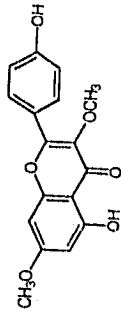
Espectro 17a



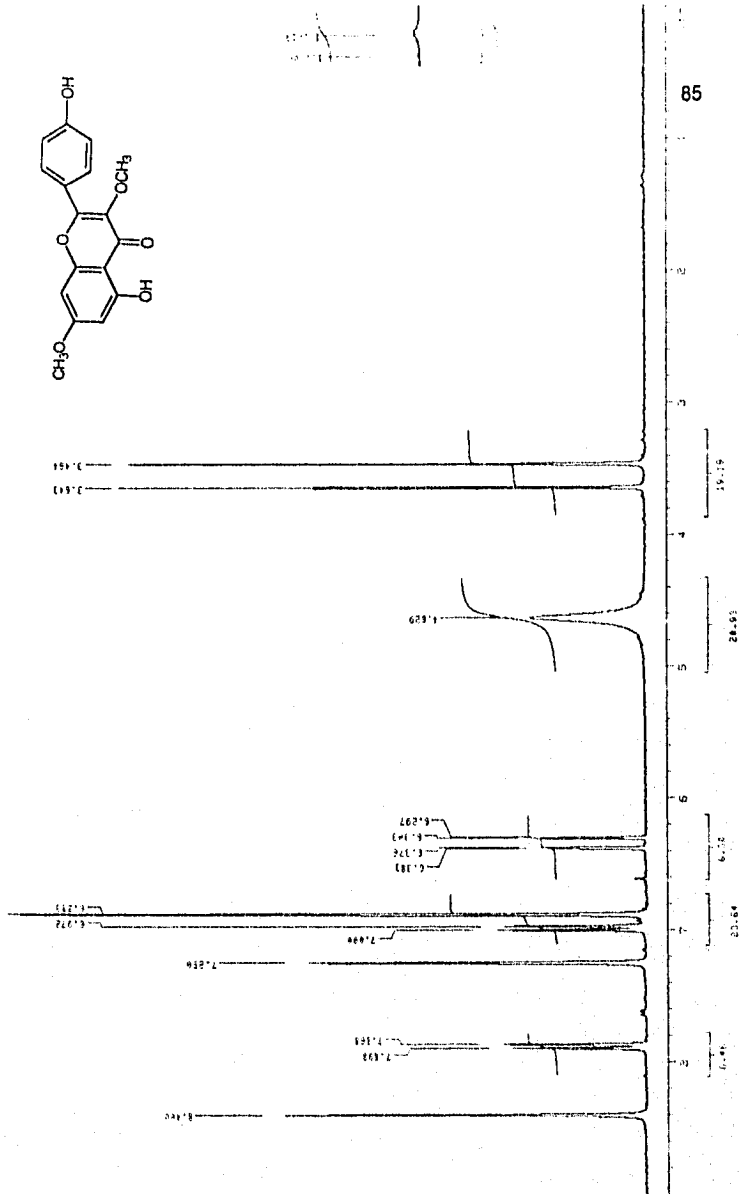
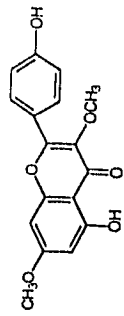


WAVELENGTH	DATA
347.6 nm (MAX)	0.949 ABS
280.9 nm (MIN)	0.567 ABS
267.0 nm (MAX)	1.041 ABS
247.8 nm (MIN)	0.732 ABS
228.1 nm (MAX)	0.933 ABS

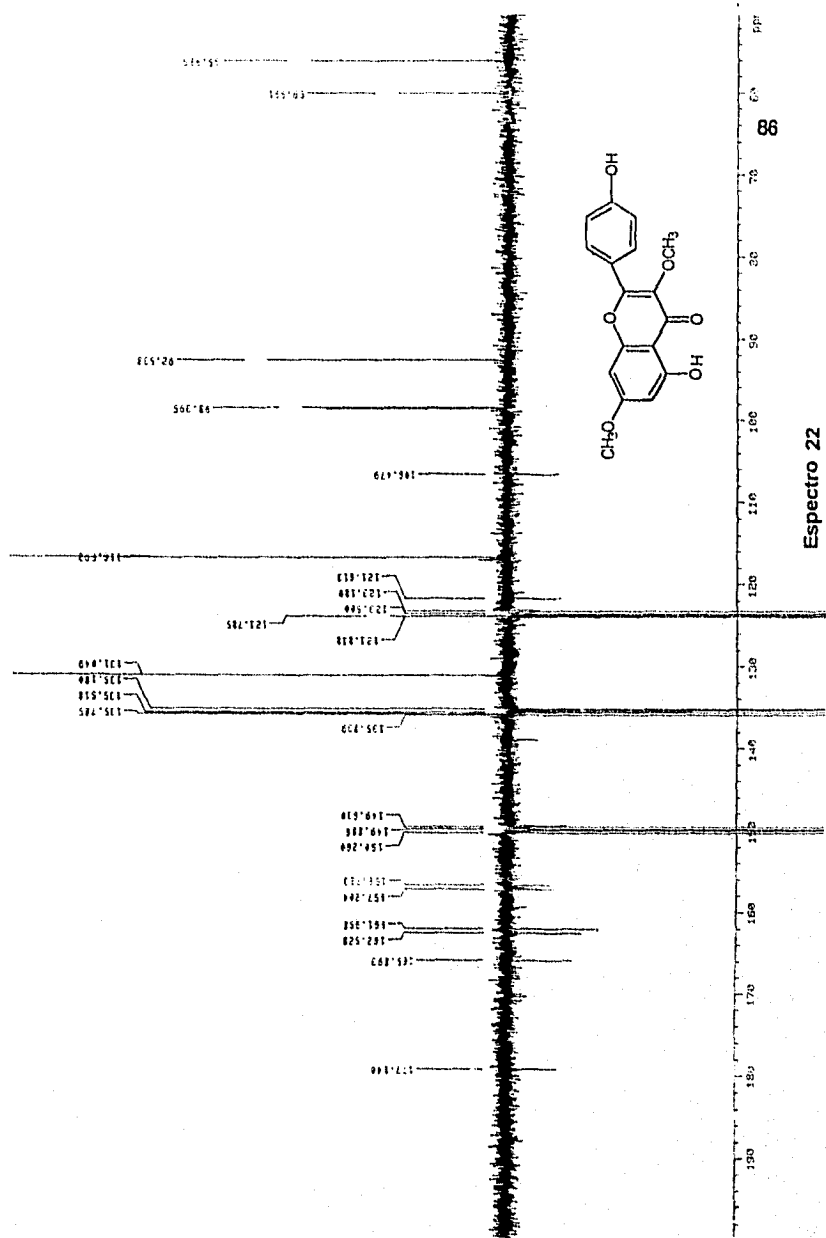
Espectro 19

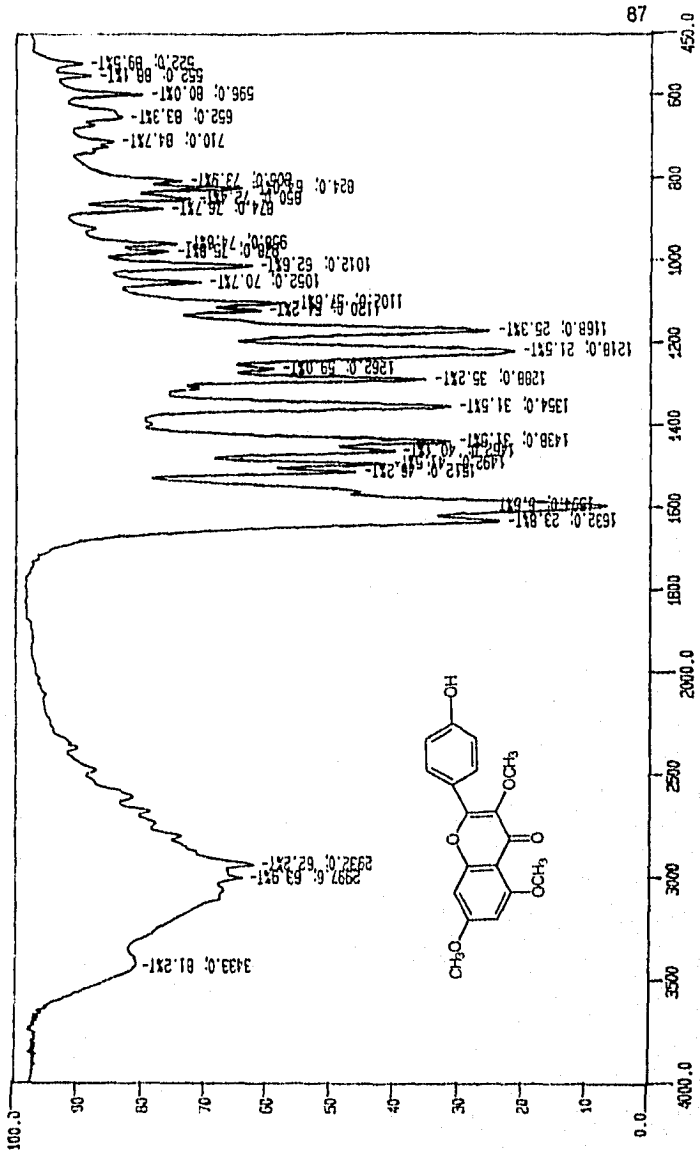


Espectro 20

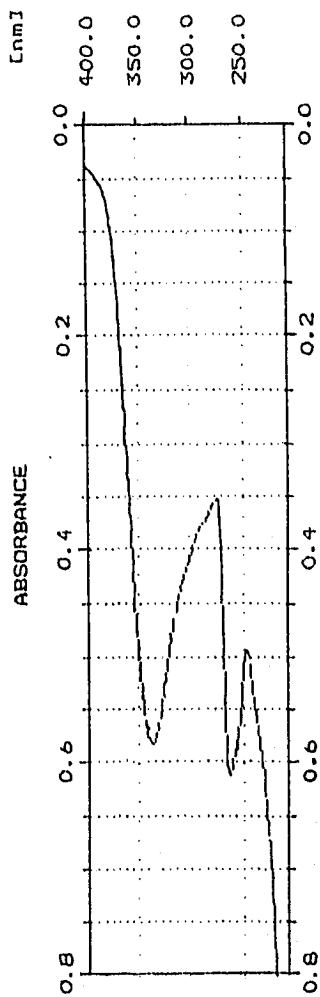


Espectro 21



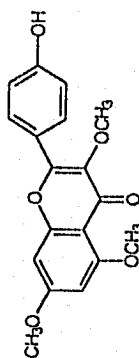


Espectro 23

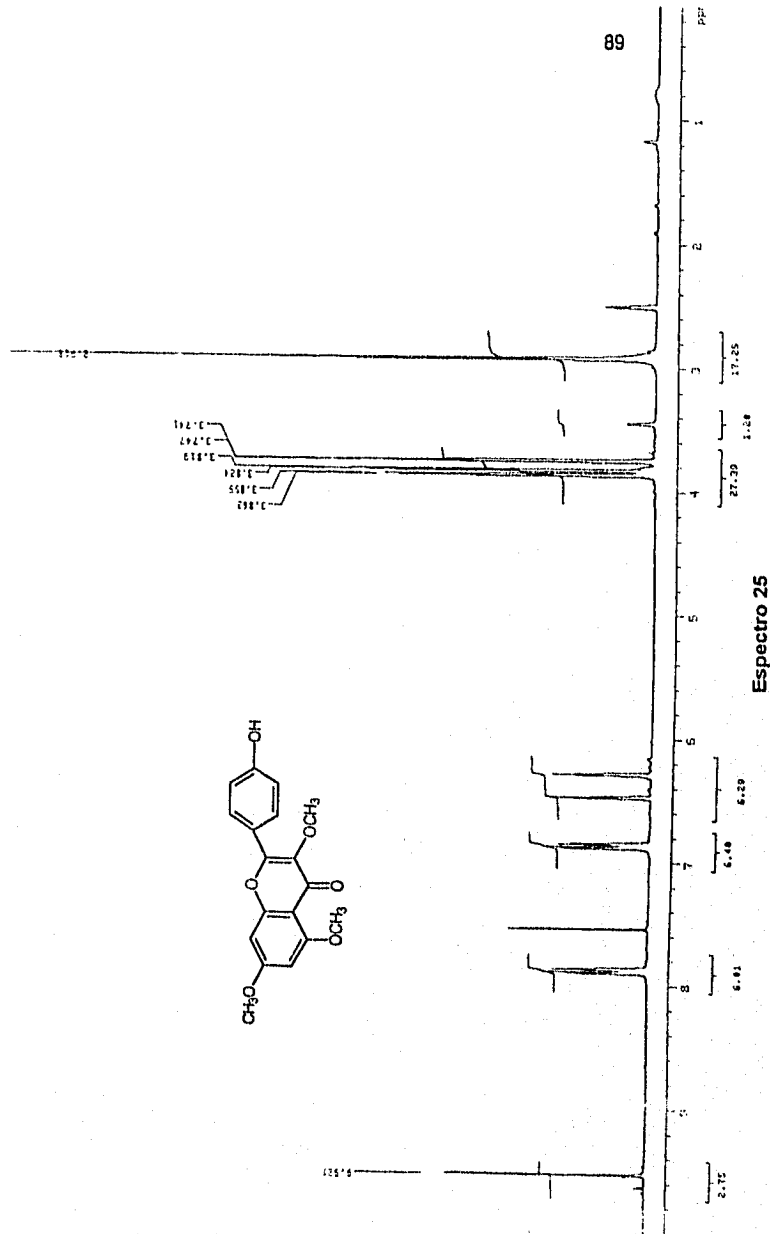


DATA
 0.585 ABS
 0.354 ABS
 0.615 ABS
 0.495 ABS

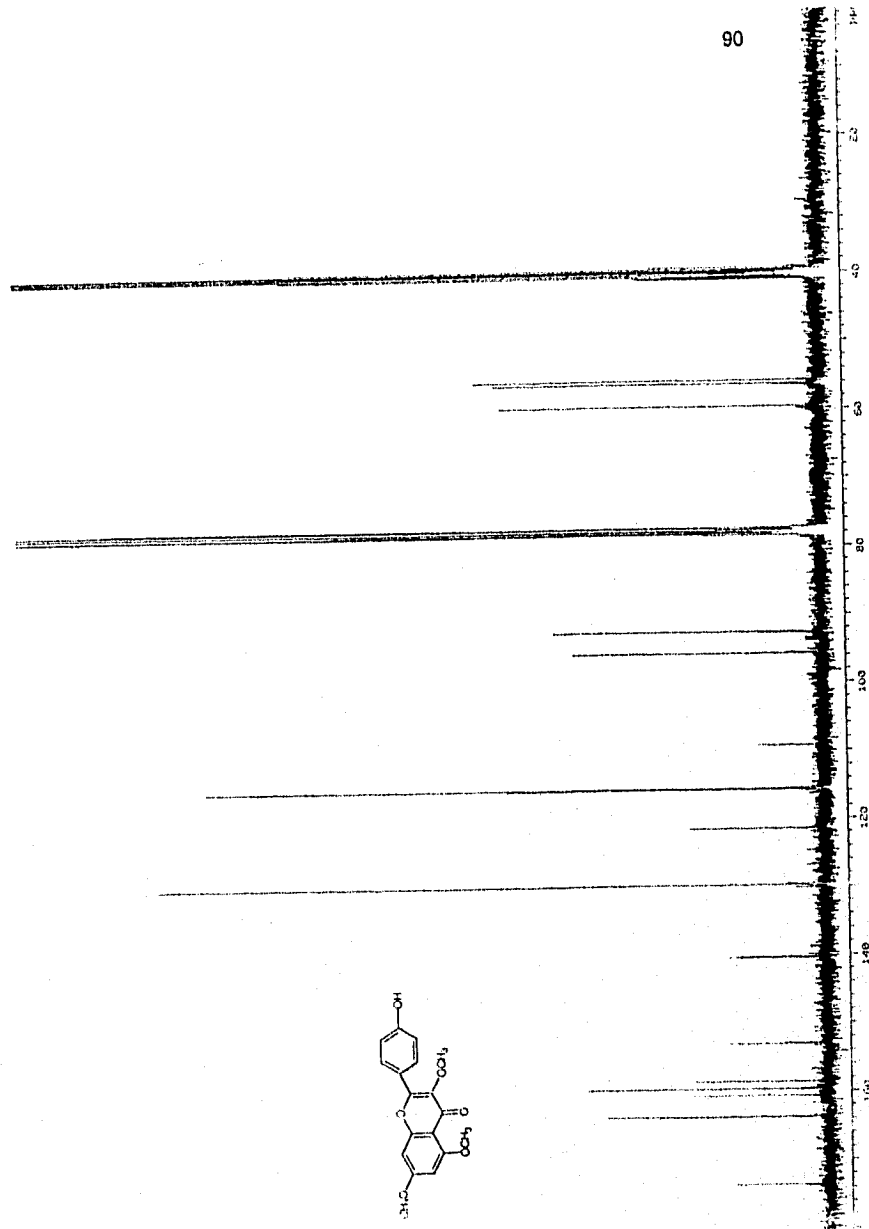
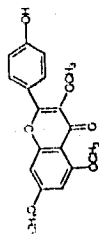
WAVELENGTH
 336.7 nm (MAX)
 276.9 nm (MIN)
 262.7 nm (MAX)
 246.0 nm (MIN)

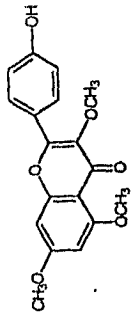
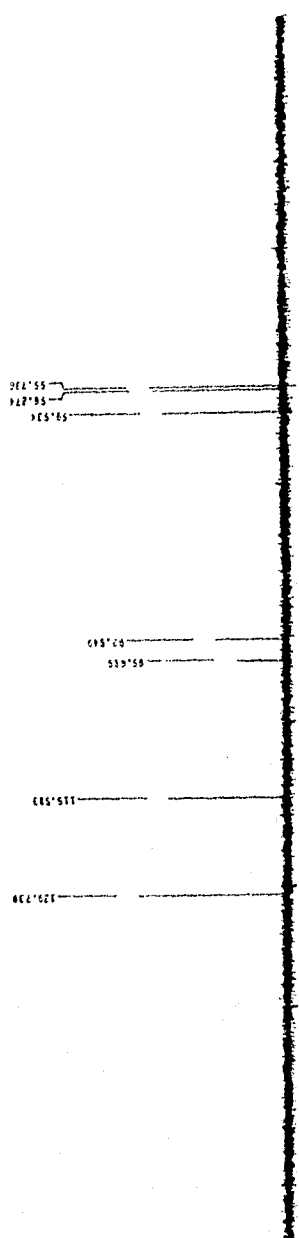


Espectro 24

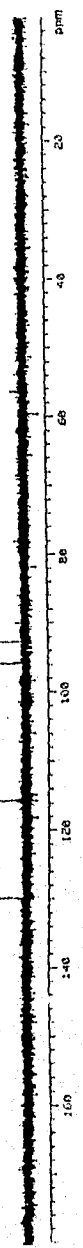


Espectro 25

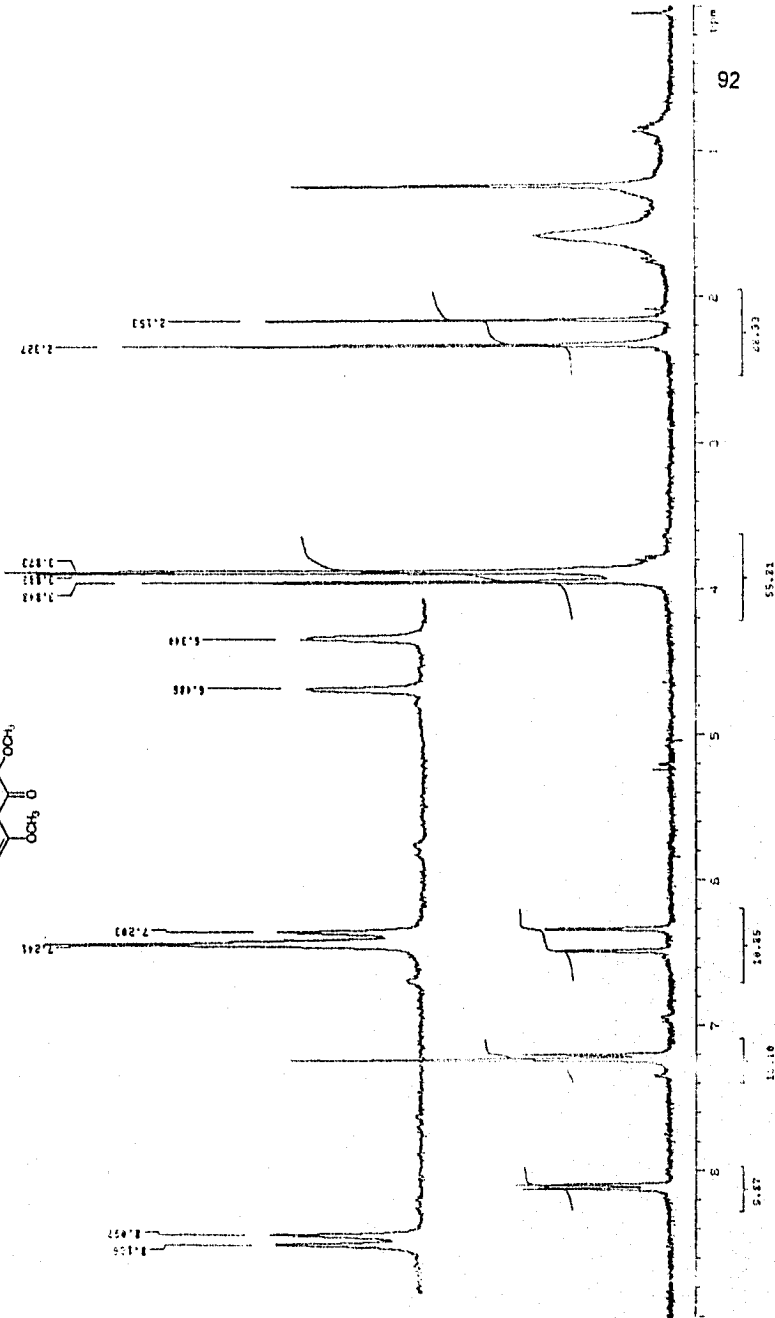
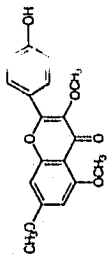




91



Espectro 26 a



Espectro 27

VII.- BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA.

- ◆ Anaya, A. L.; Calera, M.; Mata, R. y Pereda, M. R., (1990). Allelopathic potencial of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2145-2152.
- ◆ Anderson, J.; Goetz, C. M. and 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.
- ◆ Arntzen, Ch. J.; Falkenthal S. V.; Bobick S., (1974). Inhibition of Photophosphorilation by Kaempferol. *Plant Physiology* **53**, 304-306.
- ◆ Breckon, G.J., (1979). Studies in *Cnidoscolus* (EUPHORBIACEAE) I. *Jatropha tubulosa*, *J. Liebmannii* and allied taxa from Central México. *Brittonia* **31**, 125-148.
- ◆ Booth, S.; Bressani, R.; Johns, T., (1992). Nutrient content of selected indigenous leaf and vegetables consumed by the kekchi people of Alta Verapaz. Guatemala. *Journal Food Comps. Anal.* **5**, 25-34.
- ◆ Caballero, P.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Fernández, S. and Hernández, E., (1984). The isolation and molecular structure of lupeol, β -phenyl-propionate from *Cnidoscolus elasticus*, *Journal of Natural Products* **47**, 819-821.
- ◆ Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Tores, B. A.; Anaya, A. L. y Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaendron mexicanum*. Standl.(Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology*. **18**, 1025-1037.
- ◆ Cordeiro, R.; Aragao, J. and Morhy, L., (1983). The presence of histamine in *Cnidoscolus* [sic] *oligandrus* (Euphorbiaceae). *An. Acad. Brasil.Cienc.* **55**: 123-128.
- ◆ Cox, A. P. Y Balick, M. J., (1994). The etnobotanical approa to drug discovery. *Scientific American*, 82-87.
- ◆ Chawla, A. J.; Kaith, B. S.; Handa, S. S., (1991). Chemical Investigation and Anti-Inflamatory activity of *Pluchea lanceolata*. *Fitoterapia LXII*, **5**, 441-444

- ◆ Delgado, G.; Hernández, J.; Ríos, M. Y. and Aguilar, M. Y., (1994). Pentacyclic triterpenes from *Cnidoscolus multilobus*. *Planta Med.* **60**, 389-390.
- ◆ Domínguez, X. A.; Franco, R.; García, S.; Pugliese, O. and Santoyo, A., (1982). Esteres de Lupeol aislados del Latex del Chilte (*Cnidoscolus elasticus* Lundell). *Rev. Latinoamer. Quim* **13**, 82.
- ◆ Domínguez, X. A.; Sánchez, H. V.; García G. S.; Espinosa, B. G., (1992), Isolation and Identification of Xochitoldione and Isoxochitollone from *Cnidoscolus urens*. *Journal of Natural Products*. **55**, (2), 221-224.
- ◆ Donkoh, A.; Kese, A. G.; Atuahene, C. C., (1990). Chemical composition of Chaya leaf meal [*Cnidoscolus aconitifolius*] (Mill.) Johnston and availability of its amino acids to chicks. *Amin. Feed. Sci. Technol.* **30**, 155-162.
- ◆ Encarnación, R.; Coritas, G. L.; Caraveo, J. P.; Christophersen, C. and Nielsen, P. H., (1989). 5-Hidroxi- 3,7,4'- trimetoxiflavone. *Acta Cris.* **C45**, 2012-2014.
- ◆ Endo, Y.; Ohta, T. and Nozoe, S., (1991). Favelines, novel tricyclic benzocycloheptenes with cytotoxic activities from brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* **32**, 3083-3086.
- ◆ Endo, Y.; Ohta, T. and Nozoe, S., (1991). Favelanone, a novel tetracyclic cyclopropane derivate from the brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron letters* **32**, 5555-5558.
- ◆ Endo, Y.; Ohta, T. and Nozoe, S., (1991). Neofavelanone, a novel tetracyclic cyclobutene derivate from the brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron letters* **33**, 353-356.
- ◆ Fernández, C.; Fraga, B. M. and Hernández, M. G. and Arteaga, J. M., (1988). Flavonoid aglycones from some Canary Islands Species of *Sideritis*. *Journal of Natural Products* **51**, 591-593.
- ◆ Gutiérrez, M. G. y Barrientos B. T., (1994). Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial de extractos derivados de 30 especies vegetales utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana. Tesis de Licenciatura.

- ◆ Harborne, J. B., (1975). *The Flavonoids, Advances in Research Since*. Chapman and Hall, London.
- ◆ Harborne, J. B., (1986). *The Flavonoids, Advances in Research Since*. Chapman and Hall, London.
- ◆ Harborne, J. B., (1994). *The Flavonoids, Advances in Research Since*. Chapman and Hall, London.
- ◆ Hernández Salgado Julio., (1990). *Estudio Fitoquímico de Algunas Euphorbiaceae Medicinales Mexicanas. Tesis de Maestría, UNAM.*
- ◆ Herz, W.; Fitzhenry, B. and Anderson, G. D., (1973). 5,4'-dihidroxi-3,7'-dimetoxiflavona from *Ambrosia eritrocentra*. *Phytochemistry* **12**, 181-1182
- ◆ de Pascual, T.; Urones, G.; Nuñez, L. M. y Basabe, P., (1983). Diterpenoids and flavonoids from *Cistus palinhæ*. *Phytochemistry* **12**, 2805-2808.
- ◆ Lookadoo, S. E. and Pollard, A. J., (1991). Chemical contents of stinging trichomes of *Cnidioscolus texanus*. *Journal of Chemical Ecology*. **17**,(9).
- ◆ Mahato, B. S. y Kundu P.A, (1994). ¹³CMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **37**, 1517-1575.
- ◆ Martínez, M., (1959) "Las Plantas Medicinales de México", 4a Edición, Ed. Botas, México.
- ◆ Markham, K. R. y Mabry, T. J., (1975). *Mass Spectrometry of flavonoids*. (Eds. Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry H.). Academic Press, New York, 78-126.
- ◆ Markham, K. R., (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London New York.
- ◆ Martínez, M., (1979), "Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas", Fondo de Cultura Económica, México.
- ◆ Mata, R.; Contreras, J. L.; Crisanto, D.; Pereda-Miranda, R.; Castañeda, P. and Del Río, F., (1991). Chemical studies of Mexican plants used in traditional medicine, XVIII: New secondary metabolites from *Dodonea viscosa*. *Journal of Natural Products*. **54**, 913-917.
- ◆ Mc Vaugh, R., (1944), "The Genus *Cnidioscolus*; Generic Limits and Intrageneric Groups", *Bull of the Torres Botanical Club*, **71**, 457.

- ◆ Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L., (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 131-134.
- ◆ Miles, O. Ch. y Main, L. (1989). Kinetics and Mechanism of the Cyclisation of 2',6'-Dihydroxychalcone y Derivatives. *Journal Chemical Society of Perkin Trans II*, 1623-1632.
- ◆ Mueller, J., (1866). *Nachchrift zu Meiner Systematischen Arbeit uber Euphorbiaceen*. Botanische Zeitung.
- ◆ Pax, F. y Hoffman, K., (1931). Euphorbiaceae. In A Engler y K., Prantl (Eds) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Zweite Auflage*, 19,11, Leipzig : W. Engelmann.
- ◆ Pereda-Miranda, R. and Delgado, G., (1990). Triterpenoids and Flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**, 182-185.
- ◆ Rodríguez, L. V., *Estudio Fitoquímico del extracto hexánico de las raíces de Stevia salicifolia Cav. Tesis, UNAM, (1990)*.
- ◆ Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R. y Mata, R., (1992). Screening for antimicrobial active of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 275-283.
- ◆ Rouse, S. H. y Bienfag, R., (1954). "A Note on the Phytochemical Study of the Root of *Cnidocolus texanus* (Muell. Arg) Small, *J. Am Pharm Assoc.*, **43**, 699.
- ◆ Seigler, D. S. y Bloomfield, J. J., (1969), "Constituents of the Genus *Cnidocolus*", *Phytochemistry* **8**, 935.
- ◆ Shriner, R. L.; Fucson, R. C. y Curtin, D. Y., (1986). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limusa, México. D. F.
- ◆ Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. y Morrill, T. C., (1991). *Spectrometric identification of organic compounds*, 9a. Ed. John Wiley, Singapore.
- ◆ Sthal., (1969). *Thin layer chromatography*, Academic Press Inc., New York. 487.
- ◆ Urbatsch, L. E.; Mabry, T. J.; Miyajkado, M.; Ohno, N. y Yoshioka, H., (1976). Flavonol methyl ethers from *Ericameria diffusa*. *Phytochemistry* **15**, 440-441.

- ◆ Valen, F., (1978). Contribution to the knowledge of cyanogenesis in Angiosperms. 10.Comunication. Cyanogenesis in *Euphorbiaceae*. *Planta Medica* **34**, 408-413.
- ◆ Vidari, G.; Finzi, P and De Bernard, M., (1971). *Zingiberaceae*.Flavonols and quinones in stems of *Aframomum giganteum*. *Phytochemistry* **10**,. 3335-3339.
- ◆ Viletinck J. A.; 1987. Biologically active substances from traditional drugs. *Biologically active natural products*. 32-47.
- ◆ Von Reis Altschul, S., (1973). "Drugs and Foods from Little Known Plants", Harvard University Press, U:S:A.
- ◆ Wagner, H. y Proksch, A., (1985). Immunoestimulatory drug of fungi and Higher plants, Londres **1**, 113 -153.
- ◆ Wannan, B. S.; Waterhouse, J. T.; Gadek, P. A. y Quinn, C. J., (1985). Biflavonoids and affinities of *Blepharocarya*, biochemical systematic and ecology. *Phytochemistry*, **13**, 105 -108.
- ◆ Webster, G, L., (1975). Conspectus of a New Classification of the *Euphobiaceae*, *Taxon*, **24**, 593.
- ◆ Wollenweber E.; Dietz V . H. y Scillo D., (1980). A Series of Novel Flavanones from Fern exudates. *Z. Naturforsch*, **35**, 685 -690.
- ◆ Yeh, C.; Theresa, M.; Del Carmen, O. M.; Castaneda-Agullo, M.; Del Castillo, L. M., (1987). Proteinases of Mexican Plants. XIV. Chayain from the latex of *Cnidioscolus chayamansa*. *Rev. Latinoamericana Quim.* **16**, 162-163.