



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EXTRACCIÓN DE UNA SAPONINA DEL LÁTEX DE SAPIUM BILOCULARE (WATS) PAX (EUPHORBIACEAE) Y SU BIOENSAYO EN PECES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

PRESENTA

DIANA LUCIA VOUTSSAS MARQUES



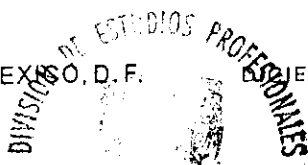
DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA CRISTINA PEREZ-AMADOR BARRON

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE

1999



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

27-1809

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.



GOBIERNO NACIONAL
DEPARTAMENTO DE
METOPOLITANO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Extracción de una saponina del látex de **Sapium biloculare** (Wats) Pax (Euphorbiaceae) y su bioensayo en peces.

realizado por **DIANA LUCIA VOUTSSAS MARQUES**

con número de cuenta **7741644-3**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario **DRA. MARIA CRISTINA PEREZ-AMADOR BARRON**

Propietario **DR. FEDERICO GARCIA JIMENEZ**

Propietario **M. EN C. GUILLERMINA MURGUIA SANCHEZ**

Suplente **M. EN C. JOSEFINA HERRERA SANTOYO**

Suplente **DRA. PATRICIA GUEVARA FEFFER**

Edna M. Suarez D.
Consejo Departamental de **BIOLOGIA**

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

**A MIS AMIGOS:
POR SU AMISTAD.**

**A MIS MAESTROS:
POR SU FORMACION.**

A LA DRA. CRISTINA PEREZ-AMADOR, POR SU VALIOSA ASESORIA Y SU CALIDAD HUMANA.

A LA BIOLOGA ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA, POR SU PARTICIPACION EN LA PARTE DE BIOENSAYOS Y EXTRACCION.

A LA MAESTRA AIDA GARCIA ARGAEZ, POR SU PARTICIPACION EN LA PARTE DE CROMATOGRAFIAS.

AL DR. FEDERICO GARCIA JIMENEZ, LA MAESTRA GUILLERMINA MURGUJA, A JOSEFINA Y PATY POR SUS VALIOSAS SUGERENCIAS EN LA REVISION DE ESTE TRABAJO.

AL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES Y A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

**EXTRACCIÓN DE UNA SAPONINA DEL LÁTEX DE *Sapium biloculare*
(EUPHORBIACEAE) Y SU BIOENSAYO EN PECES.**

TABLA DE CONTENIDO:

	Pag.
I) INTRODUCCIÓN	2
II) ANTECEDENTES:	5
a) Históricos	5
b) Botánicos	6
c) Químicos	9
d) Químico- Biológicos	18
III) UBICACIÓN TAXONÓMICA	23
a) Descripción específica	23
b) Géneros más cercanos	24
c) Ubicación geográfica	24
d) Ubicación de la zona de colecta	25
IV) MATERIAL Y MÉTODO	26
a) Forma de recolección del material	26
b) Extracción del látex con 4 diferentes disolventes	26
c) Separación de algunos componentes del extracto hexánico	30
d) Bioensayo con el extracto acuoso	30
e) Obtención de la saponina	31
f) Análisis de la estructura de la saponina	32
V) RESULTADOS	33
VI) DISCUSIÓN	40
VII) CONCLUSIONES	45
VIII) BIBLIOGRAFÍA	46

I) INTRODUCCIÓN

Sapium biloculare (S. Wats.) Pax (Euphorbiaceae) conocida como "hierba de la flecha" es importante desde el punto de vista etnobotánico ya que, desde antes de la llegada de los Españoles, el látex de esta planta era utilizado por los grupos étnicos del Noroeste del País (Opatas y Tarahumaras) como material para envenenar sus flechas.

También, machacando los troncos de árboles jóvenes y poniendo este material en arroyos y ríos se produce el aturdimiento ó muerte de los peces, siendo así capturados para consumo humano, sin mostrar efectos tóxicos. (Bradley, 1956).

Pennington (1958) cita que tanto *Sapium biloculare* como *Sebastiana pringlei* son las plantas piscicidas dominantes del cañón Urique y el Río Fuerte en el Noroeste de Chihuahua.

González y López (1983) mencionan que hace unos 30 años en algunas localidades del municipio de Alamos Macoyahui y otras del municipio de Navojoa, Sonora, en las márgenes del río Mayo, se usaban aún especies de *Sapium biloculare*, *Sebastiana pavoniana* y otras conocidas localmente como piscicidas. Entre los Tarahumaras actualmente ya no se usan estas plantas, por lo irritante del látex y porque emplean otras técnicas para la pesca, dinamita, por ejemplo. (Bye, comunicación personal).

Del género *Sapium* se han aislado diferentes compuestos, entre ellos encontramos ésteres diterpénicos del Forbol, derivados del grupo del tigliano. También se han encontrado triterpenos, flavonoides y alcaloides.

Algunos de estos grupos y sus derivados tienen importantes efectos

tóxicos y/o fisiológicos tales como:

- Promoción ó inhibición de tumores (*Aceite de Croton*).
- Inhibición de leucemia.
- Inducción de inflamación de la piel.
- Envenenamiento de peces y ganado (Evans, 1973)

De *Sapium biloculare* , en particular, existen sólo dos estudios químicos; El de Bradley (1956) y el de González y López (1983). Bradley trabajó el látex y separó dos fracciones, una soluble en etanol tóxica para animales de sangre caliente y otra soluble en agua, que consideró como saponina, tóxica para peces. No aisló ningún producto de estas fracciones.

González y López (1983) estudiaron el látex de esta planta. Del látex de esta planta aislaron una saponina la cuál caracterizaron mediante sus espectros de RMN y de IR. No determinaron espectro de Masas por lo que la fórmula que proponen es parcial y no se hizo ningún bioensayo en peces.

Tomando en consideración estos antecedentes se planteo el presente trabajo de Tesis para completar el estudio de la saponina, que es interesante, hacer un bioensayo en peces y comparar el compuesto que se obtenga con el de González y López (1983), puesto que el látex que ellos emplearon tenía algunos meses de colectado y en este trabajo se empleó látex recientemente colectado.

La Tesis se planteó bajo los siguientes objetivos:

OBJETIVOS :

Objetivo General

Determinar el efecto en peces de la saponina aislada del látex de *Sapium biloculare* mediante un bioensayo y hacer un estudio estructural del espectro de masas de la sapogenina.

Objetivos particulares

- a) Obtener la saponina y su sapogenina correspondiente.
- b) Realizar un bioensayo para determinar su actividad en peces.
- c) Mediante un patrón de fragmentación de masas determinar el Peso Molecular de la sapogenina y la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, para complementar la estructura propuesta.
- d) Hacer una separación cromatográfica del extracto hexánico obtenido del látex, para caracterizar algunos compuestos.

II. ANTECEDENTES

a) HISTORICOS.

Rusolana ,1953 (citado en González y López, 1983) , menciona que en el desierto de Sonora se establecieron 5 grandes zonas culturales. En el norte, la Pima; en el sur, la Seri; en el sureste, la Opata; más al sur los Pimas bajos y al sur de estos los Yoremes ó Cachitas (Yaquis y Mayos); al Este de estas 5 culturas se encontraban los Apaches y más al sur los Tarahumaras (Rarámuris).

Los primeros exploradores españoles del suroeste del país reportaron el uso de ciertos arbustos por los nativos de esa región, como un recurso para envenenar sus flechas.

Stanley (1920-1926) refiere que Clavijero, en su "Historia de la California" (1789), hace mención que "entre las pocas plantas de California hay algunas peligrosas; una de las cuales es cierto arbusto llamado por los españoles de la región *palo de la flecha*, de donde los nativos de la costa de Sonora obtenían el terrible veneno con el cual ellos envenenaban sus flechas y causaban heridas mortales." De acuerdo a Watson (citado por Bradley, 1956) se menciona que en el lenguaje de los Opatas se conoce como "Mago" a un pequeño árbol que contiene un jugo mortal, este fluye al hacer una incisión en la corteza, con este jugo ellos untan las flechas por lo que se conoce esta planta como *hierba de la flecha* refiriéndose muy probablemente a *Sebastiana bilocularis*.

Lewin (citado en Bradley, 1956) refiere que los nativos malayos usan la sabia de *Sapium indicum* para aletargamiento de peces y a *Sapium aucuparium* como veneno de flechas por la acción corrosiva de su látex en los tejidos.

Una práctica muy antigua en el noroeste de Chihuahua es el empleo de plantas piscicidas , predominando *Sapium biloculare* y *Sebastiana pringlei*. La corteza de árboles jóvenes la maceran y arrojan a los ríos para posteriormente hacer su pesca (Pennington, 1958).

b) BOTÁNICOS

Sapium biloculare pertenece a la familia de las Euphorbiaceae la cuál es una de la más grandes y diversificadas de las Angiospermas; Comprende alrededor de 8,000 especies en 300 géneros. Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo, son predominantemente tropicales aunque también se encuentran distribuidas ampliamente en zonas templadas. Los dos mayores centros de distribución se localizan en América y Africa.

Presentan gran diversidad en sus hábitos de crecimiento que comprende desde altos árboles hasta lianas, incluyendo arbustos, hierbas anuales y perennes, plantas acuáticas flotadoras, siendo sólo el hábito epífita el único que falta.

Sus características más comunes son: Usualmente presentan látex el cuál a menudo contiene sustancias tóxicas ó venenosas. Flores unisexuales, ovario súpero y comúnmente trilocular, placentación axial, fruto esquizocarpo, que por lo general es elásticamente dehicente (González y López, 1983.)

Por su amplitud y diversidad de formas es una familia que presenta problemas para botánicos y taxónomos.

Genero *Sapium*.

El género *Sapium* tiene aproximadamente 120 especies y está confinado a ambos trópicos, difícilmente cruza los límites geodésicos de estos. La distribución actual de *Sapium* está restringida a los neotrópicos y se corresponde al género *Exoecaria* del paleotrópico. Estos géneros están muy relacionados y sólo difieren por características morfológicas de las flores y semillas. Las especies reportadas en la República Mexicana son:

Nombre común	Nombre Científico	Distribución	Usos
Higuerillo bravo	<i>Sapium pedicellatum</i>	Sin.; Col.; Gro.; Jal. y Nay.	
Hierba de la flecha	<i>Sapium biloculare</i>	B. Cal. y Son.	Látex: Jugo cáustico y venenoso. Piscicida y veneno de flechas.
Amatillo	<i>Sapium macrocarpum</i>	Ver.; Chis.; Mor.; y Col	Antihistamínico, Látex cáustico
Hierba de la flecha	<i>Sapium apendiculatum</i>	Sur de Chih.; Sin.; Oax. y Pue.	Látex untado en flechas como veneno.
Hierba de la flecha	<i>Sapium lateriflorum</i>	Nay.; Col.; Sin.; Oax.; Camp., Tab.; Ver., Pue.; Gro. y Chis.	Veneno de flechas
	<i>Sapium nitidum</i>	Ver.; Chis.; Guatemala Belice y Honduras	
	<i>Sapium schippii</i>	Chis, Camp., Guatemala y Belice	

(González y López ,1983)

Importancia económica:

Esta Familia es de gran importancia económica ya que de ella se obtienen los siguientes productos :

- La tapioca ó cassava (*Manihot esculenta*) es una especie próxima a la patata dulce que alimenta a buena parte de la población mundial (la tapioca y otras doce especies forman la base alimenticia de la población mundial) especialmente en Sudamérica, Africa e India; sus tubérculos contienen un 75-85% de almidón, menos de 1% de proteína, vitamina C y calcio. Una desventaja de la tapioca ó cassava como alimento es que presenta un glucósido cianogénico, el cuál se elimina en su mayor parte al pelar, lavar, secar al sol y cocinar este alimento (curiosamente es la única especie tóxica utilizada en cantidades considerables en la alimentación).

- Caucho (*Hevea brasiliensis*). Es el principal suministrador de caucho en el mundo. Otros géneros productores de caucho en menor cantidad son *Manihot*, *Micandra*, *Cnidocolus* y *Euphorbia caducifolia*

- Ceras y aceites: Aceite de ricino (*Ricinus communis*), aceite de tung, ó de madera China (*Aleurites fordii*), aceite de candela (candlenut) (*A. molucana*) aceite de Croton (*Croton tiglium*) , cera de candelilla *Euphorbia antisyphilitica*.

- Grasa ó sebo vegetal de *Sapium sebiferum*. Rodeando las semillas de esta especie se encuentra sebo o grasa que es utilizado en la fabricación de cosméticos jabones y velas y del fruto se obtiene un aceite usado en la fabricación de pinturas, barnices e iluminación . (Evans,1973; Villalobos y Castellanos,1992)

- "Petróleo": Muchas especies de esta familia especialmente del género

Euphorbia, producen látex que es una emulsión de 30% de terpenos (de 30 - C) en agua y del cuál obtienen gasolina de alto octano. *Euphorbia lathyris* ha sido estudiada para este fin .

- Plantas de ornato. Por ejemplo *Euphorbia pulcherrima* ó " Nochebuena "

Algunas plantas de esta familia se han utilizado desde tiempos remotos como medicinas en el tratamiento de enfermedades como tumores, asma inflamaciones, hepatitis etc. (Evans, 1973.)

c) ANTECEDENTES QUÍMICOS.-

Desde el punto de vista químico las euphorbiáceas son una familia muy estudiada. Para 1992 Villalobos menciona que se habían investigado químicamente más de 120 especies, en su mayoría del género *Euphorbia* siendo los principales productos químicos: triterpenoides, flavonoides y alcaloides. También presentan cumarinas , glucósidos cianogénicos y taninos. En géneros como; *Aleurnites*, *Croton*, *Jatropha*, *Sapium*, etc. se encuentran esterres de alcoholes diterpénicos como el forbol, resiniferonol e ingenol (irritantes de la piel). En 1968 Hecker (citado por Evans 1973) aísla y propone una estructura del tetradecanoilforbolacetato ó TPA , el primer promotor de tumores aislado y el más ampliamente estudiado (Evans ,1973.)

El primer trabajo analítico de *Sapium biloculare* (aunque no se reportan estructuras químicas) es el de Bradley (1956) quien reporta que las hojas de *Sapium biloculare* no son tóxicas para el cuyo y que el látex es tóxico

para animales de sangre caliente y peces.

En látex encontró este autor:

-Una resina soluble en etanol tóxica para animales de sangre caliente. Su acción fisiológica consiste en una pérdida general de control muscular (0.5 a 1 mg por libra es letal por vía intravenosa).

-Una saponina, soluble en agua, venenosa para peces. (4 ppm del material concentrado es tóxico para peces dorados en 30 minutos).

Del látex seco Bradley da la siguiente composición:

	%
Resina tóxica	25
Resina no tóxica	30
Grasas y aceites	12
Proteínas	10
Saponinas	20
Gomas	2
Cenizas	1

	100

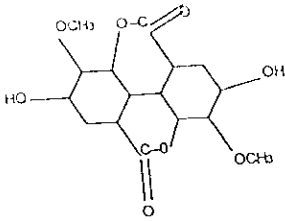
En la siguiente Tabla se mencionan los compuestos encontrados en el Género *Sapium* .

Compuestos químicos encontrados en el género *Sapium*

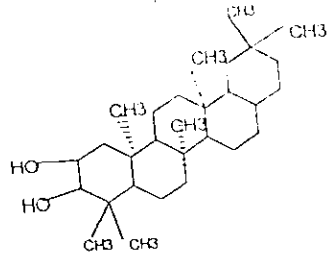
Autor	Año	Especie	Compuestos químicos	Parte empleada	Fórmula	Observaciones
Misra	1969	<i>S. eugeniaefolium</i>	Ácido 3,3-o-dimetil elálgico	Corteza	I	
Ray y Misra	1975	<i>S. baccatum</i>	Ácido acetoxialeurítico	Corteza y tallos		
Saha y Naskar	1977	<i>S. baccatum</i>	-Taraxerona, taraxerol ácido 3- acetoxi- aleurítico baccatin 2 (triterpeno).	Corteza	II	
Taylor y Gafur	1981	<i>S. indicum</i>	-Sapintoxina A 12-O-(N-metilaminoben-zoil) 13-O acetil-4-desoxiforbol	Frutos inmaduros	III	Es una planta venenosa y piscicida muy conocida en la India. Este compuesto es el primer derivado del forbol conteniendo N con el que se demuestra su actividad en vivo : Irritación en piel
Taylor y Gafur	1982	<i>S. indicum</i>	- Sapintoxina A 12-O-(n-deca-2,4,6 trienol)- 4 -desoxiforbol 3- acetato - Sapintoxina B 12-O-(n-deca-2,4,6-trienol) -4-desoxi-5- hidroxiforbol-13-acetato -Sapintoxin C 12-O- (n-deca4,6, trienol)-4,20-didesoxi-5-hidroxiforbol-13-acetato	Frutos inmaduros	III	
Taylor Williamson y Evans	1983	<i>S. indicum</i>	- Sapintoxina D 12-O-(n-metilamino-benzoil) forbol 13 acetato	Frutos inmaduros	III	Produce irritación de piel en mamíferos, así como agregación de plaquetas humanas y de conejos
Taylor y Edwards	1981	<i>S. indicum</i>	-Sapintoxina B y C Sapintoxina B, C y D	Frutos secos	III	Causan agregación de plaquetas humanas y de ratones. Irritación de la piel.

Reyes García	1982	<i>S. lateriflorum</i>	-Diterpeno con núcleo básico de Forbol	Látex	IV	Planta localizada en México, utilizada como veneno de flechas
Miana; Schmidt (citado en Reyes García)	1982	<i>S. indicum</i> <i>S. japonicum</i>	-Alcaloide 4- alfa -sapiquina -12, 13 diester de forbol		V y VI	-ésteres derivados del tigliano -compuesto 4 veces más activo que la rotenona
Taylor y Williamson	1983	<i>S. insigne</i>	1. 12 -O- 4-desoxi-16-hidroxi-forbol 13 acetato. 2. 12 -O-hexanoil 4-alfadesoxi-forbol 13 acetato. 3. 12-O-hexanoil 4-alfa-desoxi-16-hidroxi-forbol 13 acetato. 4. 12-O-dodecanoil-4-alfa-desoxi-16-hidroxi-forbol-13-acetato	Hojas y ramitas	VII	El compuesto 1 tiene actividad proinflamatoria e irritante
Evans y Fred	1973	<i>S. Sebiferum</i> <i>S. discolor</i>	Derivados del tigliano - triterpeno : friedelin - diterpeno moretenona y moretenol; - flavonoides: quercetin 3 glucósido; - diterpeno : epifriedelinol	Hojas tallos Hojas	IX X XI	Inducen la actividad de los virus Epstein-Barr: (ensayo biológico corto para detectar la promoción de tumores por substancias químicas como los diterpenos derivados del tigliano :consiste en la expresión del genoma viral E-Barr en linfoblastos humanos.
Siems, Jakupovic	1993	<i>S. rigidifolium</i> <i>S. pachystachys</i>	1 y 2) los kauranos 3 y 4) las amidas 5) ácido acatialeuritolítico 6)rigidol un diterpeno inusual. Kauranos ; lupenona, lupeol, sitosterol, ac.graso lupil sitosterol, cicloartenol, cicloartenona y lupenona	Parte aérea Corteza Ramas hojas	VIII	Plantas colectadas en Costa Rica

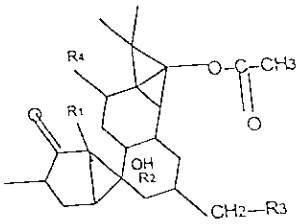
FÓRMULAS DE ALGUNOS COMPUESTOS
INCLUIDOS EN EL CUADRO ANTERIOR.



I.- Ac. 3,3-dimetilelágico

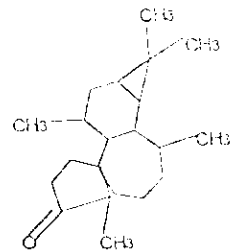


II.-Bacatin

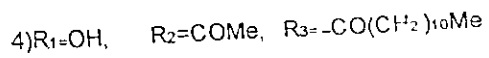
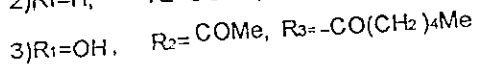
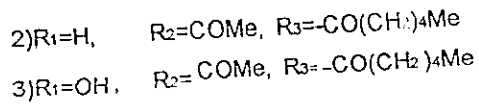
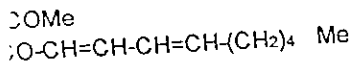
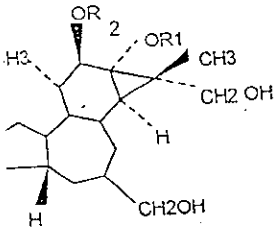
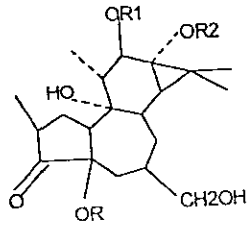
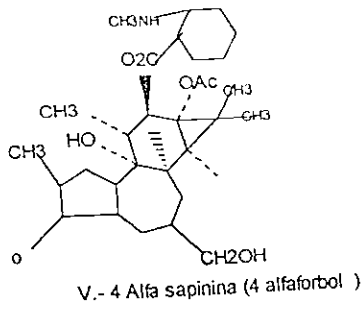


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	H	H	OH	
B	H	OH	OH	-
C	H	OH	H	-
D	OH	H	OH	-

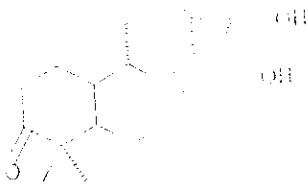
III -Sapintoxinas



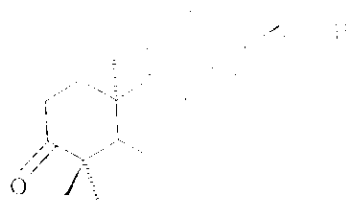
IV.- Diterpeno con núcleo básico de forbol



VII.- Derivados de forbol.

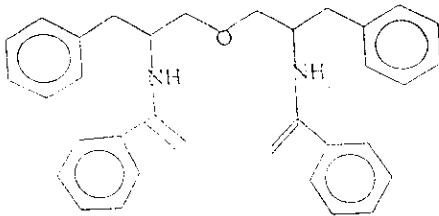


1-

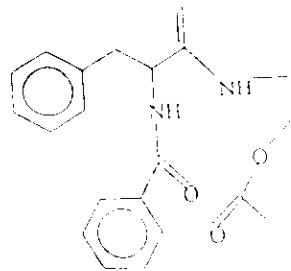


2-

1 y 2) kauranos;

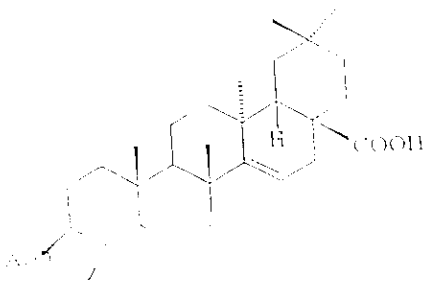


3-

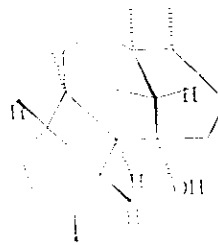


4-

3 y 4) amidas :



5) a) Amidino (10) 10



6) 10

También de *Sapium biloculare* , González y López (1983) reportan los siguientes compuestos .

Del látex :

- Una cera constituida por un alcohol y un ácido graso de 32 átomos de Carbono
- Una cera constituida por un alcohol y un ácido graso de 34 átomos de Carbono
- Un esteroide (de estructura no determinada)
- Una saponina: para la que se propone una fórmula parcial ,de estructura similar a las prostaglandinas (no se da Peso Molecular ni longitud de las cadenas laterales del anillo.)

De la corteza :

- Una fracción triterpénica (mezcla de lupeol y taraxasterol)
- Un esteroide de estructura no determinada
- Un producto para el cuál se propone , con base a la información que se tiene la fórmula tentativa de poliéter glicídico de inositol con un anillo ciclohexánico y uno piridínico.
- Un compuesto similar al anterior sin anillo piridínico y con un azúcar

d) ANTECEDENTES QUÍMICO-BIOLÓGICOS

El uso de recursos naturales como estrategia de aprovechamiento del ambiente ha sido conocido y mejorado por los grupos étnicos de todo el mundo, de forma independiente y desde tiempos muy antiguos. Un ejemplo de esto son los venenos de flechas y el uso de plantas para capturar peces en los cuerpos de agua. Machacando estas plantas y colocándolas en el agua producen aturdimiento y/o muerte de los peces. Algunos de nuestros medicamentos y piscicidas de uso común en la actualidad son fruto de los conocimientos de estos grupos, como los glucósidos cardiotónicos derivados de plantas que fueron usadas como veneno de flechas, como el curare y el piscicida de uso más frecuente en pesquerías, la rotenona, que es un derivado de plantas ictiotóxicas, como en especies del género *Derris*, entre otras.

La diversidad de plantas empleadas como piscicidas, así como cantidad empleada etc. es enorme. Como una muestra de esta diversidad están los trabajos de Thevesia (1987) quién aporta un sumario de 92 plantas, pertenecientes a 49 familias, usadas en pesca tradicional en Nepal, India. Menciona el nombre común, el nombre científico, la parte de la planta empleada y la dosis letal media (DL -50) en carpas. Jhingran, 1975 (citado en Thevesia, 1987) da un sumario de las plantas piscicidas usadas en pesquerías en la India, siendo la raíz de *Derris* (con 5% de rotenona) el piscicida derivado de plantas más ampliamente utilizado, pero a menudo es excesivamente caro ó inaccesible en los países en desarrollo, por lo que es importante buscar otros piscicidas derivados de plantas en países como Nepal, donde el suplemento de proteína animal es

reducido, 4.5 kg por persona al año, y únicamente 2 kg vienen de la pesca (Silpachi 1980, citado en Thevesia 1987).

Moretti y Grenand (1981) presentan el nombre de 25 plantas ictiotóxicas pertenecientes a 9 familias, de la Guayana francesa y países limítrofes. y las clasifican en 3 grupos:

Plantas con rotenona: (*Lonchocarpus*, *Derris*, y *Tephrosia*.)

Plantas con saponinas (Sapindáceas)

Plantas del grupo "*kunami*", nombre designado por los criollos y amerindios para plantas ictiotóxicas de las Familias *Compositae* y *Euphorbiaceae*.

Mencionan que la rotenona y sus derivados tienen el efecto de asfixiar los peces, "actúan sobre todos los animales bloqueando la respiración a nivel de mitocondrias; los animales de sangre fría son más sensibles porque no presentan un revestimiento cutáneo de protección, actúa en pequeñas concentraciones (p.p.m) y tiene la ventaja de ser inofensiva para el Humano."

Para las saponinas mencionan que modifican la tensión superficial del agua y bloquean el intercambio gaseoso a nivel de las branquias de los peces: los peces mueren por asfixia. Además de su conocida actividad hemolítica las saponinas presentan propiedades secundarias que les confieren una cierta toxicidad.

González y Schenkel (1987) menciona plantas ictiotóxicas conocidas en Sudamérica desde tiempos antiguos: De la Familia Sapindaceae, los géneros *Sapindus*, *Serjania*, y *Paulinia*; de la Familia Euphorbiaceae, los géneros : *Tephrosia*, *Derris*, *Lonchocarpus*, de la Familia Leguminosae-Papilionoideae :

Ateleia glasioviana y de las Sapindaceae : *Thinouia coriacea* . De estas 2 últimas plantas muy conocidas en Brasil como piscicidas hicieron extracciones y determinaron su L-D,50 (Dosis letal media).

Texeira y Lapa (1984) comparan los efectos de los principios activos (serjanósidos A B y C: saponinas triterpenoides) aislados de una planta piscicida usada en Brasil: *Serjania lethalis* (Sapindaceae), en peces y mamíferos, con la rotenona. Se sabe que la rotenona actúa inhibiendo la NADH deshidrogenasa bloqueando la cadena respiratoria. Por otra parte los serjanósidos son las saponinas piscicidas más potentes (10 -50 veces la actividad de otras saponinas y 10 veces menos potente que la rotenona) . La adición de serjanósido B (20 mg / ml) en un bioensayo con "guppis" produce nado irregular a los 5 min, hipoactividad y muerte en 5 hs.

En mamíferos (ratas y ratones) cuando se aplican serjanósidos B vía intravenosa en dosis de 5 -50 mg/Kg , producen disnea, cianosis y en dosis altas la muerte. Los efectos tóxicos observados después de su aplicación son indicativos de un pobre intercambio de oxígeno, al mismo tiempo se afectan la presión sanguínea y la tasa respiratoria y cardiaca . Se sabe que las saponinas son drogas hemolíticas, esto explicaría la hipotensión y cianosis observada, pero se propone que la toxicidad no sea resultado unicamente de su actividad hemolítica. En estudios *In vitro*, con diafragma de ratón incubado con 25-100 microgramos /ml se desarrollan contracciones proporcionales a la concentración y con dosis de 50 microgramos / ml de serjanósidos B o con saponina Merck , se induce la despolarización de las fibras musculares.

Se concluye en este artículo que los efectos de estos serjanósidos son

Se mencionan a continuación estas plantas piscicidas:

Familia	Nombre	Parte empleada
Amarillidaceae	<u><i>Aqave bicomuta</i></u>	raíces y hojas
	<u><i>Aqave lechuquilla</i></u>	raíces y hojas
	<u><i>Aqave schotti</i></u>	raíces y hojas
	<u><i>Aqave sp</i></u>	raíces y hojas
Compositae	<u><i>Bacharis glutinosa</i></u>	hojas y tallos
	<u><i>Cacalia decomposita</i></u>	planta entera
Hicoriaceae	<u><i>Carya illinoensis</i></u>	hojas y corteza
Rutaceae	<u><i>Casimiroa edulis</i></u>	planta entera
	<u><i>Casimiroa sapota</i></u>	planta entera
Umbelliferae	<u><i>Conium maculatum</i></u>	raíces
Compositae	<u><i>Dyssodia anomala</i></u>	raíces y hojas
"	<u><i>Gilia macombii</i></u>	hojas y tallos
"	<u><i>Ipomopsis thurbi</i></u>	raíces y hojas
Juglandaceae	<u><i>Juglans rupestris</i></u>	hojas y corteza
"	<u><i>Ligusticum porteri</i></u>	raíces
Leguminosae	<u><i>Mimosa dysocarpa</i></u>	raíces
Polygonaceae	<u><i>Polygonum pennsylvanicum</i></u>	planta entera
	<u><i>Polygonum punctatum</i></u>	planta entera
	<u><i>Polygonum sp.</i></u>	?
Rosaceae	<u><i>Prunus capuli</i></u>	hojas y corteza
"	<u><i>Prunus persica</i></u>	hojas y corteza
"	<u><i>Purshia tridentata</i></u>	hojas
Euphorbiaceae	<u><i>Sapium biloculare</i></u>	corteza
"	<u><i>Sebastiana pringlei</i></u>	corteza
Compositae	<u><i>Senecio hartwegii</i></u>	raíces y hojas
Iridaceae	<u><i>Sisyrinchium arizonicum</i></u>	raíces
Compositae	<u><i>Stevia salcifolia</i></u>	raíces y tallos
Leguminosae	<u><i>Tephrosia leiocarpa</i></u>	raíces
	<u><i>Tephrosia talpa</i></u>	raíces
Compositae	<u><i>Viqueria decurrens</i></u>	raíces
Liliáceae	<u><i>Yucca decipiens</i></u>	raíces y hojas
Compositae	<u><i>Zexmenia podocephala</i></u>	raíces y hojas.

diferentes en peces y mamíferos porque la cianosis, disnea, alteraciones de la presión, tasa respiratoria y cardíaca, despolarización de la membrana y hemólisis también se presentan en mamíferos con saponinas no tóxicas para peces, a concentraciones similares. Se menciona que en mamíferos este efecto está relacionado a acciones no específicas de superficie a nivel de membrana.

Según Boiteau y Ratsimamanga (1964) la actividad piscicida de las saponinas puede explicarse por su conocida actividad hemolítica, ésta es debida a que estos compuestos se unen fuertemente con compuestos de la membrana , principalmente colesterol , aumentando su permeabilidad lo que ocasiona en peces el daño observado en las células del epitelio branquial y su desprendimiento , lo que produce su asfixia.

Overton (citado en Boiteau , 1964) menciona que la muerte de anfibios sometidos a soluciones con saponinas ,se debe no sólo a la toxicidad de la saponina sino también a un *choque osmótico* ya que, cuando se iguala la concentración de sales del medio con la del plasma se observan las mismas lesiones de una exfoliación producida en una solución hipotónica de saponinas , pero el animal sobrevive más tiempo , generalmente más de 24 hs .

Finalmente, Pennington (1958) comenta que "la estupefacción de peces es practicada durante todo el año por los Tarahumaras del oeste de Chihuahua, México, pero es especialmente importante en los meses de marzo y junio, cuando las reservas de alimento son escasas. En estas áreas se reporta el uso de plantas pertenecientes a 13 diferentes Familias con propiedades piscicidas ó estupefacientes. La forma de uso, principio activo, parte empleada y potencia de cada planta es variable".

III UBICACIÓN TAXONOMICA

DIVISION	Embriophyta siphonogama
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotyledonae
ORDEN	Geraniales
FAMILIA	Euphorbiaceae
GENERO	<u>Sapium</u>
ESPECIE	<u>Sapium biloculare (S. Wats.) Pax</u> <u>Sapium biloculare var. Biloculare *</u>

* Clasificación según Engler (citado en Stanley, 1920-1926)

a) Descripción específica de Sapium biloculare (S. Wats) Pax.

Arbusto ó árbol pequeño de 6 m de alto, corteza de color canela o grisácea, hojas glabras y lisas; estípulas de cerca de 1 mm de largo , peciolos de 1-6 mm de largo, láminas lanceoladas de 5 - 15 cm de largo y 3 - 5 cm de ancho, ligeramente glandulares, aserradas, de agudas a obtusas en el ápice, obtusas en la base.

Espigas de 1 a 4 cm de largo, brácteas anchas y ovaladas; inflorescencias masculinas de 3 a 7 flores; estambres 2 a 3; flores femeninas con 2 lóculos.

Esquizocarpo de cerca de 1 cm de largo y anchamente ovado, agudo hacia el ápice, liso; semillas sin carúnculo de 6 a 7 mm tan largas como anchas, pardo oscuras.

b) Géneros más cercanos

Los géneros más cercanos son *Sebastiania* y *Stillingia*, ya que morfológicamente son muy parecidos y las diferencias son básicamente por las brácteas de la inflorescencia y las glándulas del peciolo, en cuanto a número y situación de las mismas .

Sebastiania tiene semillas carunculadas, *Stillingia* y *Sapium* no las tienen; en *Stillingia*, por lo general , las flores femeninas son solitarias y en *Sapium* se pueden presentar en grupos.

c) Ubicación geográfica

Sapium biloculare se encuentra en la zona baja del desierto de Sonora, en la región de Maricopa, Arizona y a través de áreas del desierto de Sonora y Baja California; florece y fructifica de Marzo a Noviembre. Los arbustos o árboles pequeños están comúnmente dispersos, se localizan en laderas rocosas y ocasionalmente en suelos planos, entre los 300 a 600 m s n m a lo largo de pendientes y suelos arenosos de lechos de ríos secos.

El tipo de vegetación que se encuentra en la zona de colecta es un bosque Xerófito, como el que se localiza en la parte meridional de baja California Sur, en altitudes entre 500 a 1000 m s n m este se presenta relativamente espaciado y bajo (árboles de 6 a 14 m de alto) que por sus demás características debe clasificarse como bosque tropical caducifolio, aunque

por rasgos climáticos cabría en Bosque espinoso.

Entre las especies dominantes de este tipo de vegetación, se encuentra *Lysiloma*, *Jatropha*, *Cyrtocarpa edulis*, *Bursera laxiflora*, *Senna atomaria*, *Sapium biloculare*, *Busera microphylla*, *Flumeria acutifolia*, *Yucca sp.* (Rzedowski, 1978.).

d) Ubicación de la zona de colecta

El material de estudio se recolectó a 16.5 Km al NO de Tezopaco, por la carretera Tezopaco Movas a unos 300 m del camino, sobre el lecho de un arroyo seco. El pueblo de Tezopaco se encuentra a aproximadamente 50 Kms al NE de Ciudad Obregón, Sonora.

Características climáticas - Tipo: BS hw; clima seco B, subtipo semiseco (BS), con lluvias de verano y precipitación entre 5 y 10 mm anuales.

La precipitación media anual en la zona es de 500 a 600 mm durante más de 30 años. En la estación 26-140, la más cercana a la zona de colecta es de 610.1 mm.

Temperatura media anual de 20-22 °C (en un periodo de 10 - 19 años). En la estación 26- 140 es de 21.5 °C

Altitud de la localidad de recolecta entre 200 y 600 m s n m (Atlas del medio físico, 1979).

IV MATERIAL Y MÉTODOS.

a) Recolección del material .

El látex se recolectó de árboles jóvenes al NO de Tezopaco, cerca de Ciudad Obregón, Sonora.

Se hizo un corte longitudinal en la corteza y se comprimió el área, doblando el tallo hasta que escurrieron gotas de látex , que se colectó en un frasco y se congeló.

b) Extracción

El látex se trabajó inmediatamente. Se descongeló, se secó sobre baño de vapor y debido a que su aspecto era gomoso se modificó el sistema de extracción selectiva empleada por González y López (1993). La extracción se empezó con hexano y se continuó con acetona, etanol y finalmente agua.

Extracto hexánico

El látex seco se extrajo 3 veces con 100 ml de hexano durante una hora en frío, El extracto se concentró en el rotavapor, se evaporó a sequedad y se pesó .

Extracto acetónico

Después de la extracción hexánica, el residuo sólido en forma de polvo se extrajo con 75 ml de acetona, en frío; durante 8 h 3 veces (con agitación magnética); El extracto acetónico se concentró en el rotavapor, se llevó a sequedad y se pesó .

Extracto etanólico.

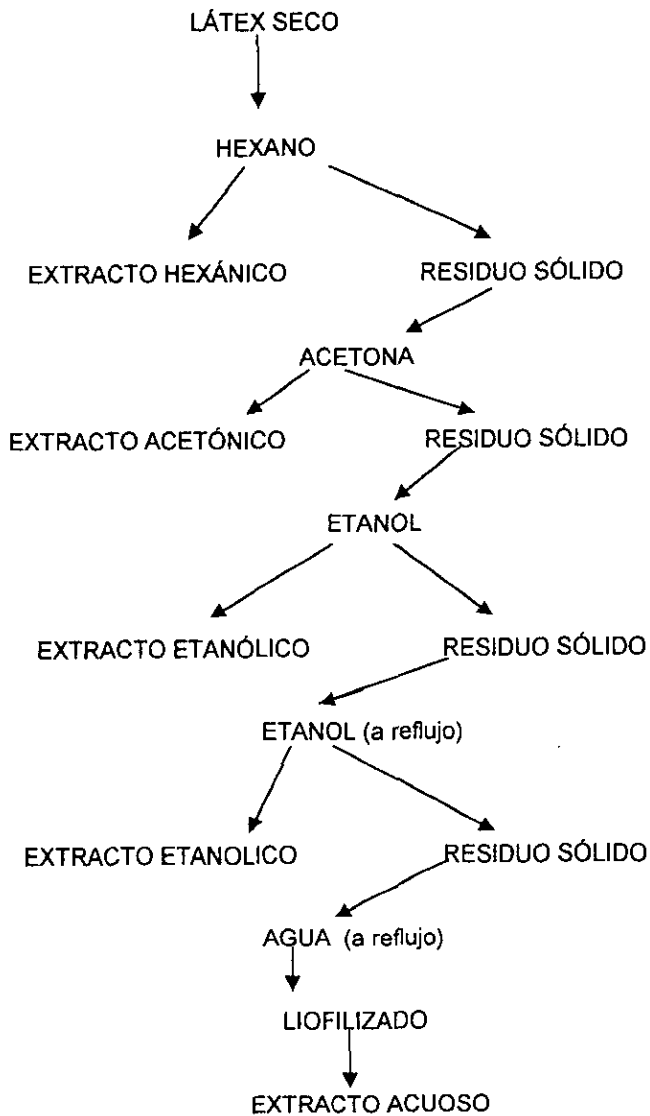
El residuo sólido proveniente de la extracción acetónica , se extrajo con 75 ml de etanol, en frío, durante 8 h 3 veces y se filtró. El extracto se concentró en el rotavapor, se evaporó a sequedad y se pesó .

El residuo sólido, de la extracción etanólica anterior se extrajo a reflujo con 100 ml de etanol durante 8 h 3 veces. En el extracto etanólico se formó un precipitado blanquizco el cuál se separó filtrando al vacío y se colocó en el desecador. El filtrado se concentró en el rotavapor, se evaporó a sequedad y se pesó .

Extracto Acuoso

El residuo sólido de la última extracción etanólica se llevó a reflujo con 100 ml de agua durante 8 h , 3 veces. Se filtró y posteriormente se liofilizó.

DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN.



Pruebas para determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios:

Las pruebas para grupos de metabolitos secundarios se efectuaron con el propósito de identificar solamente glicósidos en el extracto acuoso (saponinas) y terpenos en el extracto hexánico y la fracción cromatográfica **N** de este ,la única que fué sólida y se trabajó.

Prueba de Molish para glucósidos :

En un pequeño tubo de ensaye se mezcló 1 mg de extracto acuoso con 2 gotas de solución al 5 % de alfa- naftol en etanol y por la pared del tubo se resbaló ácido sulfúrico concentrado .

Prueba de Liberman -Burchard para terpenos y esteroides

Se mezcló 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfriaron a 0° C y se les añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado. Un ml. de este reactivo se puso en contacto con la solución clorofórmica de los extractos etanólicos y la fracción **N** de la cromatografía del extracto hexánico .

c) Separación de algunos componentes del extracto hexánico

Cromatografía en columna del extracto hexánico

- Se montó una columna cromatográfica de 102 cm de largo X 5 cm de diámetro, con 453 g de gel de sílice (G 60 Merck) y hexano
- Se adicionaron 6 g del extracto hexánico disueltos en hexano .
- La columna se eluyó principiando con hexano y después aumentando la polaridad con acetato de etilo.
- Se colectaron 273 fracciones de 50 ml y se reunieron las que tuvieron perfiles similares en las placas de control de la separación (Tabla 3)

La fracción **C** (que presentó un olor agradable) se analizó por cromatografía de gases .

La fracción **N** fué un sólido blanco al cuál se le hizo una prueba cromogénica de Libermann-Buchard y se corrió una placa cromatográfica contra beta-sitosterol y lupeol como marcadores y utilizando como eluyente hexano- AcOEt 4 : 1 .

d) Bioensayo.-

Se emplearon 6 peceras de 29 x 17 x 14 cm con 5 l de agua cada una, azul de metileno y anticloro. Se dejaron reposar 24 h se les adicionó también grava y se colocó un filtro tubular y aereación.

En cada pecera se pusieron 10 "guppies" *Lebistes reticulatus* con alimento sintético marca Tetra-Peréz, después de 72 h se inició el Bioensayo .

En dos peceras se adicionó el extracto acuoso liofilizado, en otras dos el anestésico para peces MS 222, a concentraciones iguales y 2 se dejaron para la prueba en blanco. Las concentraciones que se probaron fueron:

0, 1, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/l . En el momento de aplicación de las sustancias (extracto acuoso y MS-222) se suspendió la aereación y la alimentación durante 24 horas. Se hicieron observaciones inmediatamente, a los 15, 30, 60 minutos y a las 24 horas (Tabla 7). El experimento se repitió 3 veces ,hasta probar todas las concentraciones. En un 4º ensayo se probó una concentración de 40 mg/l de extracto acuoso, pero esta vez con aereación .

e) Obtención de la saponina

Se hizo una hidrólisis del extracto acuoso liofilizado que contiene la saponina para obtener la sapogenina y los azúcares correspondientes.

A un gramo del extracto acuoso liofilizado, se le agregaron 150 ml de HCl 2N en Et-OH al 50% más 100 ml de benceno y se refluxó con agitación por 4 hrs. Terminada la reacción la mezcla se colocó en un embudo de separación y se separó la fase bencénica (conteniendo la sapogenina) y la fase acuosa (que contenía los azúcares). La fase acuosa se extrajo con 50 ml de benceno ,3 veces , se reunieron los extractos bencénicos , se lavaron con 50 ml de agua destilada, 3 veces; se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró en el rotavapor, se evaporó a sequedad y se pesó .

Con la fase acuosa de la reacción se corrió una cromatografía en capa delgada contra patrones para identificar el azúcar de la saponina, empleando como eluyente CHCl₃-MeOH-NH₄ OH 4 : 4 : 3 .

V RESULTADOS.

TABLA 1.- RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DEL LÁTEX SECO , A PARTIR DE 18.86 g.

EXTRACTO	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hexánico (en frío)	13.90	73.70
Acetónico (en frío)	0.50	2.65
Etanólico (en frío)	0.73	3.87
Etanólico (en caliente)	0.69	3.66
Acuoso (en caliente)	2.33	12.35

TABLA 2.- PRUEBAS PARA DETERMINAR GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS .

Extracto	Prueba	Resultado
- hexánico	Liberman-Burchard	positivo (verde pardo, mezcla del verde de los terpenos y rosa de los esteroides.)
- fracción N de la columna cromatográfica	"	positivo
- acuoso liofilizado	Molish	positivo (anillo violeta)

TABLA No. 3

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO HEXANICO DE
Sapium biloculare

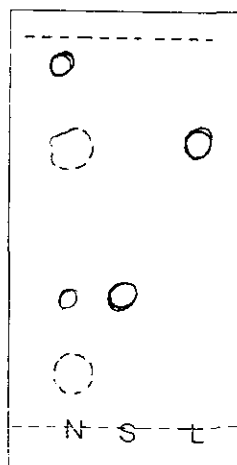
Fracciones	Eluyente	Características	P f °C	Peso (g)
1-10 (A)	HEXANO	No se obtuvieron residuos de estas fracciones		
11-13 (B)	"	Aceite aromático		
14-18 (C)	"	Aceite aromático		
19-33 (D)	"			.0256
34-45 (E)	Hexano-Acetato de Etilo 95:5	Aceite amarillo		.0091
46-50 (F)	"	Aceite amarillo		.0023
51-63 (G)	"	Aceite amarillo		.0048
64-68 (H)	"	Aceite amarillo		.0011
69-72 (I)	"	Aceite amarillo		.1728
73-81 (J)	Hexano:Acetato de Etilo 90:10	Aceite amarillo		.0185
82-87 (K)	"	Aceite amarillo		.0043
82-96 (L)	"	Aceite amarillo		.1131
97-101 (M)	Hexano: Acetato de etilo 85:15	Aceite ambar		.0694
112-117 (N)	"	Sólido blanco		.1138 pf=122-125 °C
118-148 (O)	"	Aceite amarillo		.8422
149-156 (P)	Hexano:Acetato de Etilo 75:25	Aceite amarillo obscuro		2.0146
157-159 (Q)	"	Cera		.1955
160-194 (R)	Hexano:Acetato de Etilo 65:35	Cera		.8952
195-208 (S)	Hexano:Acetato de Etilo 55-45	Aceite ámbar		.1840

Nota : La cromatografía se continuó hasta eluir con acetato de etilo 100 % colectándose en total 273 fracciones. Todas estas fracciones fueron aceites y ceras como las de la tabla 3 , por lo que ya no se incluyeron.

Tabla 4 .- Componentes de la fracción aromática C de la cromatografía del extracto hexánico.

Compuesto	Tiempo de retención	%
Alfa – pineno	3.80	3.33
Canfeno	4.90	16.22
Beta – pineno	5.34	8.69
Limoneno	5.85	12.18
alfa –felandreno	6.28	4.96
Beta –felandreno	6.56	9.38
cineol (eucaliptol)	7.61	15.24
Acetato de linalilo	16.53	3.04

Fig 1.- Placa cromatográfica de la fracción N



N .-fracción N

S .- beta- sitosterol

L .- lupeol

Eluyente : hexano- AcOEt 4 : 1

Tabla 5 . Espectrometría de la saponina

Resonancia magnética protónica

<u>Grupo funcional</u>	<u>Señal</u>
2- CH ₃	0.83
-CH ₂ -	1.25 (intensa)
-OH	1.75
2 H+ vecinos a carbonilo	2.2 y 2.57
1- H+ base de oxhidrilo	4.15

Tabla 6 . Espectro de masas

Fragmentos

M+ = M- 18 = 362 (ion molecular)
m/e = 155 - cadena de 11 Carbonos
m/e = 127 -cadena de 9 carbonos
m/e = 80 - núcleo dihidrofuránico
m/e = 54 } fragmentación en el núcleo furánico
m/e = 308 }

Azúcar de la saponina -El azúcar que forma la saponina se identificó como xilosa por comparación con patrones corridos en placa delgada.

BIOENSAYO:

Al tiempo 0 no se observó ningún cambio, a ninguna concentración , con ninguna substancia.

Con el anestésico MS-222: a las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/l tampoco se observaron cambios en la actividad de los peces; con las concentraciones de 20, 30 y 40 mg/l , hay cambios desde los 15 minutos, hasta las 24 horas. Conforme aumenta el tiempo de exposición y la concentración disminuye la movilidad (menor nado y movimiento de las aletas) de todos los peces de cada pecera.

Con la saponina: a partir de los 15 minutos hay peces afectados en todas las concentraciones ; Los de la concentración de 1 mg / l se recuperan a los 60 minutos; En las concentraciones de: 5, 10, 20, 30 y 40 mg/l , la actividad de los peces afectados (1 ó 2 por pecera) permanece disminuida, después de 24 horas estos peces muestran poca movilidad, se van de lado y tienen la cola plegada. Los demás peces suben a la superficie toman aire y luego bajan. Al ponerles la bomba de aereación después de 24 hs , se dirigen a esta y casi inmediatamente se recuperan, no así los peces afectados , cuya recuperación es más lenta. (Tabla 7).

En el ensayo con la saponina a una concentración 40 mg/l y aereación No se observaron cambios en la actividad de los peces.

TABLA 7. OBSERVACIONES DE LA CONDUCTA DE LOS PECES EN EL BIOENSAYO.

Pecera	Conc. (mg/l)	Substancia	Tiempo : Inmediatamente	15 minutos	30 minutos	60 minutos	24 horas
1	1	Saponina	Sin cambios	2 peces quietos en la superficie	Igual que a los 15 min	los peces ya no están en la superficie.	Los peces que estaban en la superficie quietos, tomando aire , están más activos . Al ponerles la bomba de aire se dirigen a ésta casi inmediatamente.
2	5	"	Sin cambios	1 pez quieto en la superficie, a los 10 minutos se le pliega la cola y se hunde verticalmente; sube a la superficie y se queda quieto	Igual que a los 15 min	El pez afectado se reanima ligeramente.	Los peces toman aire de la superficie, el pez afectado está mucho menos activo que los demás.
3	10	"	Sin cambios	1 pez se queda en la superficie y da una especie de bocanadas.	Igual que a los 15 min	Igual que a los 30 min	Los peces tomando aire en la superficie
4	1	Anestésico MS 222	Sin cambios	= No se observan cambios.	Igual que a los 15 min	Igual que a los 30 min	Los peces están en la superficie y abren más la tapa de las branquias, pero están activos.
5	5	"	Sin cambios	=	Igual que a los 15 min	Igual que a los 30 min	Los peces están en la superficie y abren más la tapa de las branquias, pero están activos.
6	10	"	Sin cambios	=	Igual que a los 15 min	Igual que a los 30 min	Los peces están en la superficie y abren más la tapa de las branquias, pero están activos.
	0	Control	Sin cambios	=	Igual que a los 15 min	Igual que a los 30 min	Los peces están en la superficie , tomando aire, activos.

Nota : En cada pecera se colocaron 10 peces

TABLA 6. -CONTINUACIÓN

Peces	Conc. (mg/l)	Substancia	Tiempo Inmediatamente	15 minutos	30 minutos	60 minutos	24 horas
1	20	Saponina	Sin cambios	2 peces boqueando en la superficie, pero vuelven a bajar (no permanecen siempre en la superficie)	Igual que a los 15 min	1 pez tomando aire en la superficie (el mismo afectado de antes), otros nadan a la superficie para tomar aire y vuelven a bajar.	1 pez (la misma) con poca movilidad, se queda en la superficie pero vuelve a bajar. (movilidad > 2 y 3.
2	30	"	Sin cambios	1 pez boqueando en la superficie vuelve a bajar	Todos abajo buscando comida.	3 peces tomando aire en la superficie	1 pez con muy poca movilidad (el mismo), se va de lado, aleta caudal plegada; la mayoría arriba. actividad general < que los de la pecera 1.
3	40	"	Sin cambios	2 peces boqueando en la superficie	2 peces en la superficie igual que a los 15 min, los demás abajo buscando comida.	4 peces tomando aire en la superficie	El mismo pez afectado con la cola plegada, inmóviles todos arriba. Actividad general < que los de la pecera 2 y 1.
4	20	Anestésico MS 222	Sin cambios	Menor actividad < menor nado, casi sólo mueven aleta caudal	menor nado	menor nado, 4 quitosos inmóviles.	Actividad general > que los de la pecera 5 y 6
5	30	"	Sin cambios	"	menor nado	Algunos inmóviles: otros muy poca movilidad.	La mayoría arriba movilidad general > que los de la pecera 6.
6	40	"	Sin cambios	6,7 peces se van a la superficie y se quedan quietos los demás menor nado	menor nado	Todos en la superficie inmóviles.	Movilidad < que los de la pecera 5.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

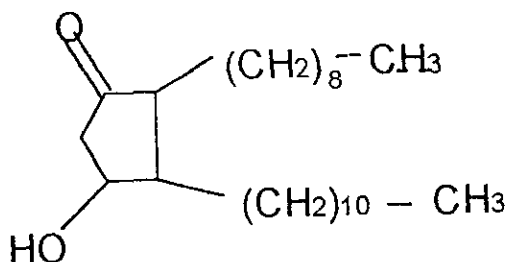
VI DISCUSIÓN

El extracto hexánico del látex tuvo el mayor rendimiento respecto a los otros extractos (67 % ; Tabla 1) . Está constituido principalmente por aceites y ceras. Dentro de los primeros se separó por cromatografía en columna una fracción aromática agradable ,con olor a eucalipto , que se analizó por cromatografía de gases . Los componentes principales de esta fracción fueron :canfeno , limoneno y eucaliptol (tabla 4) .

La fracción **N** fué un sólido de aspecto ceroso que da prueba positiva de Libermann-Burchard.La placa delgada de esta fracción muestra dos productos en la zona de mediana polaridad , uno , el menos polar, cuyo R_f corresponde con el del lupeol , es el compuesto principal ; el otro, en mucha menor proporción , es más polar y su R_f corresponde con el del beta- sitosterol (fig. 1) .

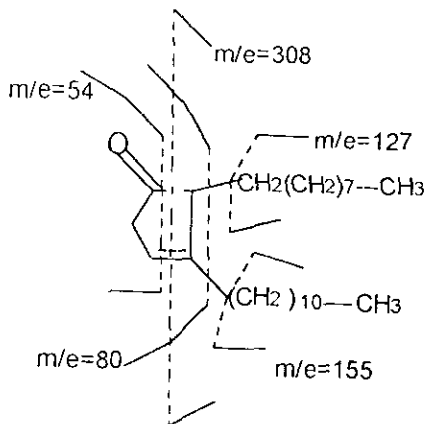
Análisis del espectro de masas de la sapogenina.

Con objeto de apoyar la estructura parcial de este compuesto, propuesta por González y López (1983), se analizó su patrón de fragmentación de masas que corrobora la estructura fundamental, y se pudo establecer la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, una de 9 y otra de 11 carbonos, quedando la siguiente estructura definitiva:

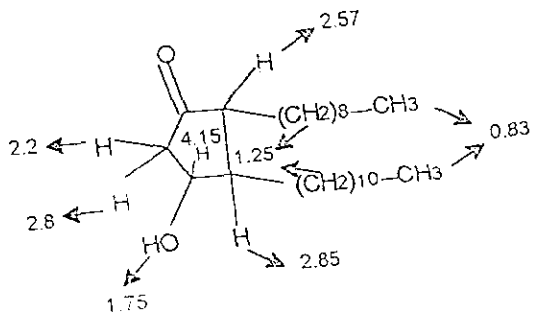


Del ión molecular $M^+ - 18 = 362$, se obtiene el peso molecular de la sapogenina que es de 380.

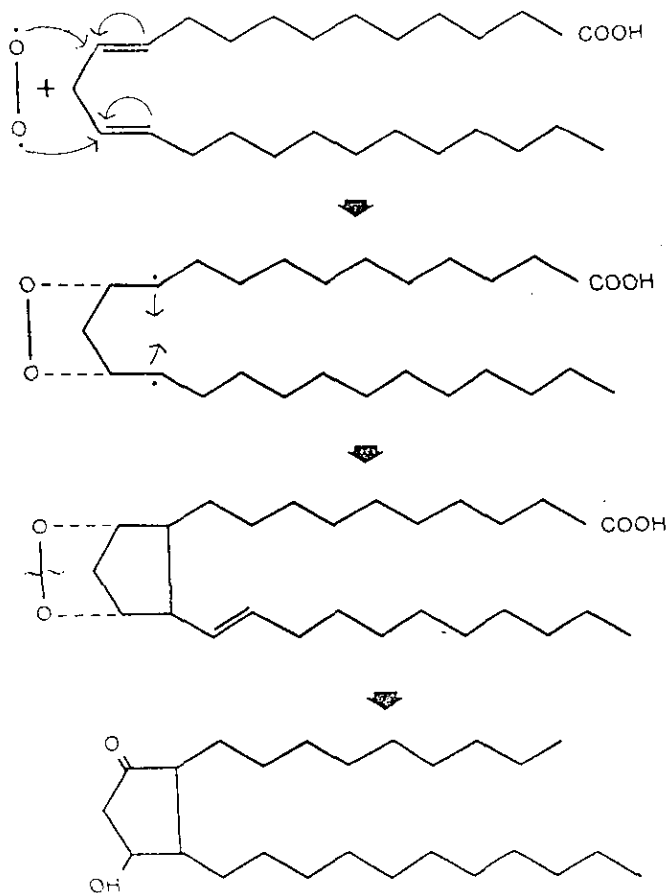
Todos los fragmentos correspondientes a la estructura propuesta se encontraron en el espectro de masas en el espectro de masas



Del mismo modo se pudo hacer la asignación de protones en el espectro de resonancia magnética .



Por otra parte, la estructura propuesta está de acuerdo con la ruta biosintética probable. La sapogenina es un compuesto de estructura similar a la de las prostaglandinas (Mann, 1994) y por consiguiente, su precursor debe ser un ácido graso insaturado derivado del crepénico que por peroxidación mediante un radical peróxido, subsecuente ciclización a un anillo de 5 miembros y descarboxilación se convierte en la sapogenina :



BIOENSAYO

Bradley (1956) reporta que la D-L100 para peces dorados es de 0.4 ppm en 30 min , con la fracción acuosa del látex de *Sapium biloculare* , conteniendo saponinas . En el presente bioensayo, utilizando 40 ppm de la saponina del látex de *Sapium biloculare*, la mortalidad de los peces "guppis " (*Lebistes reticulatus*) fué nula, aunque se observan efectos de toxicidad desde las concentraciones más bajas utilizadas (1 ppm)al perder movilidad los peces. Esta diferencia puede deberse a que los "guppis" son peces muy resistentes .

En el bioensayo, al momento de probar las sustancias (saponina y anestésico MS-222) se quitó la aereación para evitar, por una parte, la degradación del compuesto y por otra por suponer que el efecto aletargador de la saponina es debido a una deficiencia de oxígeno , lo que se demuestra con la última prueba donde se aplican 40 ppm de la saponina pero con aereación y no se observan los efectos causados en los peces con la saponina aún a concentraciones menores ,cuándo no hay aereación. (nado constante a la superficie para respirar, pérdida del equilibrio y hundimiento).

VII CONCLUSIONES

1.- El bioensayo en peces confirmó que la acción tóxica de la saponina se debe a su acción tensoactiva que ocasiona una deficiencia de oxígeno, lo que lleva a una menor movilidad de los peces.

2.- Como resultado de la fragmentación de la molécula de la sapogenina por espectrometría de masas y el análisis del espectro de R M P , se propone su estructura definitiva , similar a las prostaglandinas y con un peso molecular de 380.

El análisis espectroscópico de la saponina y de la sapogenina demostraron que se obtuvieron los mismos compuestos que los obtenidos por González y López (1983). Estos autores trabajaron el látex después de 4 meses de colectado, en tanto que en este trabajo se procesó de inmediato. Puede decirse pues que la saponina es un compuesto estable. No así los terpenos que con el tiempo se polimerizan dando al látex un aspecto duro y quebradizo. El látex fresco presenta un aspecto gomoso.

3.- Del extracto hexánico del látex se aisló un aceite aromático cuyo componente principal es el eucaliptol, y un sólido, mezcla de lupeol y beta-sitosterol.

Las conclusiones obtenidas fueron consistentes con los objetivos planteados.

VIII) Bibliografía

1. Atlas del medio Físico.1979.Secretaría de Programación y presupuesto. México.
2. Boiteau P; Ratsimamanga A.1964. Les Triterpenoides en physiologie végétale et animale.Gauthier-Villar .Paris. pp. 1269-1275
3. Bradley C.1956. Yerba de la Fleche-Arrow and fish Poison of the American Southwest. Economic Botanic **10**. 362-366.
4. Evans S.1973. Naturally occurring phorbol esters .Fred . U.S.A
5. González M; López V. 1983.Tesis.Fac.Ciencias.UNAM Estudio Preliminar Químico -Biológico de *Sapium biloculare* (Euphorbiaceae) 56 p.
6. González O; Schenkel E. 1987. Ichthyotoxic activities of *Ateleia glazioviana* Baill. Journal of Ethnopharmacology **20**. 81-84.
7. Mann J., et al. 1994. Natural Products :Their chemistry and biological significance.1ª .Ed. Cap 4 . Longman Sc.and Tech., Essex, England,p 262.
8. Misra D; Pradhan. 1969. Isolation of 3, 3' - Di -o-Methyl ellagic acid from *Sapium baccatum* Roxb and *Sapium eugeniaefolium* Ham. Jour. Indian Chem. Soc. **46** . 845-846.
9. Moretti C; Grenand P; 1981. Les Nivrées ou Plantes Ichtyotoxiques de la Guayane Francaise .Journal of Ethnopharmacology **6**. 139-160.
- 10.Pennington C. 1958.Tarahumar fish Stupefaction Plants. Economic botany. **12** .95-102
- 11.Ray K; Misra R. 1975. Phytosterols in Euphorbiaceae and Rutaceae. Phytochemistry **14**. 1876-1877.
- 12.Reyes J., García L. 1982. Un nuevo diterpeno de *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae) Rev. Soc. Quim. Mex., **26**. 242-244.
13. Rzedowsky. J.1978. Vegetación de México. Limusa. México.

14. Saha B; Naskar B. 1977. Bacatin, a novel nor - triterpene peroxide isolated from *Sapium bacatum*. Tetrahedron Lett. **35**. 3095-3098.
15. Siems K. Jakupovic, V. 1993. Rigidol, an unusual diterpene from *Sapium rigidifolium* Phytochemistry, . **33** . 1465-1469.
16. Stanley P. 1920-1926. Trees and shrubs of México . U . S. Nat. Mus. V. **23**. 651-652..
17. Taylor E. Edwards M. 1981. The Sapintoxins: Nitrogen containing phorbols of pharmacological interest. J. Pharm. Pharmacol. **33**(supl). 54.
18. Taylor. Williamson E. Evans F. 1983. Phorbol derivatives from *Sapium insigne*. Phytochemistry, . **22** .1231-1233.
19. Taylor S. Gafur M.; Choudhury A. 1981. Sapintoxin D, a new phorbol ester from *Sapium indicum* journal of natural products **44** . 729-731.
20. Taylor S; Gafur A. 1981. Sapintoxin A. a new biologically active nitrogen containing phorbol ester. *Experientia* **37**. Birkhauser Verlag, Basel (Schweiz). 681-683.
21. Taylor S; Gafur A. 1982. Sapatoxins, Aliphatic ester tiglane diterpenes from *Sapium indicum*. Phytochemistry. **21**. 405-407.
22. Texeira J; Lapa A. 1984. Timbós: Ichthyotoxic Plants used by Brazilian Indians. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. 309-316.
23. Thevasia K; 1989. Piscicidal Plants of Nepal: Fruit of *Catunaregam spinosa* (Thunb.) (Rubiaceae) and Leaves of *Poligonum hidropiper* L. (Poligonaceae) as Fish Poison. *Aquaculture* **78**, 293-301.
24. Thevesia K; 1987. Piscicidal Plants of Nepal. Preliminary Toxicity screening using grass carp. (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings. *Journal of Ethnopharmacology* **21**. 1-9.
25. Villalobos P; Castellanos E. 1992. La Familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnquímica. *Grasas y aceites*. **43** Fasc. 1. 39-44.