

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
MAYORITARIOS DE LOS EXTRACTOS DE CLOROFORMO Y
CLOROFORMO:METANOL(8:2) DE HOJAS DE *CNIDOSCOLUS CHAYAMANSA*

Tutor: Dr. Gustavo Cabrera

Trabajo Especial de grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el **Br. Julio César Terán. M** para
optar al título de Licenciado en
Química, Mención Tecnología

Caracas, Octubre, 2011

Indice General

I-. <i>Cnidoscolus chayamansa</i>	4
1.1-. Introducción	4
1.1.1-. Uso Etnobotánico	4
1.1.2-. Descripción Botánica	6
1.1.3-. Clasificación Taxonómica	7
1.1.4-. Antecedentes	8
1.1.4.a-. Antecedentes de la Familia Euphorbiacea	9
1.1.4.b-. Antecedentes fitoquímicos del Género <i>Cnidoscolus</i>	21
II-. Objetivos	29
2.1-. General	29
2.2-. Específicos	29
III-. Parte Experimental	30
3.1-. Colección del material vegetal	30
3.2-. Equipos	30
3.3-. Análisis Fitoquímico	31
3.4-. Esquema Experimental	32
3.5-. Fracción de Cloroformo	33

3.6-. Fracción de Cloroformo:Metanol (8:2)	33
IV-. Resultados y Discusión	35
6.1-. Compuestos Aislados de la Fracción de Cloroformo	35
Compuesto A	35
Compuesto B	39
Compuesto C	42
6.2-. Compuestos Aislados de la Fracción de Cloroformo:Metanol (8:2)	45
Compuesto D	45
Compuesto E	50
V-. Conclusiones	57
VI-. Recomendaciones	57
VII-. Bibliografía	58

I-. *Cnidoscolus chayamansa*

1.1-. Introducción

El estudio de los productos naturales ha adquirido gran importancia en los últimos tiempos. Se ha comprobado que algunos de los compuestos encontrados en plantas naturales poseen una mayor actividad farmacológica que la que presentan las sustancias análogas sintetizadas^{1(a,b)}.

En la actualidad, se han realizados numerosos descubrimientos científicos que confirman el enorme potencial curativo que conserva el mundo vegetal. Durante investigaciones realizadas se han descubierto aplicaciones sorprendentes para muchas plantas y sustancias derivadas de éstas. Estos descubrimientos presentan nuevos retos para la humanidad. La cantidad de plantas con propiedades curativas es tal que nadie puede dominar la totalidad del conocimiento generado por su estudio. Sin embargo, no hay duda de que la ciencia y la tecnología, pueden ayudar a descubrir y utilizar las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales de forma más efectiva^{1©}.

De todo lo expuesto anteriormente se deriva la importancia de este trabajo, cuyo objetivo principal es hacer un aporte al estudio fitoquímico de la especie *Cnidoscolus chayamansa*, comúnmente conocida como Chaya. Dicha planta es utilizada en Barlovento – Edo. Miranda para aliviar diversas afecciones.

1.1.1-. Uso Etnobotánico

La especie *Cnidoscolus chayamansa* es conocida como la “Planta Maravillosa”, ya que es utilizada en la medicina alternativa para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer y la diabetes, por su alto contenido de proteína cruda, vitaminas y minerales².

La Chaya se encuentra distribuida en diversas partes del mundo, en donde es usada como alimento. Esta “Planta Milagrosa” ha adquirido una enorme popularidad, debido a la gran cantidad de atributos que se le adjudican: anticancerígeno, antidiabético, se ha utilizado para el control del colesterol, la obesidad y del estreñimiento, la regulación de

la presión, la circulación sanguínea y aumento del calcio, por lo que muchas personas en nuestro país, la consumen como planta medicinal^{2,3}. La chaya contiene una notable cantidad de **vitaminas**, **sales minerales**, **oligoelementos** y **enzimas**; se trata así de importantes sustancias que forman un fitocomplejo, que actúan favorablemente sobre múltiples dolencias del organismo, sin producir efectos negativos⁴.

La infusión de hojas de Chaya proporciona una recuperación de energía instantánea con efectos desestresantes por su rico contenido en vitamina A, vitamina B, fósforo, calcio, hierro, proteínas y minerales. Esta planta actúa favorablemente sobre las dolencias del organismo humano, sin producir efectos negativos puesto que mejora la circulación sanguínea, regula la presión, facilita la digestión, recupera la visión, desinflama las venas y hemorroides, ayuda a la expulsión de orina y leche materna, y ácido úrico, previene la tos, descongestiona y desinfecta los pulmones, previene la anemia, mejora la memoria y las funciones del cerebro, y combate la artritis y la diabetes. Igualmente la chaya cura las infecciones de la garganta, enfermedades de la piel, dientes, encías y la lengua. Además ayuda a los niños en el crecimiento y desarrollo de huesos y músculos, y a las mujeres les da fuerza en el período crítico de la menstruación⁶.

Entre los países que hacen uso medicinal de la chaya se pueden mencionar:

- 1-. México: en donde se preparan ensaladas, guisos, sopas, infusiones y refrescos, empleando las hojas tiernas de la planta. También se preparan platos tradicionales acompañados con tortilla de maíz, huevos, queso y frijol. En la cultura Maya se utilizaba con propósitos nutricionales, ya que era consumida en mezcla con maíz y semillas de calabaza, simulando a un tamal, por ello se le consideró durante siglos la fórmula magistral para la alimentación Maya⁴.
- 2-. Ecuador: al igual que en México se utiliza como complemento alimenticio. Además se toma como infusión en te para tratar enfermedades del cerebro, artritis y diabetes⁵.
- 3-. Venezuela: se consume como infusión para problemas de hipertensión, como diurético, y para pacientes con tumores².

1.1.2-. Descripción Botánica

La chaya, en sus diversas especies es una planta de origen mexicano y centroamericano que se encuentra en muchas regiones de clima cálido y semicálido, secos y húmedos⁷.

- **Nombre vulgar:** chaya, chaya mansa, chaya col.
- **Nombre botánico:** *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh, familia de las Euforbiáceas.
- **Descripción:** El nombre Chaya se deriva del maya “*chay*” que significa “lo que aumenta”, probablemente porque germina con mucha facilidad, y el nombre del género, *Cnidoscolus*, viene de las palabras *Knídh*, que significa ortiga y *Skdóy púa*, nombres que aluden a sus setas urticantes. Es un arbusto muy común, aunque poco conocido fuera del sudeste de México. Alcanza una altura de 2 a 3 m. Sus tallos jóvenes son verdes. Sus hojas tienen de tres a cinco puntas, con largo peciolo que al cortarlo secreta un jugo lechoso; son mas anchas que largas, de color verde intenso. Algunas variedades tienen espinas en el peciolo, causantes de irritación al tocarlas, lo mismo que sus flores, blancas y agrupadas. Al no dar fruto se reproduce por estacas, prestándose a ello por su hábito de formar muchas ramas/nudo⁷.

En cuanto a su cultivo, la planta de Chaya no necesita mayores cuidados; es tolerante a las lluvias fuertes, debe regarse dos veces por semana; crece fácilmente y es una planta ornamental, inclusive de jardín. Debe sembrarse en un lugar donde reciba la luz directa del sol.

1.1.3-. Clasificación Taxonómica de la Especie

Reino: *Plantae*

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Crotonoideae

Tribu: Manihoteae

Género: *Cnidoscolus*

Especie: *Cnidoscolus chayamansa*

Nombre Binomial: *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh(1944)

Sinonimia:

- . *Cnidoscolus chayamansa* [McVaugh](#)
- . *Jatropha aconitifolia* [Mill.](#)
- . *Jatropha aconitifolia* var. *genuina* [Müll.Arg.](#)
- . *Jatropha urens* var. *inermis* [Calvino](#)

1.1.4-. Antecedentes

Como se indicó anteriormente, esta planta pertenece a la familia Euphorbiaceae, donde se pueden encontrar las siguientes especies: *chayamansa*, *aconitifolius*, *texanus*, *stimulosus*, *vitifolius*, *bellator*, *matossi*, *peltatus*, *reginus*, *fragrans*, *quinquelobatus*, *urens*, y *multilobus* que generalmente son usadas como alimentos por sus excelentes contenido de proteínas, minerales y vitaminas^{6, 8}.

Los árboles de espinacas (*Cnidoscolus spp.*) son vegetales de hojas verdes de crecimiento típico en las regiones secas del trópico, que principalmente son usadas por sus propiedades etnomedicinales para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino-dependientes⁹. Las hojas del vegetal son consumidas después de su cocción en agua, ya que la planta es ligeramente venenosa cuando sus hojas son consumidas directamente¹⁰.

Aunque la especie *Cnidoscolus chayamansa* es una planta muy conocida y utilizada con fines medicinales, en la literatura no hay mucha información sobre los compuestos aislados de la misma, de allí de deriva el interés en su estudio. Por ello se presentan como antecedentes los estudios realizados sobre plantas del mismo género y familia, a fin de tener una idea de la posible composición química y actividad biológica de la especie a estudiar.

1.1.4.a-. Antecedentes fitoquímicos de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae se encuentra en América y África tropical. El rango de variación morfológica es enorme y por lo tanto difícil de caracterizar, hecho que ha sugerido que las especies de la familia tengan un origen poli-filético^{11,12,13}.

La familia Euphorbiaceae comprende aproximadamente más de 8000 especies provenientes de 321 géneros¹⁴.

Desde la antigüedad se han atribuido efectos curativos a especies de esta familia. Por ejemplo, la especie *Euphorbia fischeriana* ha sido usada en la medicina tradicional China por muchos años como una droga anticancerígena^{15,16}. Otras plantas de esta familia se han usado para el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas desde el tiempo de Hipócrates y las referencias sobre su uso han aparecido en numerosas literaturas del mundo^{17,18}. Su cultivo, a lo largo de los años, ha representado una importante fuente económica debido a que las distintas especies de esta familia son utilizadas en diferentes áreas. Por ejemplo, en la industria farmacéutica, como medicinas, el *Croton spp.* y *Jatropha spp.*; para gomas la *Hevea brasiliensis*. En la industria alimenticia, como frutas, nueces y vegetales las especies *Phyllatus spp.*, *Barcaurea spp.*, *Antidesma bunius*, *Caryodendron spp.*, *Sauropus androgynus* y la *Cnidocolus chayamansa* respectivamente y como aceites se encuentran el *Ricinus communis*, *Aleurites spp.*, *Sapium sebiferum* y la *Jatropha curcas*¹⁴.

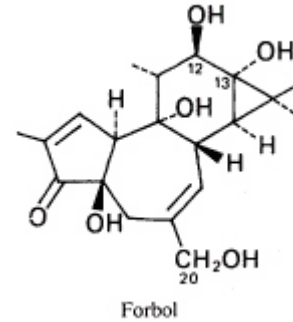
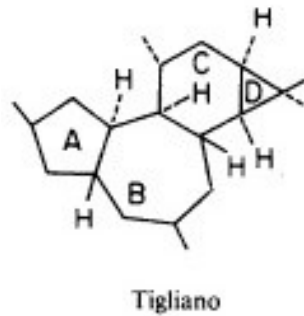
Algunas especies de esta familia son usadas ampliamente en la medicina popular por sus múltiples efectos fisiológicos. Varias especies del género *Croton* han sido usadas como remedios locales para una gran variedad de enfermedades y dolores. Estas plantas son utilizadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos. Las aplicaciones específicas forman parte del acervo cultural de cada región. Algunas especies se suponen útiles para una amplia gama de padecimientos y se venden o utilizan como remedios curalotodo¹⁷. Por ejemplo, *Croton flavens* ha sido usada para tratar problemas de la próstata, congestión nasal, fiebre, reumatismo, dolores de estómago, enfermedades de la piel, sífilis y neumonía. También se utiliza como

expectorante y en el tratamiento de heridas. Tal variedad de propiedades farmacológicas se atribuye, entre otras cosas, a la presencia de alcaloides¹⁹. Otro ejemplo lo constituye *Croton nivens*, especie que ha sido usada como tónico y antipirético, para el tratamiento de las hemorroides, diarrea crónica, disentería, dolores reumáticos, colon irritado y molestias menstruales^{19,20,21}. La utilización de estas plantas con fines curativos exige un conocimiento exhaustivo de los metabolitos que ellas poseen, por ello se presenta una revisión bibliográfica general sobre los estudios de la composición química y actividad biológica de la misma realizados desde 1970 hasta 1998.

Muchas euforbiáceas poseen látex (de importante interés industrial), que contiene caucho, aceites, taninos, resinas y sustancias gomosas. Sin embargo, en algunos casos el látex es venenoso e irritante. A esta familia pertenecen plantas tan familiares como: el árbol del caucho *Hevea brasiliensis*, la yuca *Manihot utilissima*, el ricino *Ricinus communis* y la patora, corona del Inca o rosa de Navidad *Euphorbia pulcherrima*. Además hay sustancias colorantes como en la kamala *Mallotus philippensis*, gomas de especies de *Hevea*, *Manihot* y *Sapium*, fécula de *Manihot* o tapioca de *Manihot esculentus*.^{12,22}

Además de estos compuestos de interés industrial muchas especies tienen sustancias irritantes y/o citotóxicas. El látex de muchas especies de la familia euforbiácea es irritante para la piel y para las membranas de las mucosas. Por ejemplo la fracción resinosa del aceite de *Croton*, purgante obtenido a partir de las semillas de *Croton tiglium*, posee ésteres forbólicos altamente irritantes y además generadores de tumores^{22,23}.

En la década de los años sesenta se aisló del aceite el forbol de crotón. El forbol es un polialcohol diterpénico precursor de los compuestos promotores de tumores, derivado del esqueleto básico tetracíclico denominado tigliano.^{24,25}



En su forma libre no es tóxico; sin embargo muchos de sus poliésteres, particularmente los 12, 13-disustituídos, presentan propiedades irritantes y son procarcinogénicos. Paradójicamente algunos de ellos, como el 12- tiglato-14-decanoato-forbol, presentan también actividad antileucémica^{18,19,20}. Los crotofolanos (tipo latirano) son un tipo inusual de diterpenos que se han encontrado en la familia aislándose la crotofolina A,B,C,E de *Croton corylifolius*^{18,19} y los crotóxidos A y B^{20,21}.

Con otro estudio se pudo aislar la taspina de las especies peruanas *Croton lechleri*, *Croton draconoides* y *Croton palanostigma*. Este compuesto presenta actividad citotóxica “*in vitro*” e “*in vivo*”. Estudios farmacológicos han demostrado que la taspina presenta actividad cicatrizante y antiinflamatoria^{24,26,27}.

Se han aislado diterpenos que poseen propiedades insecticidas, como por ejemplo, el cis-dehidro-crotonin de la especie *Croton cajucara* y otro diterpeno tóxico para los insectos que fue aislado de la especie *croton linearis*^{28,29}.

En el año 2000 Graham y col., realizaron una revisión usando la base de datos NAPRALERT actualizada y mantenida por el programa de Colaboración a la Investigación a las Ciencias Farmacéuticas del Colegio de Farmacia de la Universidad de Illionois-Chicago, donde se reportan más de 350 especies usadas contra todo tipo de cáncer encontrándose 37 especies de la familia Euphorbiacea entre las cuales

destaca el uso de la espina de la *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh en México para eliminar verrugas³⁰.

En el 2001 Willians James y col. estudiaron una serie de plantas nativas del Amazona para determinar las propiedades antivirales y los efectos inmunomoduladores de las mismas, encontrándose de la familia Euphorbiacea, las especies *Croton lechleri* mejor conocida como Sangre de drago o Drago, y *Phyllanthus ninuri*. Esta última fue efectiva contra los virus HIV, Hepatitis B considerada como hepatoprotectora y contra la Hepatitis C (virus HCV), además posee potencial actividad inmunomodulante. Mientras que la especie *Croton lechleri* mostró actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacterial, antitumoral, antidiarréica, antifúngica y antiviral mostrando actividad contra la diarrea producida por el virus HIV, contra la influenza y parainfluenza, el virus del herpes simplex I y II, contra la Hepatitis A y B y contra el herpes genital en pacientes con SIDA. La composición química de la sangre de drago incluye un considerable número de compuestos como diversos tipos de fenoles y diterpenos, proanthocianidinas, fitosteroles, lignanos dihidrobenzofuranos y alcaloides tipo taspino²⁷ (Actividad antiviral de uña de gato). Hoy en día se utiliza como medicamento antidiarreico en pacientes con enfermedades crónico viral el oligómero de proanthocianidina aislado de esta planta, (Figura N°1)^{21,27}.

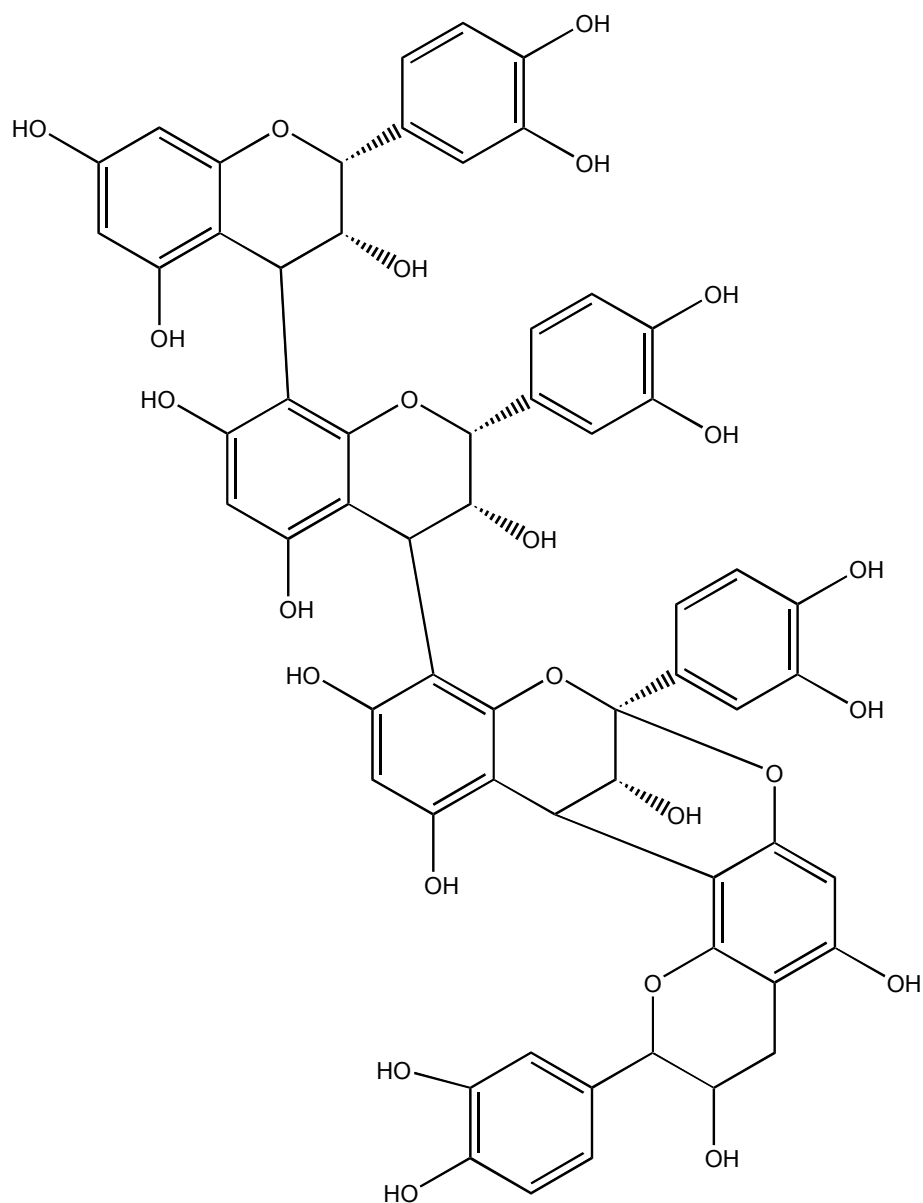
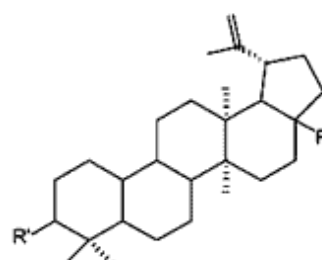
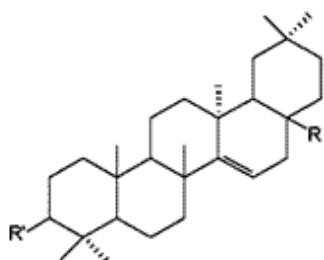
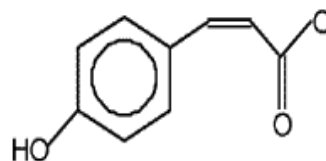
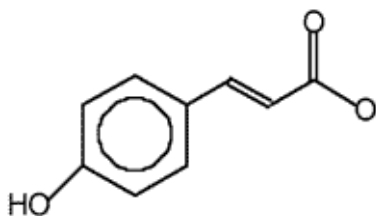


Figura N°1: Oligómeros de Proantocianidina

Igualmente en el año 2001, M. Briltna y col. realizaron el estudio químico de varias especies de la familia Euphorbiacea de Chile, encontrando para las especies *Argythamina canescens* y *A. berteriana* los triterpenos conocidos derivados del lupeol y el β -sitosterol, y para la especie *A. tricuspida* derivados triterpénicos y compuestos aromáticos todos de estructura conocida: compuestos del **1** al **11**³¹.

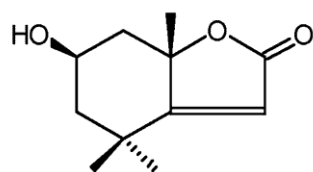


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R	CHO	COOH	Me	Me	Me	R	CHO	COOH	Me	Me
R'	H	H	a	b	OH	R'	H	H	a	b
										OH



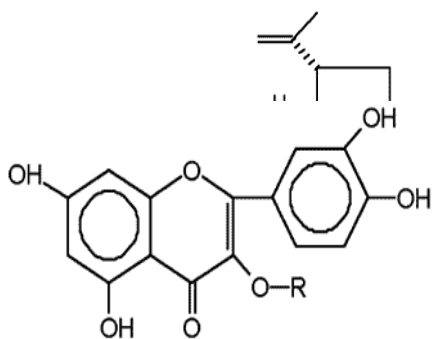
a

b



11

Para el género *Colliguaja* se estudiaron las especies *C. dombeyana*, *C. integerrima*, *C. odorifera* y *C. salicifolia* de las cuales se aislaron diterpenos y flavonoides conocidos: compuestos del **10**, **13-20**^{31,32,33}. Del estudio preliminar para la actividad antibacteriana del extracto con acetato de etilo se comprobó que presenta actividad moderada frente a los organismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*³⁴.

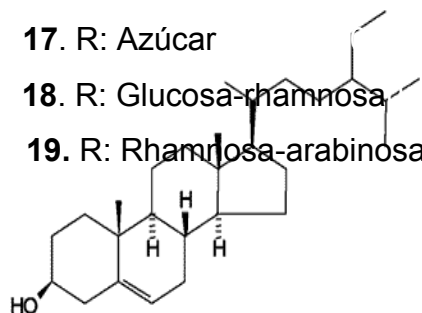


16. R: Glucosa

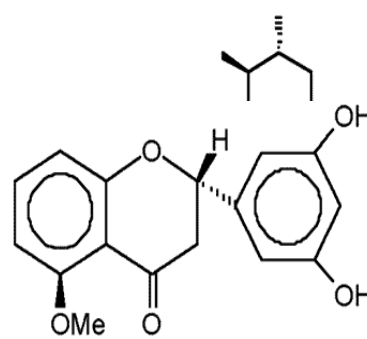
17. R: Azúcar

18. R: Glucosa-rhamnosa

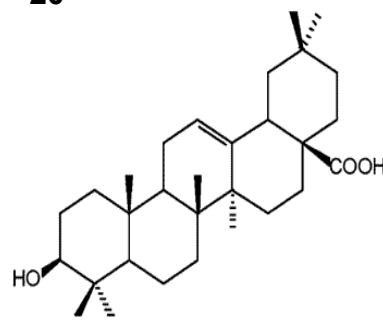
19. R: Rhamnosa-arabinosa



14. b Sitosterol

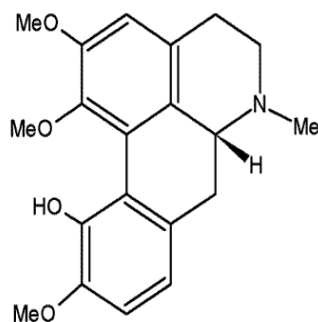
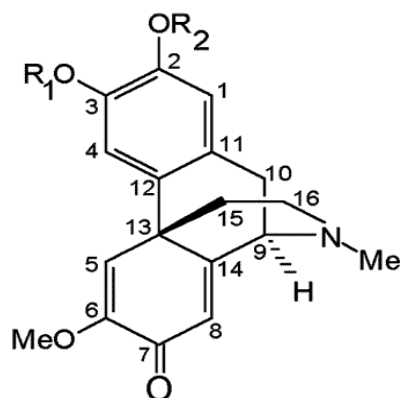


20 13. Ac. Ursólico

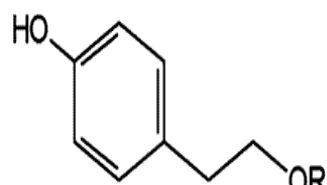
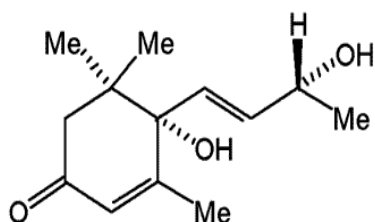


15. Ac. Oleanólico

Del estudio de la especie *Croton chilensis* (especie única del género en Chile) se aislaron, principalmente, derivados de alcaloides del tipo morfinandienona **21-23** y un alcaloide aporfínico **24**. Además de un derivado terpénico **25**, y dos derivados aromáticos.³⁵



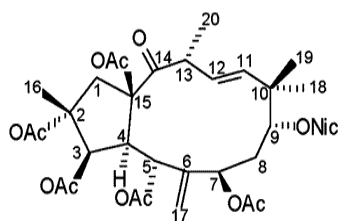
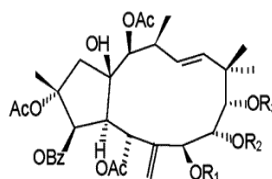
	21	22	23	
R1	Me	H	Me	
R2	H	Me	Me	

24**25**

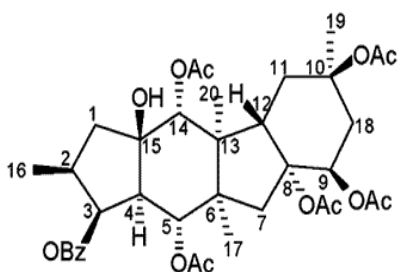
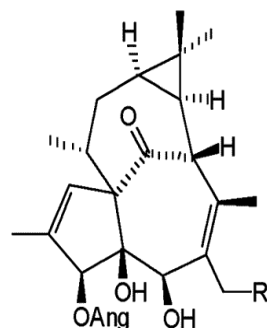
	26	27
R	H	Glu

Isosalutaridina **21**, flavinantina **22**, metilflavinantina **23**, isocoridina **24**, vomifoliol **25**, tirosol **26**, y salidosido **27**.

De la especie *Euphorbia peplus* se lograron aislar derivados jatropano, ingenanos y pepluanos. Esta especie que crece en Chile fue comparada con la misma especie recolectada en Alemania, donde se encontró menos diversidad en la especie que crece en Chile. De la misma se aislaron los jatropanos **28**, **29**, **30** y los compuestos **31**, **32**, **33** de la especie colectada en Alemania. Además se aislaron los ingenanos **35**, **36** y un triterpeno tetracíclico con esqueleto nuevo que se denominó pepluano y que corresponde a la estructura **34**³⁶.

**28****29 30 31 32 33**

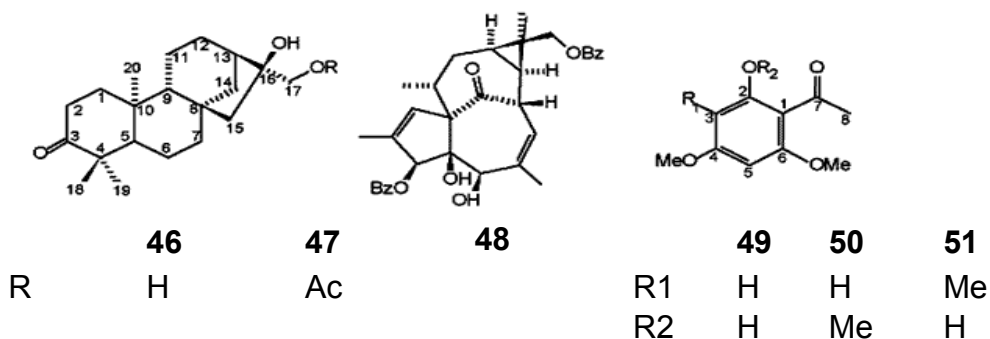
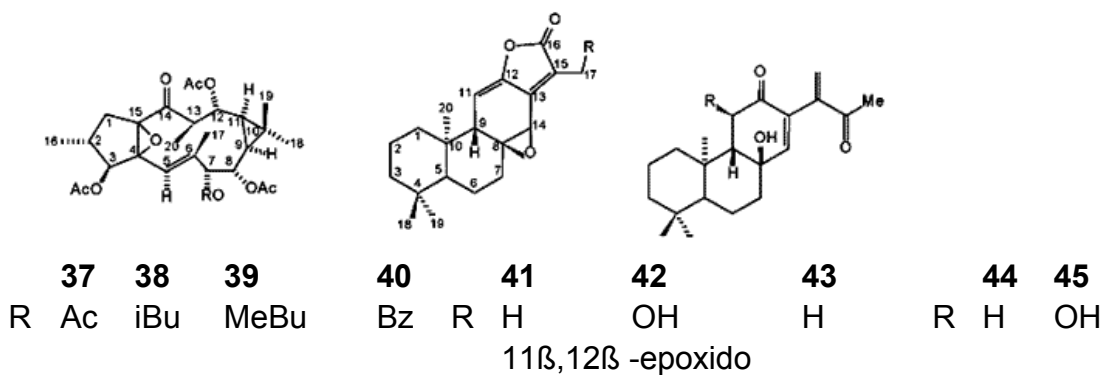
R ₁	Ac	iBu	iBu	Ac	Ac
R ₂	Ac	H	H	H	H
R ₃	Ac	Nic	Ac	Nic	Ac

**34****35****36**

R ₁	H	Oac
----------------	---	-----

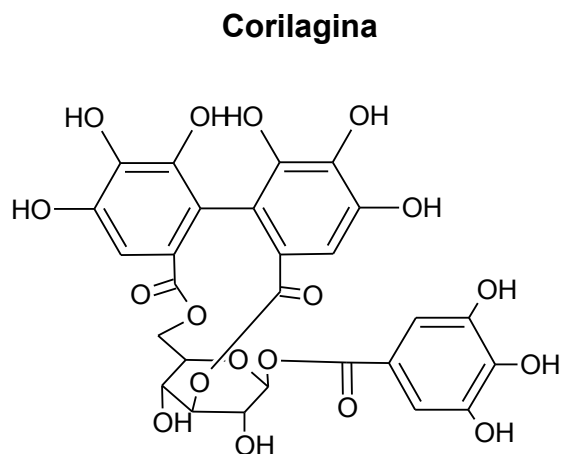
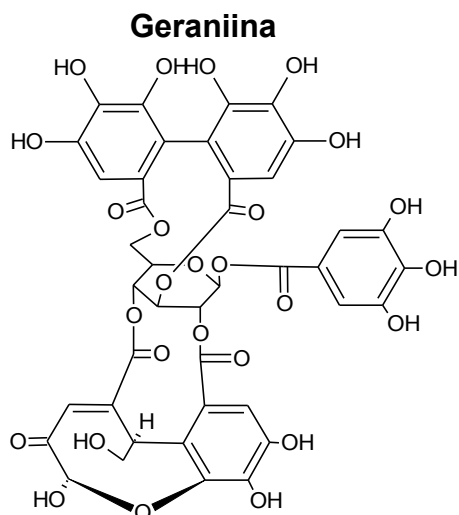
28-33 derivados de jatropano
34 derivado de peplano (esqueleto nuevo)
35-36 derivados de ingenano

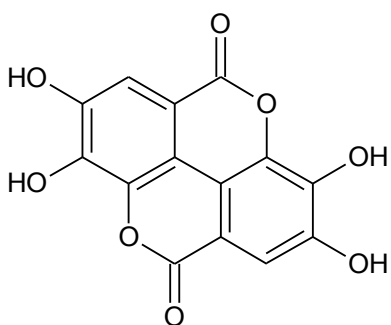
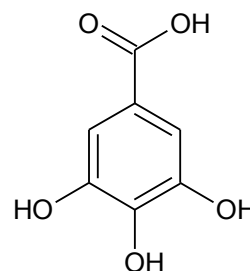
Siguiendo con el estudio de la familia Euphorbiaceae, de la especie *Euphorbia portulacoides* se aislaron diterpenos y floroacetofenonas **49,50,51** entre las cuales están: dos kauranos **46,47** de los cuales uno resultó ser nuevo, tres derivados de tipo abietano **41,42,43,44,45** de los cuales dos son nuevos, cuatro nuevos derivados de latiranos **37,38,39,40**, un derivado de ingenano **48** y compuestos relacionados, además de una serie de compuestos conocidos³⁷. Se sabe que las propiedades irritantes de los representantes del género *Euphorbia* se deben principalmente a la presencia de diterpenos macrocíclicos con esqueleto tipo tigliano e ingenano, derivados que no fueron encontrados en *E. portulacoides* salvo el compuesto **48**. En medicina popular, esta planta es usada por sus propiedades purgativas muy similares a las de *E. lathyris*^{38,39,40}.



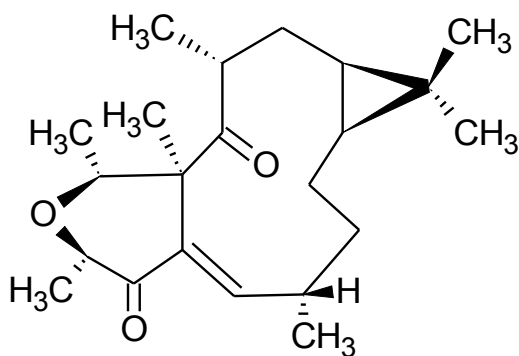
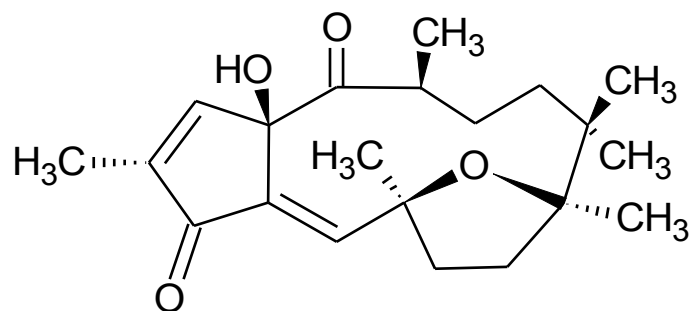
37-40 derivados de latirano, **41-45** derivados de abietano,
46-47 derivado del kaurano, **48** derivado de ingenano
49-51 floroacetofenonas

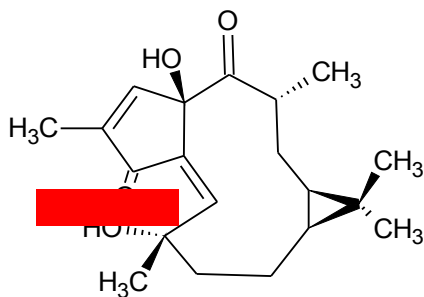
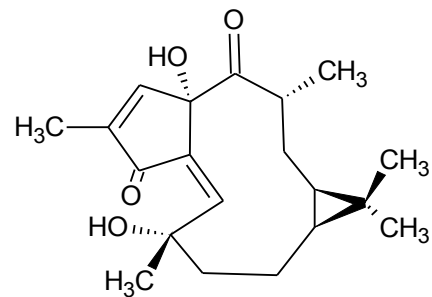
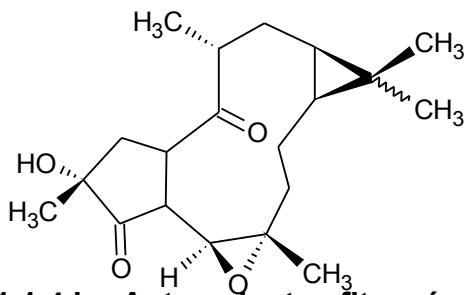
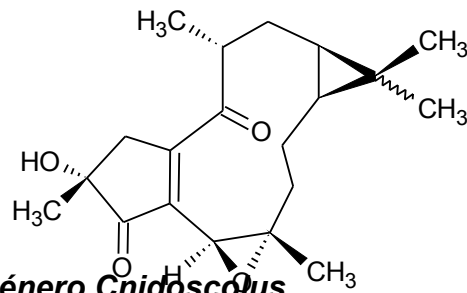
En el 2006, Markom Masturah y col. Aislaron de la especie *Phyllanthus niruri*, los ácidos Galico y Elagico, y los taninos Corilagina y Geraniina. Estos taninos hidrolizables son compuestos bioactivos y la extracción de los metabolitos se realizó realizando el método de extracción con Soxhlet. Para su identificación y caracterización se compararon los tiempos de retención usando un HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión), adicional se confirmó cada estructura usando datos espectroscópicos de RMN⁴¹.



Acido Ellagico**Acido Gallico**

Olepeja Aiyelaaghe y col en el 2007, aislaron de la especie *Jatropha podagrica*, seis diterpenos macrocíclicos de los cuales dos resultaron ser estructuras nuevas: Japodagrina y Japodagrona, estos compuestos poseen un esqueleto tipo latirano y jatrofano respectivamente; el resto de los diterpenos fueron estructuras conocidas. Estos diterpenos macrocíclicos se aislaron del extracto de hexano, ya que aunque todos los extractos (EtOAc, MeOH y Hexano) mostraron actividad contra bacterias gram-positiva, la fracción menos polar resultó más efectiva⁴².

Japodagrina**Japodagrona**

4Z-Jatrogrossidentadion**15Z-epi-4Z-Jatrogrossidentadion****2-hidroxi-iso-jatrogrossidion****2-epi-hidroxi-iso-jatrogrossidion****1.1.4.b-. Antecedentes fitoquímico del Género *Cnidoscolus***

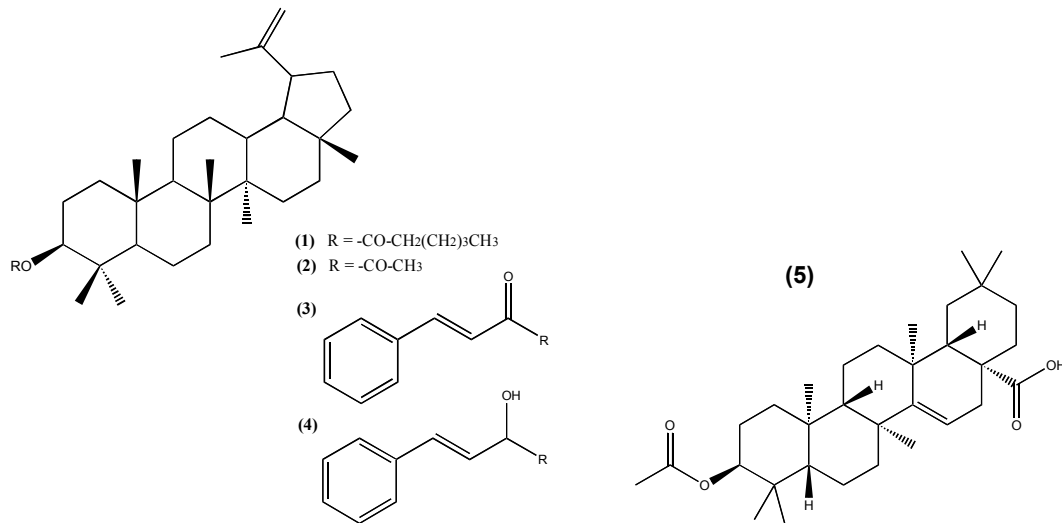
En cuanto al estudio referente al género *Cnidoscolus* se pueden nombrar:

En 1966, Seigler y colaboradores aislaron de la especie *Cnidoscolus texanus* una serie de ácidos grasos del aceite esencial de la planta conocida como “ortiga punzante” u “ortiga de toro”⁴³; extraídos con pentano y determinados utilizando la técnica de Cromatografía de Gas-líquido, obteniendo un 71% de ácido linoleico y un 15.5 % de ácido oleico, para los ácidos insaturados ; mientras que en el contenido de ácidos saturados se encontró un 10% de ácido palmítico, un 3% de ácido esteárico y 1% de una mezcla de ácido láurico y mirístico.

En 1968 el mismo investigador aisló el linamarino (glicósido cianogénico) del extracto de acetato de etilo de la especie *Cnidoscolus texanus* y de la especie *Cnidoscolus*

stimulosus determinó por GLC los siguientes ácidos: 64.8% de ácido linoleico; 18.9 % de ácido oleico; 1.3 % ácido palmitooléico; 12.3 % de ácido palmítico, 2.8 % de ácido esteárico y 0.2 % de ácido mirístico⁴⁴.

En 1997, Rosenei Brum y col. aislaron de la especie *Cnidocolus vitifolius* e identificaron por técnicas espectroscópica de RMN, el ácido 3-acetil-aleurítico (5); el 3β-O-cinnamoil lupeol (3); el dihidrocinnamoil lupeol (4); el acetil lupeol (2) y el compuesto nuevo 3β-hexanoil lupeol (1). Además de una mezcla de esteroides, entre los que se encontraron: el sitosterol, campesterol y stigmasterol; analizados e identificados por CG-MS⁴⁵.



Almeida y col., en el 2004, monitorearon por TLC la composición fitoquímica y actividad biológica de una serie de plantas medicinales de la región de Xingó al Noreste de Brasil; para la identificación química se utilizaron los siguientes reactivos: Cloruro férrico para fenoles y taninos; para los alcaloides precipitación específica usando los reactivos Hager, Mayer y Dragendorff; para los triterpenos anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado y para las quinonas solución de hidróxido de aluminio⁴⁶. De la familia Euphorbiacea se encontraron las especies; *Cnidocolus obtusifolius*, rica en fenoles y quinonas, conocida como “Faveleira”, las hojas de esta planta es utilizada

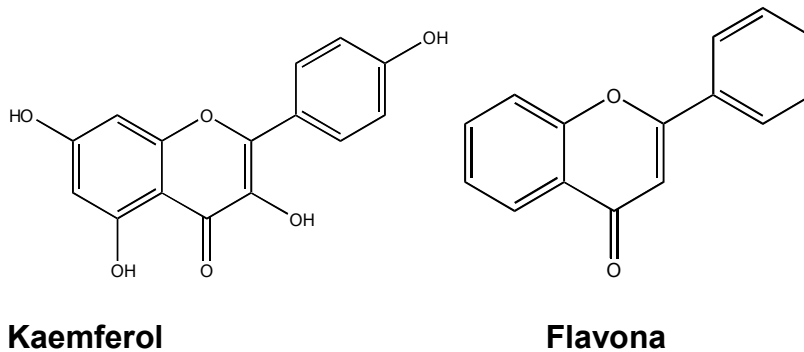
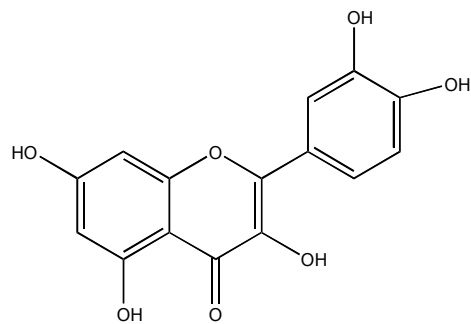
como anti-inflamatorio y contra tumores de hígado y útero; la especie *Croton rhamnifolius*, conocida como “Velame”, utilizada para la diabetes e inflamación rica en fenoles y quinonas; *Jatropha mollissima* “Pinhõa Branco”, constituida por fenoles y triterpenos utilizada para aumentar el apetito y la infección de riñón y *Manihot glaziovii* “Maniçoba” rica en fenoles empleada para el dolor de cabeza y la infección de riñón.

Otro trabajo publicado para este género fue realizado por Awoyinka y col. en el 2007 a la especie *Cnidocolus aconitifolius*, este grupo de investigación realizó igualmente un seguimiento de los compuestos químicos por TLC y evaluación de la actividad antibacterial, tanto de la infusión como del extracto metanólico, encontrando taninos, phobataninas, saponinas y glicósidos para el té y alcaloides, taninos, saponinas y glicósidos para el extracto de metanol. Adicionalmente, el extracto metanólico inhibió las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typha* mientras que el extracto acuoso solo presentó actividad contra la bacteria *Staphylococcus. Aureus*⁴⁷.

En Venezuela, en el 2004, Suárez y col realizaron el estudio toxicológico de las hojas de la especie *Cnidocolus chayamansa* McVaugh, las cuales fueron preparadas en tres formas: decocción, infusión y maceración. En la infusión se calentó agua hasta temperatura de ebullición (100°C) y luego se agregaron las hojas de la planta; en la decocción se hirvieron las hojas de la planta en agua por un periodo de 10 a 15 minutos y para obtener el extracto de las hojas por maceración se dejaron reposar en agua fría durante 48 horas. La determinación de la DT₅₀ y la DL₅₀ se realizaron por el método descrito por Litchfield y Wilcoxon⁴⁸; encontrando que los principales efectos tóxicos fueron la contorsión y piloerección que junto con la diarrea (observada en menor grado) pueden asociarse a trastornos gastrointestinales, consecuencia de la contorsión intestinal. La letargia, la hiperventilación y otros efectos como ataxia, ptosis palpebral, apnea, hiperactividad e hipersensibilidad observada con dosis muy elevadas pueden asociarse con alteraciones del sistema nervioso central, atribuyendo estos efectos a la presencia de cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma a partir de los glicósidos cianogénicos^{49,50}.

Los resultados muestran que la DT_{50} para las tres evoluciones preparadas fue de 140 mg/Kg, y los límites inferiores de los intervalos de confianza fueron: 101,76 y 102 mg/Kg para los liofilizados: maceración, infusión y decocción respectivamente; determinando que la infusión resultó más tóxica a dosis más baja. Aunque los resultados DL_{50} y los límites de confianza fueron similares en las tres preparaciones evaluadas afirmando que la toxicidad aguda en ratones Balb-c es baja, ya que la DT_{50} se aleja considerablemente de la DL_{50} .

En cuanto investigaciones anteriores sobre la *Cnidoscolus chayamansa*, el primer estudio se realizó en el 2004 por Joseph Kuti y colaboradores, los cuales aislaron e identificaron tres tipos de flavonoides que resultaron comunes para ambas especies, tanto para la *C. chayamansa* como para la especie *C. aconitifolius*. Entre los compuestos aislados se encontraron la C-glicosilflavona y una serie de derivados glucósidos como (galactósidos, glucósidos, rambósidos y rhamnosilglucósidos) de los flavonoides quercetina y/o kaemferol⁵¹.



Flavonoides base de los derivados glucósidos encontrados en las especies .
C. chayamansa y *C. aconitifolius*

Como los derivados glucosidicos tipo flavonoides exhiben numerosas y excelentes propiedades biológicas y farmacológicas excelentes para la cura de muchas enfermedades crónicas, este grupo de investigación también reportó la actividad antioxidante de los extractos de la planta midiendo la capacidad de absorción del radical oxígeno mediante el método ORAC⁵²; el ensayo permite determinar simultáneamente la capacidad antioxidante y el contenido total fenólico – flavonoide, tanto del vegetal crudo como de la infusión de cada una de las especies estudiadas.

El total de ORAC se midió por cada miligramo de Trolox (Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilico), siendo equivalente al ensayo de la capacidad antioxidante (TEAC)⁵³.

Especie	Muestra de	ORAC	Contenido
Cnidoscopus	hojas		fenólico
<i>C. aconitifolius</i>	Vegetal crudo	15.3 ± 0.3	2906.2 ± 18.5
	Infusión	11.8 ± 1.2	2241.4 ± 37.9
<i>C. chayamansa</i>	Vegetal crudo	15.6 ± 0.7	1217.3 ± 21.4
	Infusión	14.8 ± 1.0	733.5 ± 28.2

Tabla # 1: Capacidad de Absorción del radical Oxígeno (ORAC) y contenido fenólico en el vegetal crudo y en la infusión de las dos espinacas (*Cnidoscopus spp.*)⁵⁴

A continuación se presenta una tabla resumen con los flavonoides encontrados para cada extracto de las especies *Cnidoscolus*:

Especie <i>Cnidoscolus</i>	Muestra de hojas	Compuestos flavonoides
C. <i>aconitifolius</i>	Vegetal crudo	Glicósidos de Kaemferol 3-O-galactósido 3-O-glucósido 3-O-rhamnósido 3-O-rhamnosilglicósido 3-O-rhamnosilglicósido-7-O- rhamnósido
		Glicósidos de Quercetina 3-O-rhamnósido 3-O-rhamnosilglucósido
	Infusión	Glicósidos de Kaemferol 3-O-galactósido 3-O-glucósido 3-O-rhamnósido 3-O-rhamnosilglicósido 3-O-rhamnosilglicósido-7-O- rhamnósido 3-O-rhamnosilglicósido-7-O- glucósido
		Glicósidos de Quercetina 3-O-rhamnósido 3-O-rhamnosilglucósido-7- O-glucósido
C. <i>chayamansa</i>	Vegetal crudo	Glicósidos de Kaemferol 3-O-rhamnosilglucósido 3-O-rhamnosilgalactósido-7- O-rhamnósido Glicósidos de Quercetina

		3-O-rhamnósido
	Infusión	Glicósidos de Kaemferol 3-O-rhamnosilglucósido 3-O-rhamnosilgalactósido-7-O-rhamnósido
		Glicósidos de Quercetina 3-O-rhamnósido

Tabla # 2: Flavonoides encontrados en los extractos de cada especie *Cnidoscopus*.

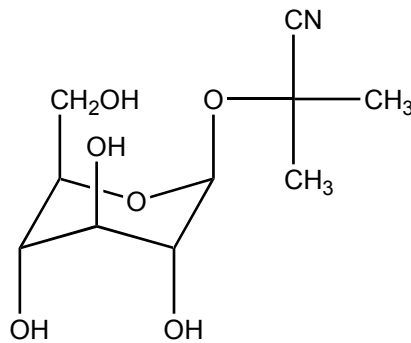
Kuth y col en el 2006 estudió el contenido de glucósidos cianogénicos en las partes comestible de los árboles de espinacas (hojas y tejido floral) *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh y *Cnidoscopus aconitifolius* (P. Mill) I. P. Johnston en muestras frescas y congeladas, utilizando ensayos enzimáticos (β -glicósidos) y la técnica de espectroscópica UV-Vis para medir el complejo Cianuro picrato de sodio para su cuantificación. La identificación del cianógeno se realizó usando la técnica HPTLC ⁵⁵. Seguidamente, se encontró que el contenido total de cianógenos de las hojas comestibles frescas de las dos especies *Cnidoscopus*, analizado por los dos métodos, ensayo enzimático⁵⁶ y espectro UV-Vis⁵⁷; mostró que la especie *C. chayamansa* tenía un contenido relativamente menor de cianógenos ($1.28 \pm 0.4 \mu\text{g}$ de HCN equi/g de hojas frescas) comparado con el obtenido para *C. aconitifolius* ($2.51 \pm 0.6 \mu\text{g}$ de HCN equi/g de hojas frescas). Utilizando el método analítico espectrómetro de UV-VIS; mientras que por el método enzimático el contenido de cianógenos fue parecido ($2.89 \pm 0.1 \mu\text{g}$ de HCN equi/g de hojas frescas) para la *C. chayamansa* y ($2.89 \pm 0.0 \mu\text{g}$ de HCN equi/g de hojas frescas) para *C. aconitifolius*. En cuanto a los pétalos *C. aconitifolius* éstos presentaron una concentración relativamente menor que la *C. chayamansa*, como se muestra en la siguiente tabla:

<i>Cnidoscopus</i> <i>spp.</i>	Tejido de planta	Contenido HCN ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)	
		Ensayo enzimático	Absorción UV- vis
<i>C.</i>	Hojas	2.89 ± 0.0	2.51 ± 0.6
<i>aconitifolius</i>	Flor	1.62 ± 0.4	0.95 ± 0.0

<i>C.chayamansa</i>	Hojas	2.89±0.1	1.28±0.4
	Petiole	1.62±0.4	2.63±0.4

Tabla # 3: Contenido de HCN para cada especie (*Cnidoscolus spp.*), utilizando el método enzimático y la absorción UV-Vis

Los resultados de los ensayos enzimáticos fueron comparados con los resultados del método espectrométrico UV-Vis, los cuales mostraron una excelente correlación, concluyendo que las especies *Cnidoscolus* presentan alto contenido de cianógenos; arrojando, mediante el análisis por HPTLC que el cianógeno mayoritario para ambas especies es el linamarino cuyo punto de fusión es (141-142) °C^{58(a,b,c)}.



Linamarino

II-. Objetivos

2.1-. Objetivo General

Realizar el estudio fitoquímico de los extractos de cloroformo y cloroformo:metanol (8:2) de las hojas de la especie *Cnidoscolus chayamansa* perteneciente a la familia de la *Euphorbiaceae*.

2.3-. Objetivos Específicos

- 1-. Realizar separaciones y purificaciones de los metabolitos secundarios principales de las hojas de la especie *Cnidoscolus chayamansa*.
- 2-. Realizar el análisis espectroscópico (UV, IR y RMN) de los metabolitos que se logren aislar de la planta, a fin de determinar sus estructuras químicas.

III-. Parte Experimental

3.1-. Colección del material vegetal

El material vegetal fue recolectada en la región de Barlovento, específicamente en Caucagua, Edo. Miranda, Venezuela, en el caserío Merecure, carretera Nacional Caucagua-Higuerote y fue identificada por los T.S.U. María Alejandra Guillen y Rubén Naspe. Una muestra representativa se encuentra en el Herbario Nacional de Venezuela ubicado en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela

3.2-. Equipos

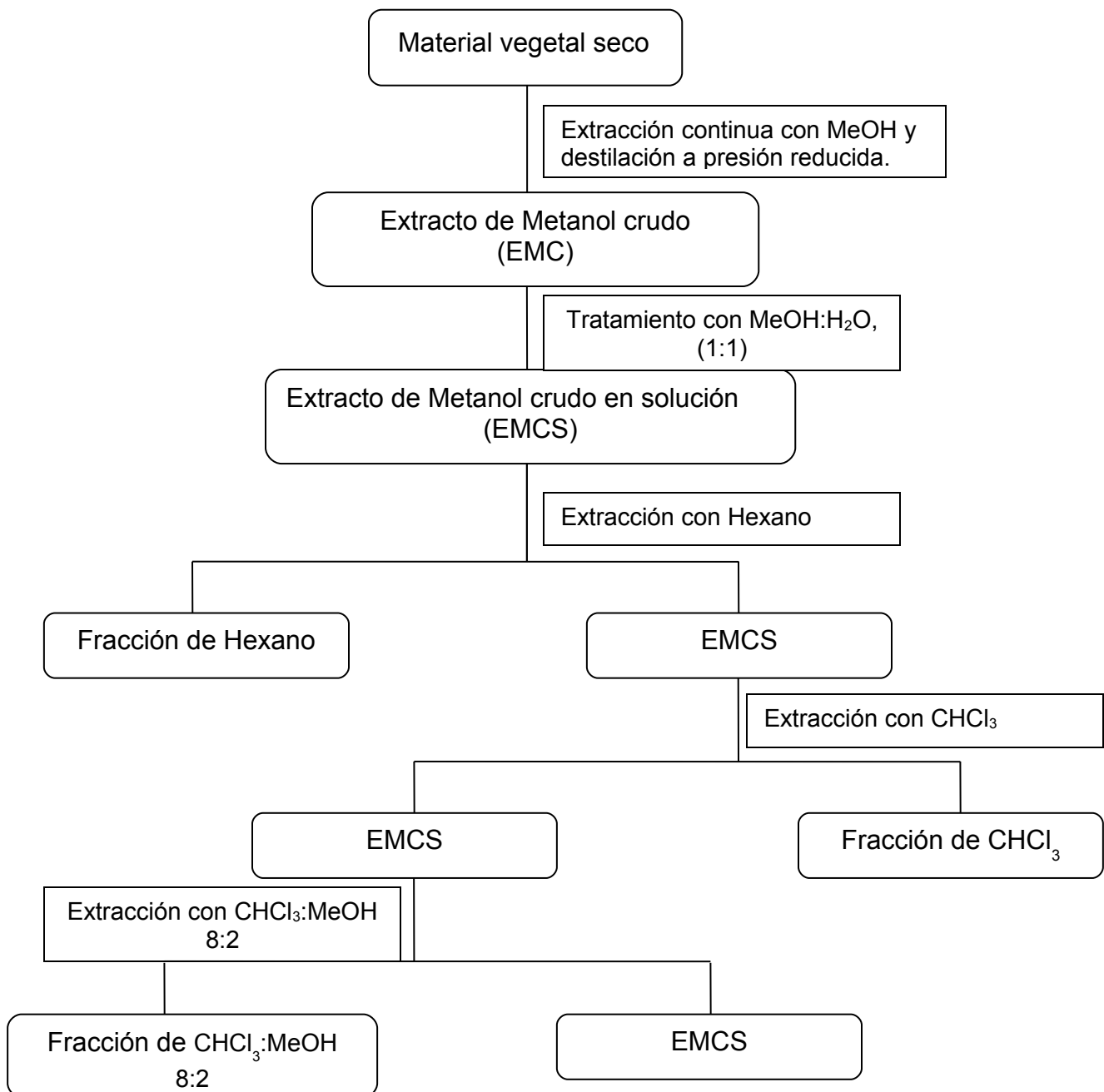
- . Lámpara ultravioleta (UV): UVSL-25 onda corta (254nm) y onda larga (365nm).
- . Los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT 135, fueron tomados en un espectrómetro JOEL de 270 MHz y Bruker de 500 MHz.
- . Los espectros de infrarrojo fueron tomados en película, registrados en un Espectrómetro de Transformadas de Furier (FT-IR) marca Nicole modelo exus 490-ESP.
- . Los espectros de UV/VIS fueron tomados en metanol en un espectrómetro Marca PerkinElmer, modelo Lambda 25.

3.3.- Análisis Fitoquímico

La muestra al ser colectada se secó al sol por dos días. Posteriormente, se separaron las hojas de los tallos. Las hojas secas se colocaron en un Soxhlet para seguidamente dar inicio a la maceración empleando metanol a temperatura ambiente. La maceración consistió en agregar semanalmente metanol, hasta obtener un solvente claro. Una vez obtenido el solvente con leve coloración, se procedió a la destilación del solvente a presión reducida. Obteniéndose de esta manera el extracto de metanol crudo, se hicieron particiones aumentando la polaridad de los solventes, de las cuales se obtuvieron cuatro extractos, el primero de hexano, luego cloroformo, cloroformo/metanol en una proporción de 8:2 y por último metanol.

Se eligieron al azar los extractos de cloroformo y de cloroformo/metanol 8:2 para la realización de esta investigación.

3.4-. Esquema Experimental



A las dos fracciones seleccionadas se les aplicó la técnica de cromatografía de capa fina (C.C.F.), donde se determinaron los tipos de compuestos y los solventes o la mezcla de solventes adecuada para su separación por cromatografía de columna, los extractos fueron tratados de la siguiente manera:

3.5.- Fracción de cloroformo: Se colocaron 2 g del extracto en una columna con sílica gel 60, ésta se eluyó primero con CHCl_3 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1), y por último MeOH. De la elución con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) se obtuvieron 3 fracciones, se eligió la que presentó mayor peso y menor cantidad de mezcla de compuestos, fracción 3 (377,71 mg). Dicha fracción se colocó en una columna y se separó con una mezcla $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (6:4). De la misma se obtuvo C1-1 (32 -45), C1-2 (47-91) y sus pesos son 35,18 mg y 47.03 mg respectivamente.

La muestra C1-1 se separó por cromatografía de placa preparativa y se separaron 5 compuestos, siendo mayoritario el Compuesto A (8,29 mg).

La muestra C1-2 también se separó por cromatografía de placa preparativa y se separaron 5 compuestos, de los cuales resultaron mayoritarios el Compuesto B (5,27 mg) y Compuesto C (17,28 mg).

3.6.- Fracción de cloroformo : metanol (8:2): Se colocó 1 g del extracto en una columna con sílica gel 60, ésta se eluyó primero con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (8:2), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (7:3), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (6:4) y por último MeOH. De la elución con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) se obtuvieron 5 fracciones, se eligieron las fracciones CM2 (72,12mg) y CM5 (4,87 mg) por presentar mayor peso y menor cantidad de mezcla de compuestos. La fracción CM5 fue renombrada Compuesto E.

Se colocó la fracción CM2 en una columna con sílica gel 60, ésta se eluyó primero con CHCl_3 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) y por último MeOH. De la elución con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) se obtuvieron 3 fracciones de las cuales se eligió la fracción C2-1 (20, 52 mg), por poseer mayor peso y menor mezclas de compuestos. Esta fracción se separó por cromatografía de placa preparativa.

De la fracción C2-1 se separaron 6 compuestos, 2P-1 (6,11 mg), 2P-2 (0,88 mg), 2P-3 (1,04 mg), 2P-4 (1,84 mg), 2P-5 (0.67 mg) y 2P-6 (0,38 mg). De estas fracciones se eligió la muestra 2P-1 que fue renombrada Compuesto D.

IV- Resultados y Discusión

6.1.- Compuestos aislados de la Fracción de Cloroformo

- Compuesto A:

De este compuesto se obtuvo 8,29 mg y fue aislado de la fracción nombrada como 1P-1 (sólido de una coloración ámbar), la cual mostró una coloración amarilla frente al reactivo sulfato cérico indicativa de la presencia de flavonoide. Esto fue corroborado por la coloración amarilla observada al rociar con el reactivo específico para flavonoides, Naturstoff. Una coloración amarilla indica que se está en presencia de un esqueleto tipo flavonol⁵⁷.

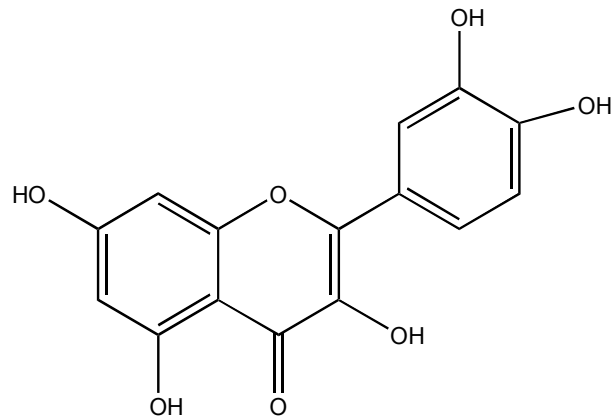
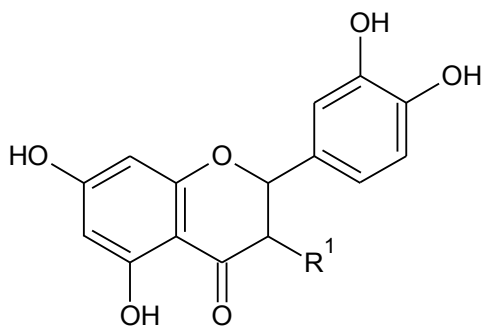


Fig.1. Estructura de la Quercetina

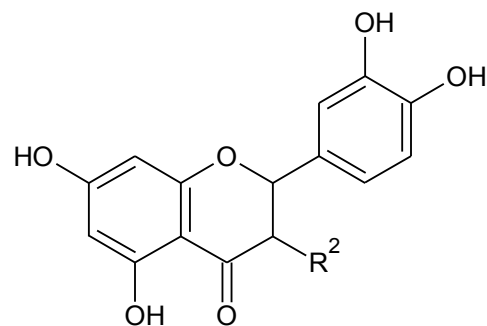
Una revisión bibliográfica sobre el género *Cnidocolus* indica que compuestos de este tipo han sido aislados:

Glicósidos de Quercetina:

3-O-rhamnosido



3-O-rhamnosilglucósido



R¹: Rhamnosa

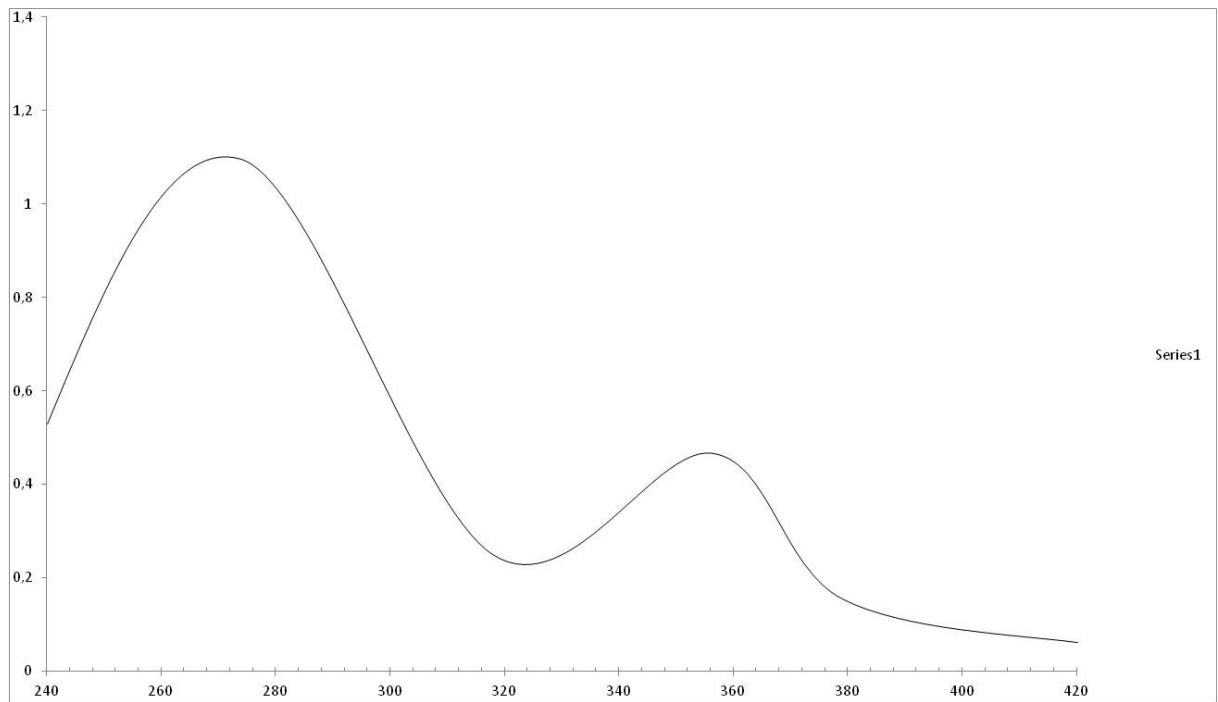
R²:Rhamnosa-Glucosa

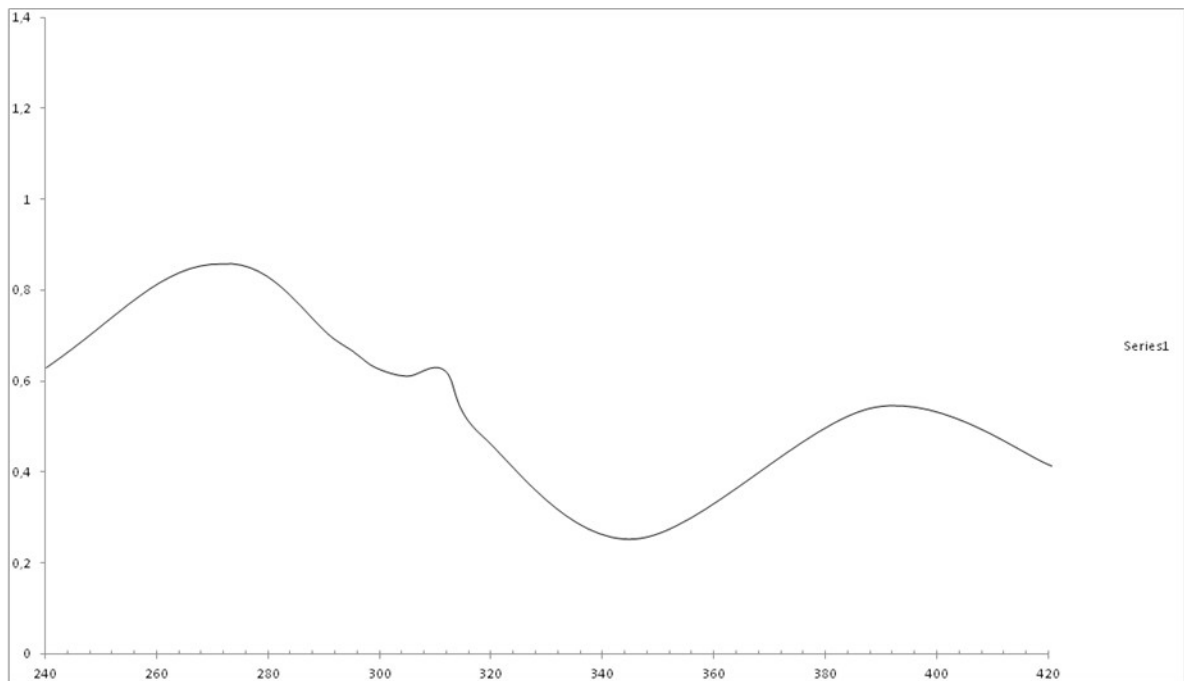
Este compuesto fue parcialmente caracterizado mediante UV-V e Infrarrojo.

Espectro UV-V

Los espectros de flavonoides típicamente consisten en dos bandas de absorción máxima en el rango de 240 – 285 nm (banda I) y 300 – 500 nm (banda II). La posición precisa y las intensidades relativas de estos máximos proporcionan información importante sobre la naturaleza del flavonoide y su patrón de oxigenación. La posición de los grupos hidroxilos fenólicos no sustituidos en el núcleo de los flavonoides pueden establecerse mediante la adición de reactivos de desplazamiento (como lo son metóxido de sodio y acetato de sodio, entre otros) a la muestra disuelta en metanol y la observación de los cambios resultantes de los picos de absorción⁵⁸.

El espectro UV del compuesto A mostró bandas a 273 y 356 nm. Al adicionar acetato de sodio no hubo desplazamiento que indicara la presencia de protones acidicos en la posición C-7. Sin embargo, la banda de absorción de 356nm fue desplazada a 394 nm con la adición de NaOMe lo que indica la presencia de grupo hidroxilo libre en la posición C-4'. La aparición de una nueva banda a 312 nm indica la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-7⁵⁹. Se podría decir que la concentración de NaOAc era muy baja para reaccionar con ese grupo hidroxilo y por eso no se observó un desplazamiento apreciable.

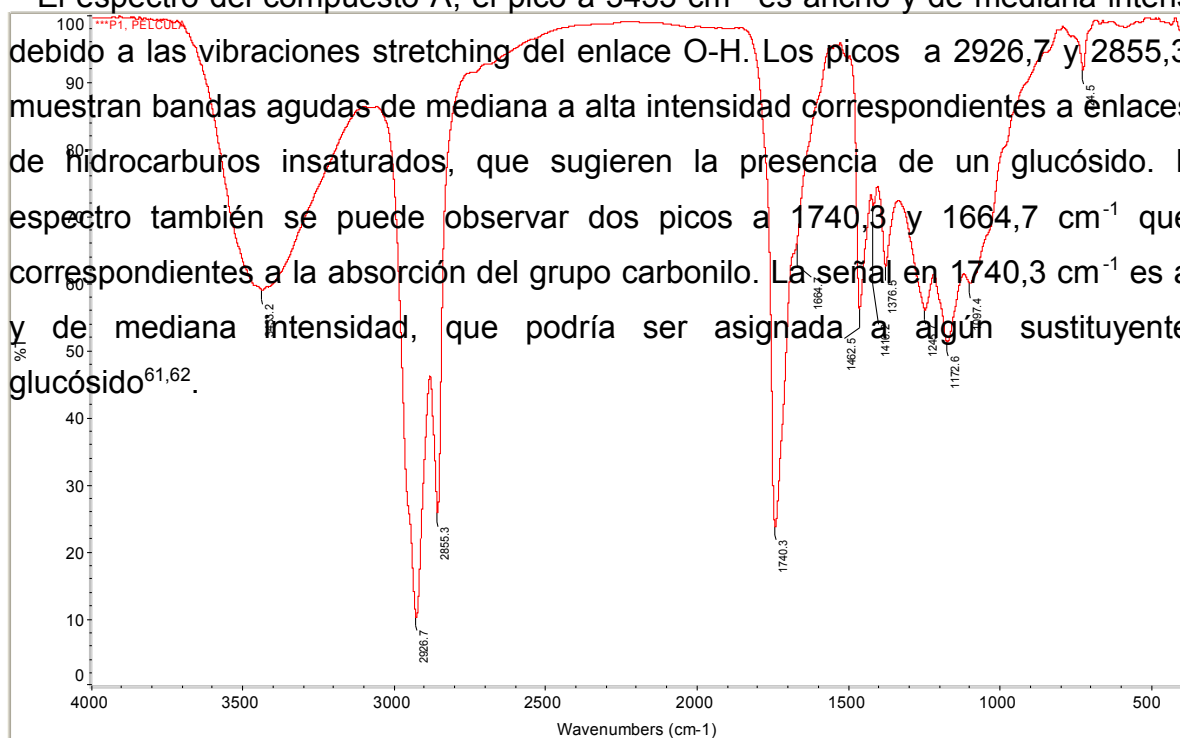
Fig.2 Compuesto A en MeOH**Fig.3 Compuesto A en Metoxido de Sodio**



Espectro IR

La espectroscopia IR es frecuentemente utilizada en estudios fitoquímicos como un dispositivo de “huella dactilar”, para comparar una muestra natural con una sintética. La complejidad del espectro de infrarrojo se presta particularmente bien para ese propósito. Además las comparaciones son muy importantes para una completa caracterización de compuestos naturales⁶⁰.

El espectro del compuesto A, el pico a 3433 cm^{-1} es ancho y de mediana intensidad, debido a las vibraciones stretching del enlace O-H. Los picos a $2926,7$ y $2855,3\text{ cm}^{-1}$ muestran bandas agudas de mediana a alta intensidad correspondientes a enlaces C-H de hidrocarburos insaturados, que sugieren la presencia de un glucósido. En el espectro también se puede observar dos picos a $1740,3$ y $1664,7\text{ cm}^{-1}$ que son correspondientes a la absorción del grupo carbonilo. La señal en $1740,3\text{ cm}^{-1}$ es aguda y de mediana intensidad, que podría ser asignada a algún sustituyente del glucósido^{61,62}.



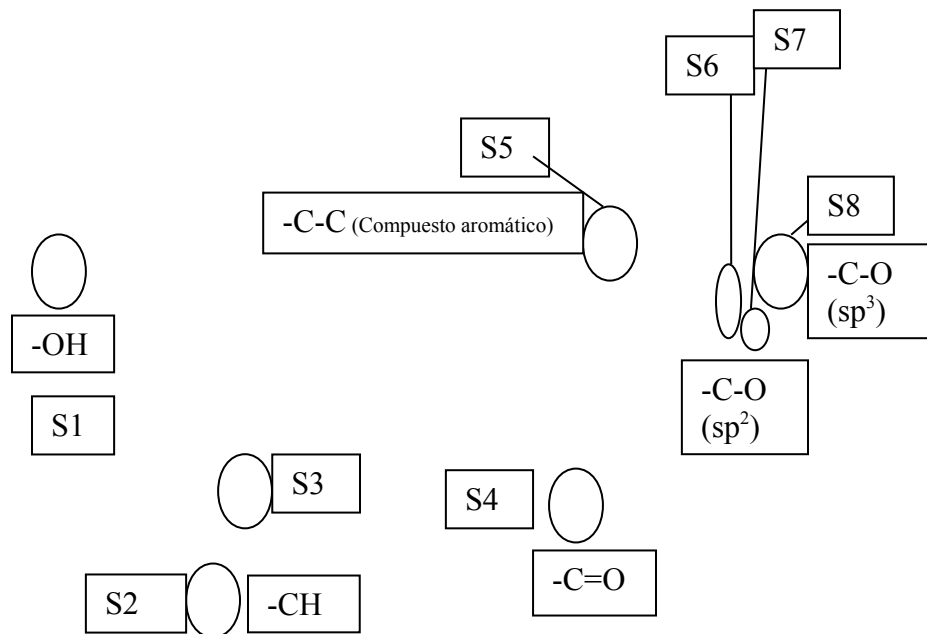


Fig.4 Espectro IR del Compuesto A

Compuesto B

Este compuesto fue aislado de la fracción nombrada como 6P-3 (sólido de una coloración ámbar), la cual mostró una coloración amarilla en sulfato cérico indicativa de la presencia de flavonoide. Esto fue corroborado por la coloración amarilla observada al rociar con el reactivo específico para flavonoides, Naturstoff. De este compuesto se obtuvo 5,27 mg. Como fue mencionado anteriormente, una coloración amarilla indica que estamos en presencia de un esqueleto tipo quercetina⁶³, lo cual es característico de lo que se ha encontrado en los estudios anteriores sobre el género de la planta.

Este compuesto fue parcialmente caracterizado mediante UV-V e Infrarrojo.

Espectro UV

El espectro UV del compuesto B mostró bandas a 256 y 368 nm. Al adicionar acetato de sodio no hubo desplazamiento que indicara la presencia de protones acidicos en la posición C-7. Sin embargo la banda de absorción de 368nm fue desplazada a 386 nm con la adición de NaOMe lo que indica la presencia de grupo hidroxilo libre en la

posición C-4'. La aparición de una nueva banda a 304 nm indica la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-7⁶⁴. Se podría decir que la concentración de NaOAc era muy baja para reaccionar con ese grupo hidroxilo y por eso no se observó un desplazamiento apreciable.

Fig.5 Compuesto B en MeOH

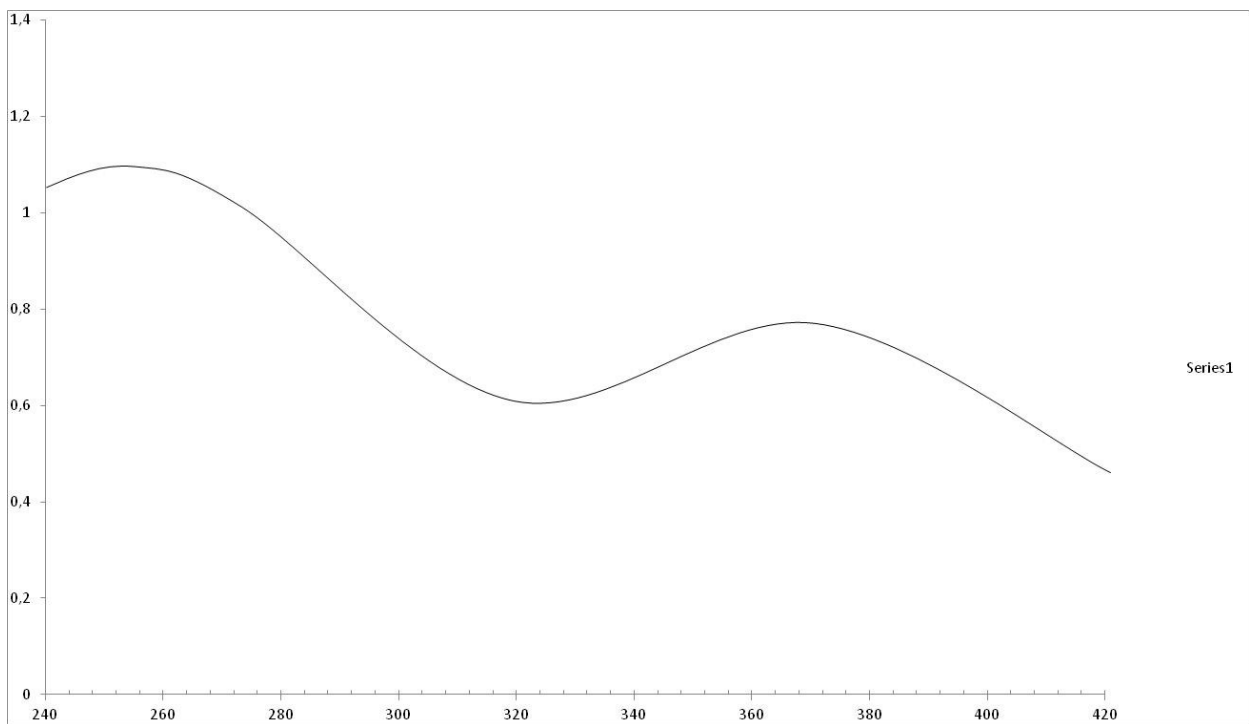
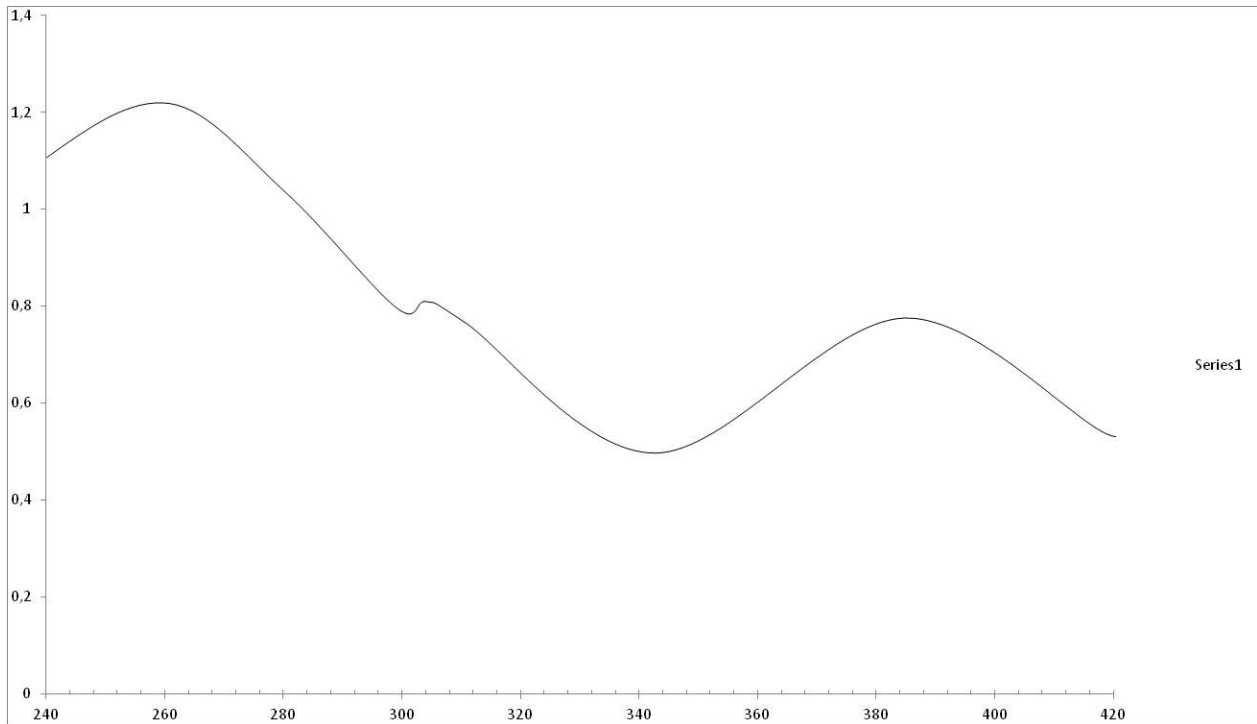
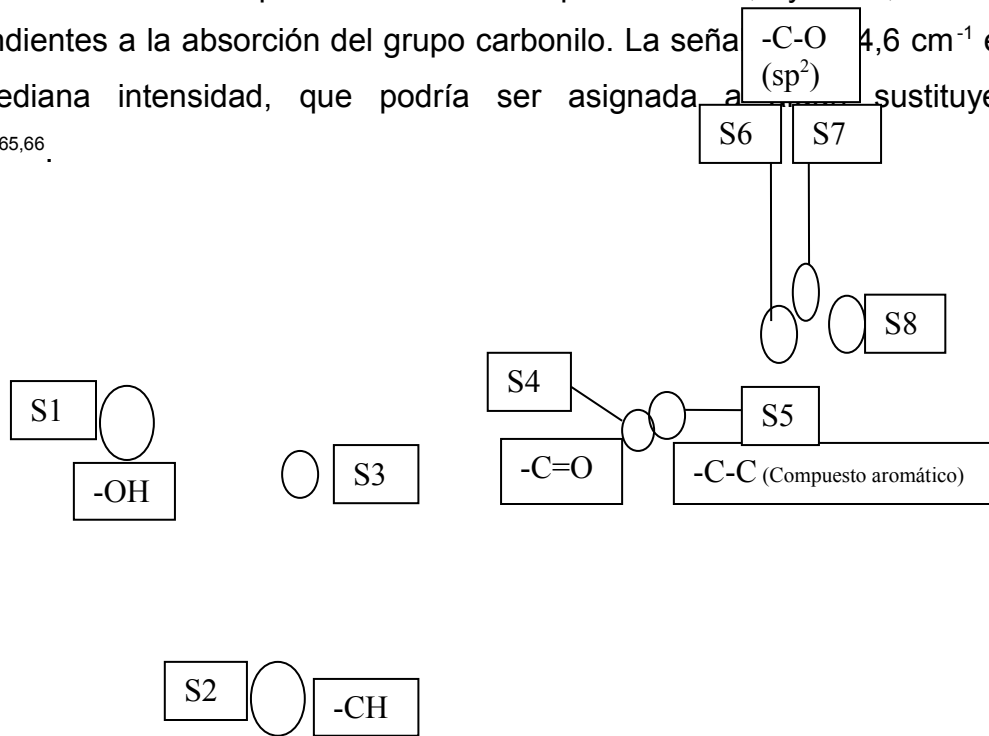


Fig.6 Compuesto B en Metóxido de Sodio



Espectro de IR

El espectro del compuesto B el pico a $3394,2 \text{ cm}^{-1}$ es ancho y de mediana intensidad, debido a las vibraciones stretching del enlace O-H. Los picos a $2956,5$; $2925,7$ y $2854,6 \text{ cm}^{-1}$ muestran bandas agudas de mediana a alta intensidad correspondientes a enlaces C-H de hidrocarburos insaturados, que sugieren la presencia de un glucósido. En el espectro también se puede observar dos picos a $1714,6$ y $1671,0 \text{ cm}^{-1}$ que son correspondientes a la absorción del grupo carbonilo. La señal a $1460,0 \text{ cm}^{-1}$ es aguda y de mediana intensidad, que podría ser asignada a un sustituyente del glucósido^{65,66}.



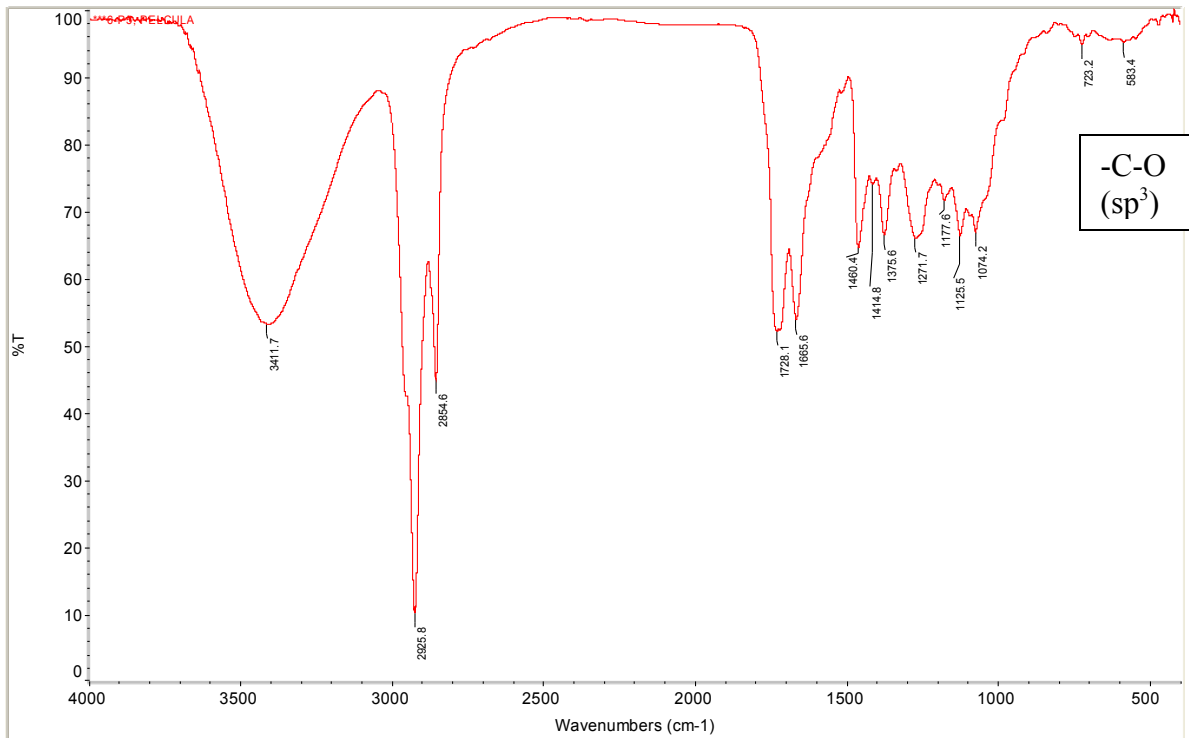


Fig.7 Espectro IR del Compuesto B

Compuesto C

De este compuesto se obtuvo 17,28mg y fue aislado de la fracción nombrada como 6P-4 (sólido de una coloración ámbar), la cual mostró una coloración amarilla en sulfato cérico indicativa de la presencia de flavonoide. Esto fue corroborado por la coloración amarilla observada al rociar con el reactivo específico para flavonoides, Naturstoff⁶⁷.

Espectro UV

El espectro UV del compuesto C mostró bandas a 260 y 342 nm. Al adicionar acetato de sodio no hubo desplazamiento que indicara la presencia de protones ácidos en la posición C-7. Sin embargo la banda de absorción de 342nm fue desplazada a 368 nm con la adición de NaOMe lo que indica la presencia de grupo hidroxilo libre en la

posición C-4⁶⁸. No se observó la aparición de una tercera banda lo que confirma que en la posición 7 pudiese no haber un grupo hidroxilo libre.

Fig.8 Compuesto C en Metanol

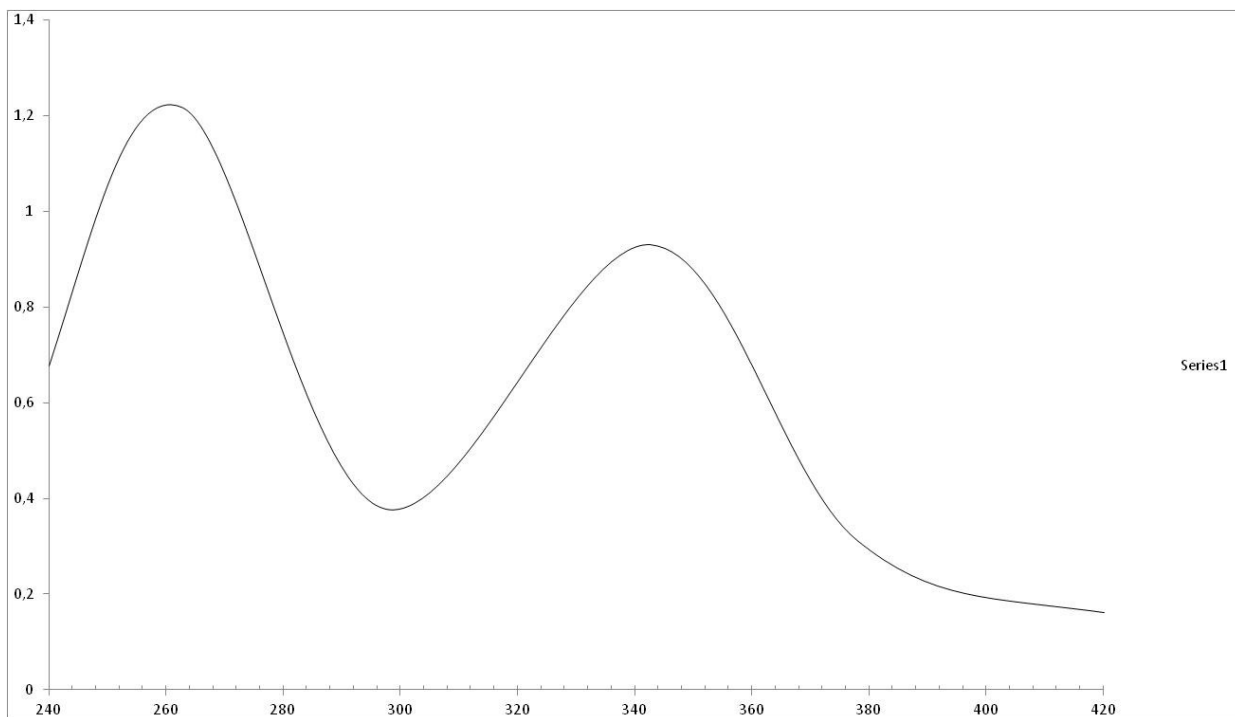
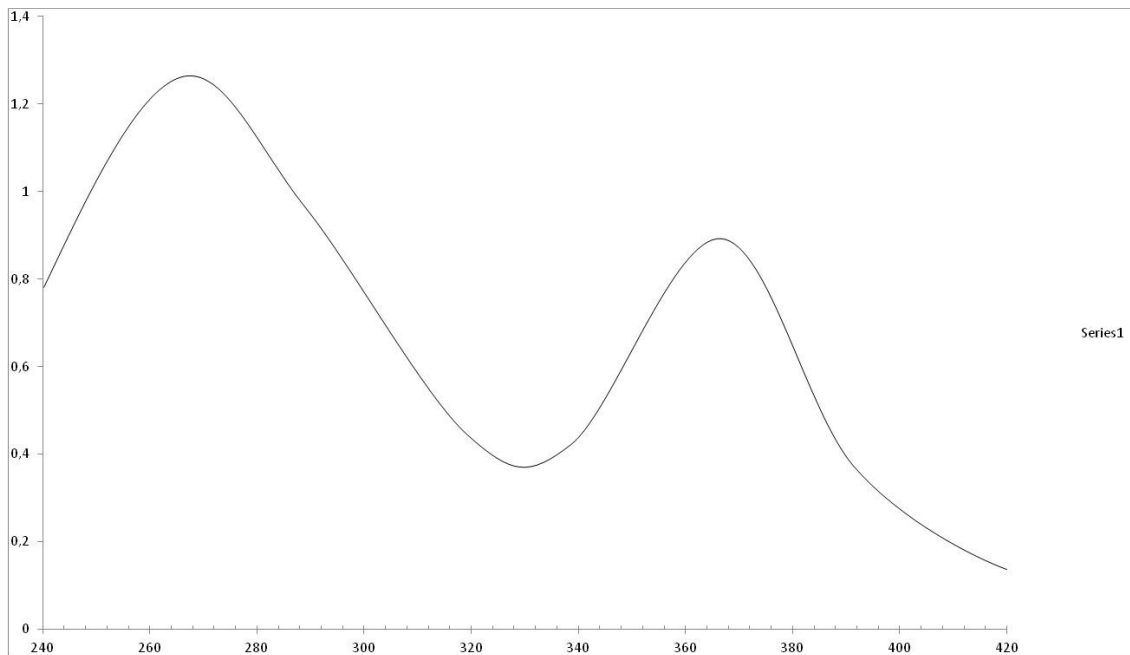


Fig.9 Compuesto C en Metóxido de Sodio



Espectro de IR

El espectro del compuesto C el pico a $3408,0 \text{ cm}^{-1}$ es ancho y de alta intensidad, debido a las vibraciones stretching del enlace O-H. Los picos a $3028,9$; $2967,8$; $2929,5$ y $2874,4 \text{ cm}^{-1}$ muestran bandas agudas de mediana a alta intensidad correspondientes a enlaces C-H de hidrocarburos insaturados, que sugieren la presencia de un glucósido. En el espectro también se puede observar dos picos a $1710,6$ y $1655,2 \text{ cm}^{-1}$ que son correspondientes a la absorción del grupo carbonilo. La señal en $1714,6 \text{ cm}^{-1}$ es aguda y de baja intensidad, que podría ser asignada a algún sustituyente del glucósido^{69,70}.

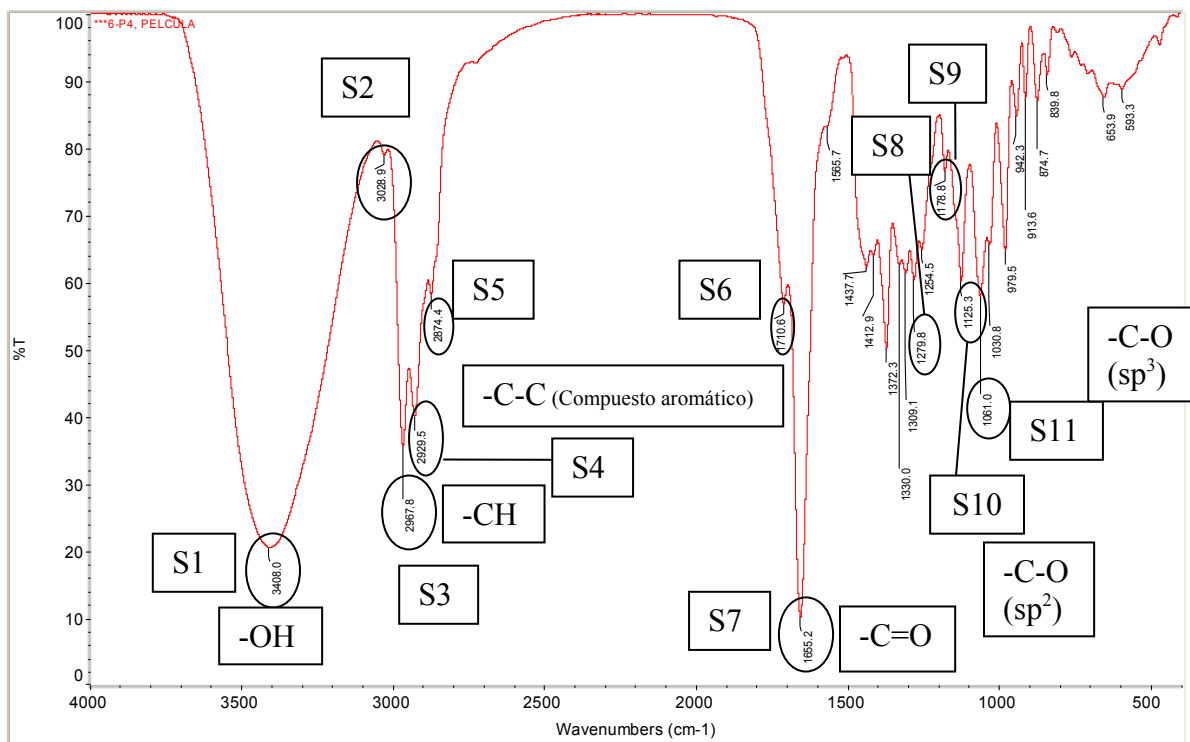


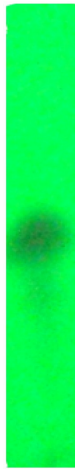
Fig.10 Espectro IR del Compuesto C

6.2.- Compuestos aislados de la fracción de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2

Compuesto D

De este compuesto se obtuvo 6,11 mg y fue aislado de la fracción nombrada como 2P-1 (sólido de una coloración ámbar), la cual mostró una coloración amarilla en sulfato cérico indicativa de la presencia de flavonoide. Esto fue corroborado por la coloración amarilla-verdosa observada al rociar con el reactivo específico para flavonoides, Naturstoff.

Placa Corrida en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1)



Rociado con Naturstoff



Una coloración amarilla-verdosa indica que estamos en presencia de un esqueleto tipo kempferol⁷¹.

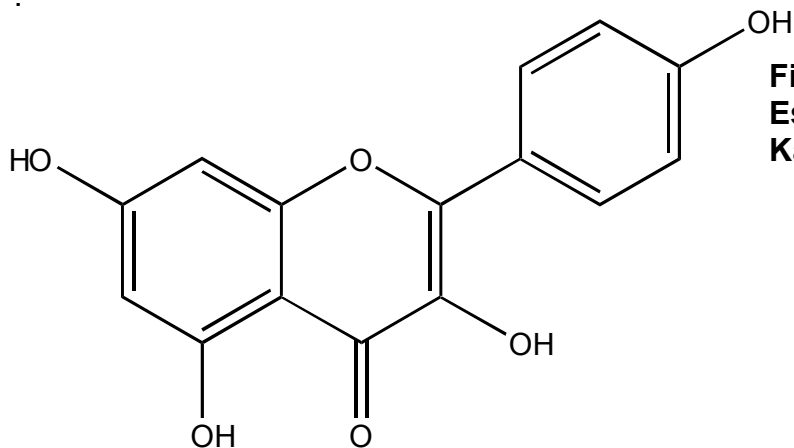
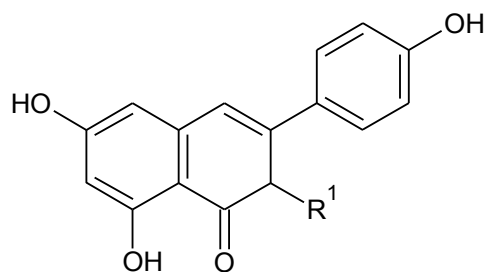


Fig.11
Estructura de
Kempferol.

Una revisión bibliográfica sobre el género *Cnidocolus* indica que compuestos de este tipo han sido aislados:

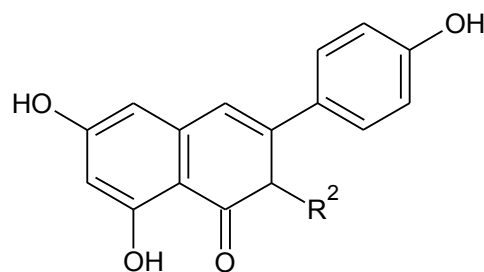
Glicósidos de Kampferol:

3-O-galactósido



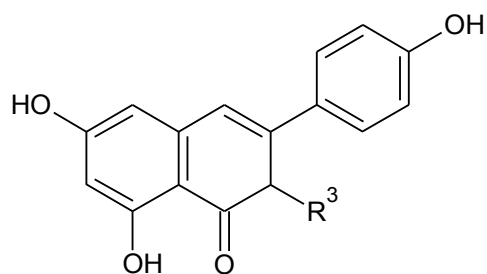
R¹: Galactosa

3-O-glucosido



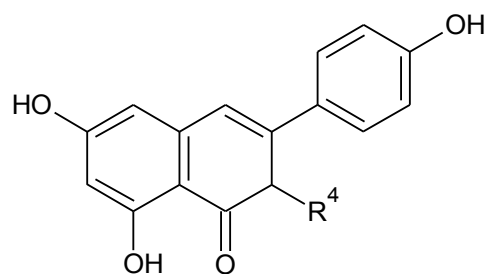
R²: Glucosa

3-O-rhamnósido



R³: Rhamnosa

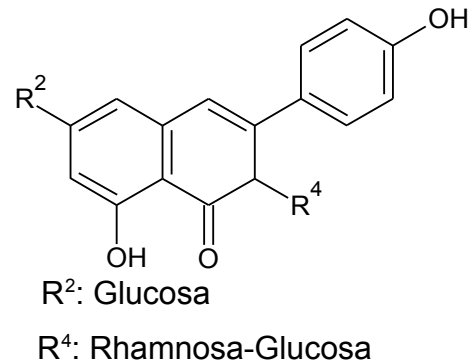
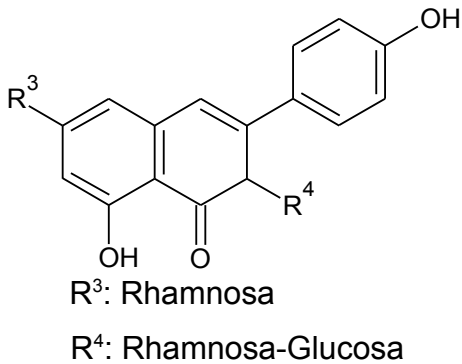
3-O-rhamnosilglicósido



R⁴: Rhamnosa-Glucosa

3-O-rhamnosilglicósido-7-O-rhamnósido

3-O-rhamnosilglicósido-7-O-glucósido



Este compuesto fue parcialmente caracterizado mediante UV-V e Infrarrojo.

Espectro UV

El espectro UV del compuesto D mostró bandas a 256 y 345 nm. Al adicionar acetato de sodio no hubo desplazamiento que indicara la presencia de protones acidicos en la posición C-7. Sin embargo, la banda de absorción de 345nm fue desplazada a 384 nm con la adición de NaOMe lo que indica la presencia de grupo hidroxilo libre en la posición C-4'. La no reacción con el AcONa y la no aparición de una tercera banda al adicionar metóxido de sodio indica que en la posición C-7 no hay presencia grupo hidroxilo libre con el cual se pueda llevar a cabo la reacción acido-base⁷². Por lo que se podría pensar que esa posición está ocupada por otro sustituyente.

Fig.12 Compuesto D en Metanol

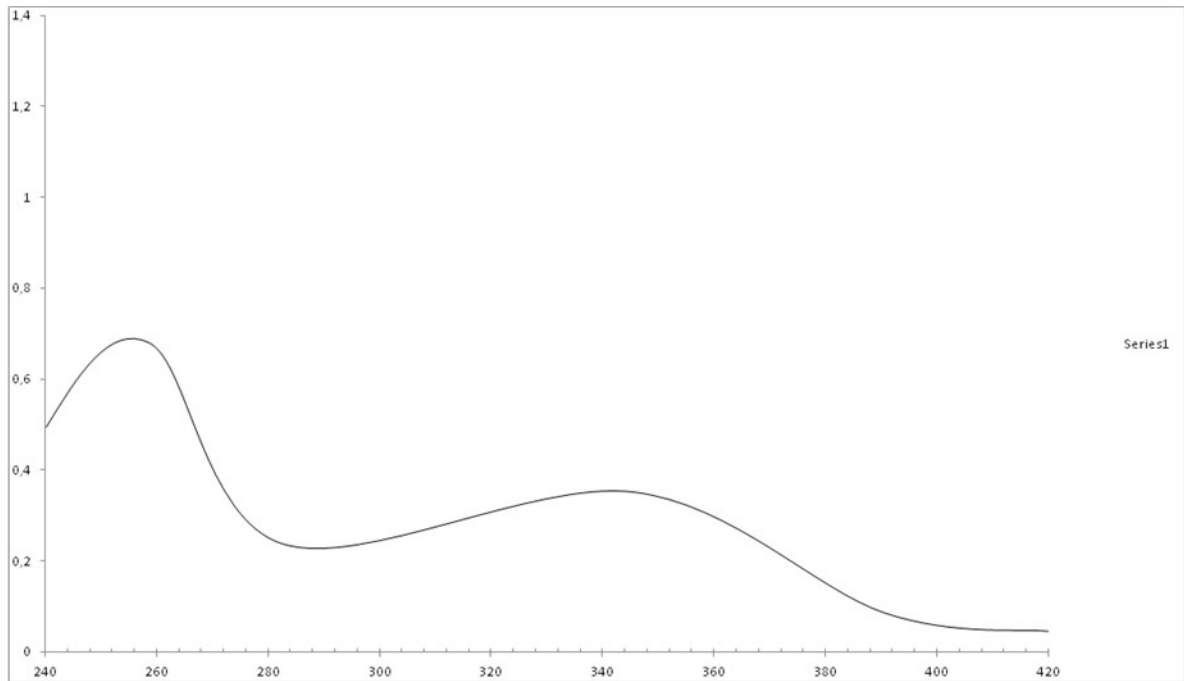
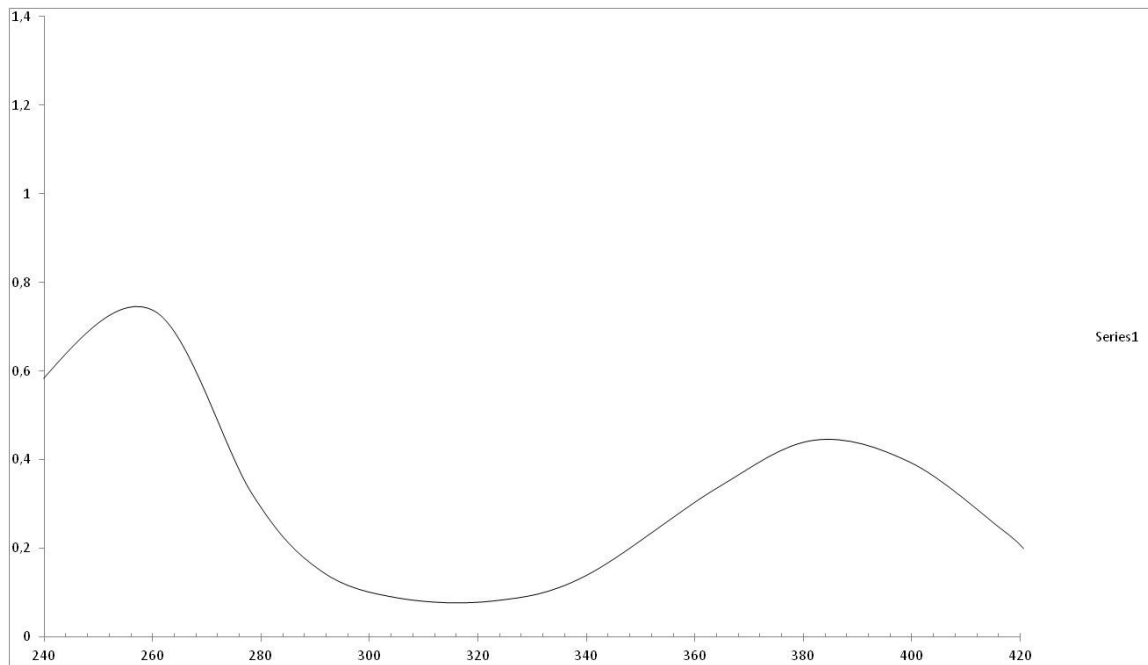


Fig.13 Compuesto D en Metóxido de Sodio



Espectro IR

El espectro del compuesto D el pico a $3428,5\text{ cm}^{-1}$ es ancho y de alta intensidad, debido a las vibraciones stretching del enlace O-H. Los picos $2926,4$ y $2854,9\text{ cm}^{-1}$ muestran bandas agudas de mediana a alta intensidad correspondientes a enlaces C-H de hidrocarburos insaturados, que sugieren la presencia de un glucósido. En el espectro también se puede observar dos picos a $1714,2$ y $1670,3\text{ cm}^{-1}$ que son correspondientes a la absorción del grupo carbonilo. La señal en $1714,2\text{ cm}^{-1}$ es aguda y de baja intensidad, que podría ser asignada a algún sustituyente del glucósido^{73,74}.

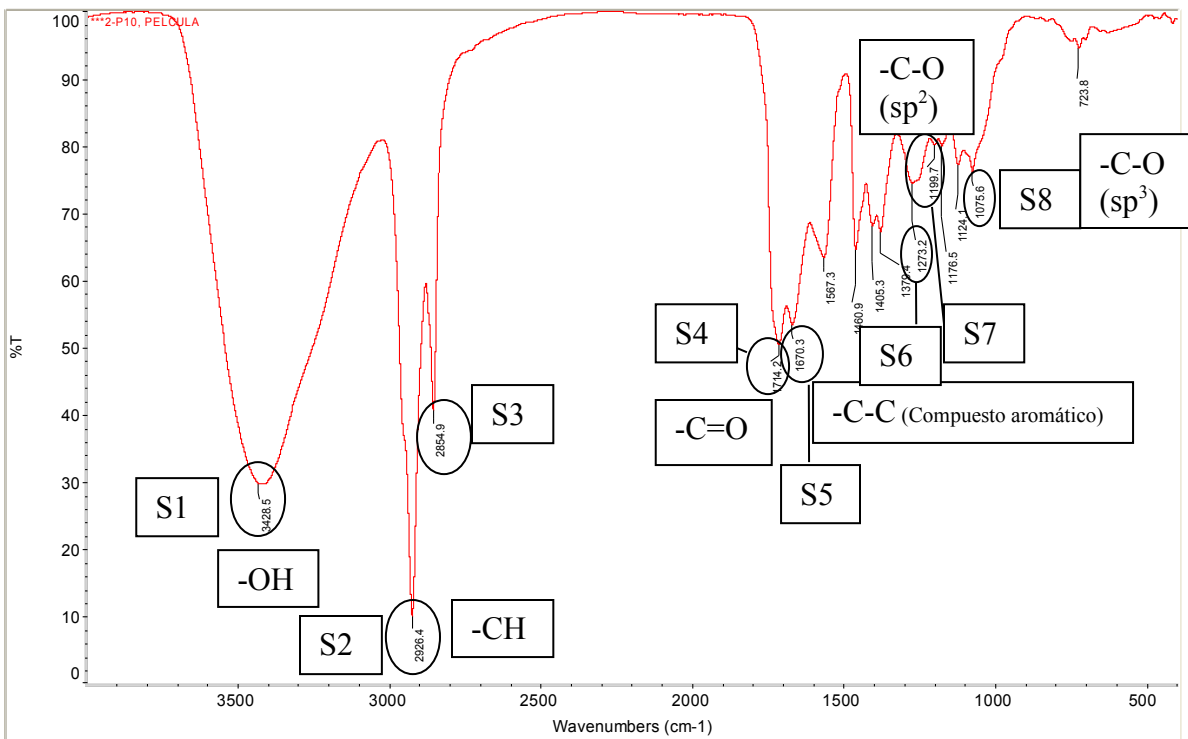


Fig. 14 Espectro IR del Compuesto D

Compuesto E

Este compuesto fue aislado de la fracción nombrada como CM5 (sólido de una coloración ámbar), la cual mostró una coloración amarilla en sulfato cérico indicativa de la presencia de flavonoide. Esto fue corroborado por la coloración amarilla observada al rociar con el reactivo específico para flavonoides, Naturstoff⁷⁵. De este compuesto se obtuvo 4,87 mg.

Espectro UV

El espectro UV del compuesto D mostró bandas a 256 y 345 nm. Al adicionar acetato de sodio la banda de 345nm fue desplazada a 380nm lo que indica la presencia de protones acidicos en la posición C-7. Con la adición de NaOMe la banda de 345nm fue desplazada a 385nm lo que indica la presencia de grupo hidroxilo libre en la posición C-4'. Además la aparición de una nueva banda a 325nm corrobora la presencia del grupo hidroxilo en la posición C-7⁷⁶.

Fig. 15 Compuesto E en Metanol

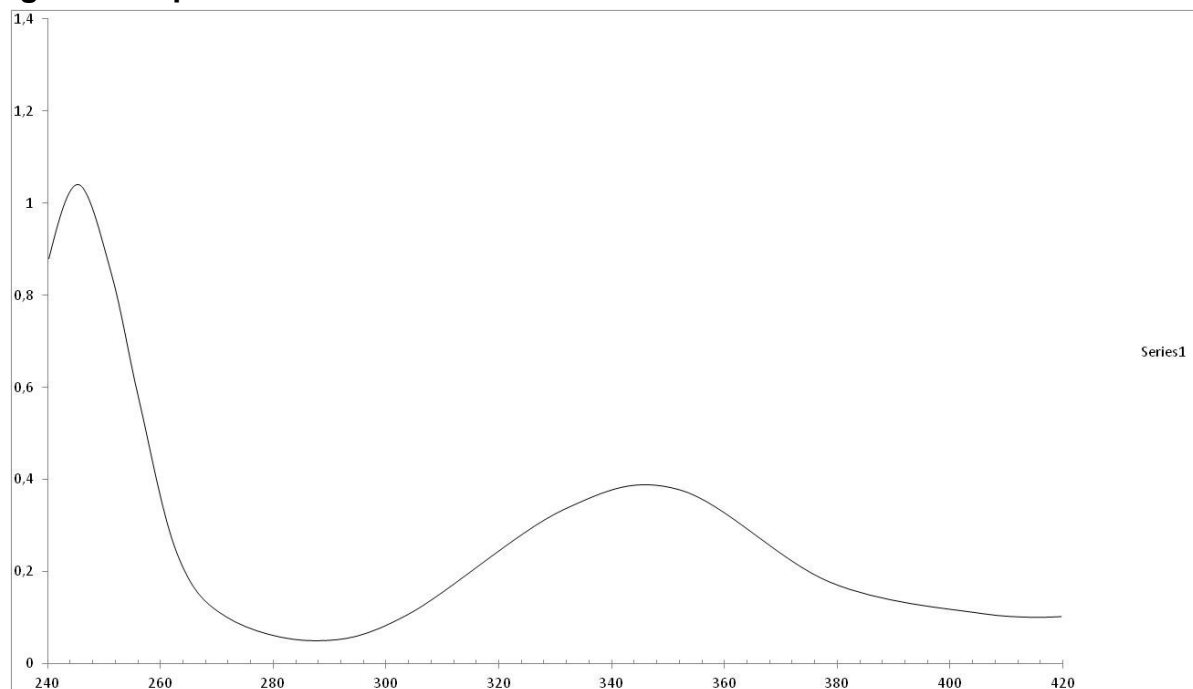
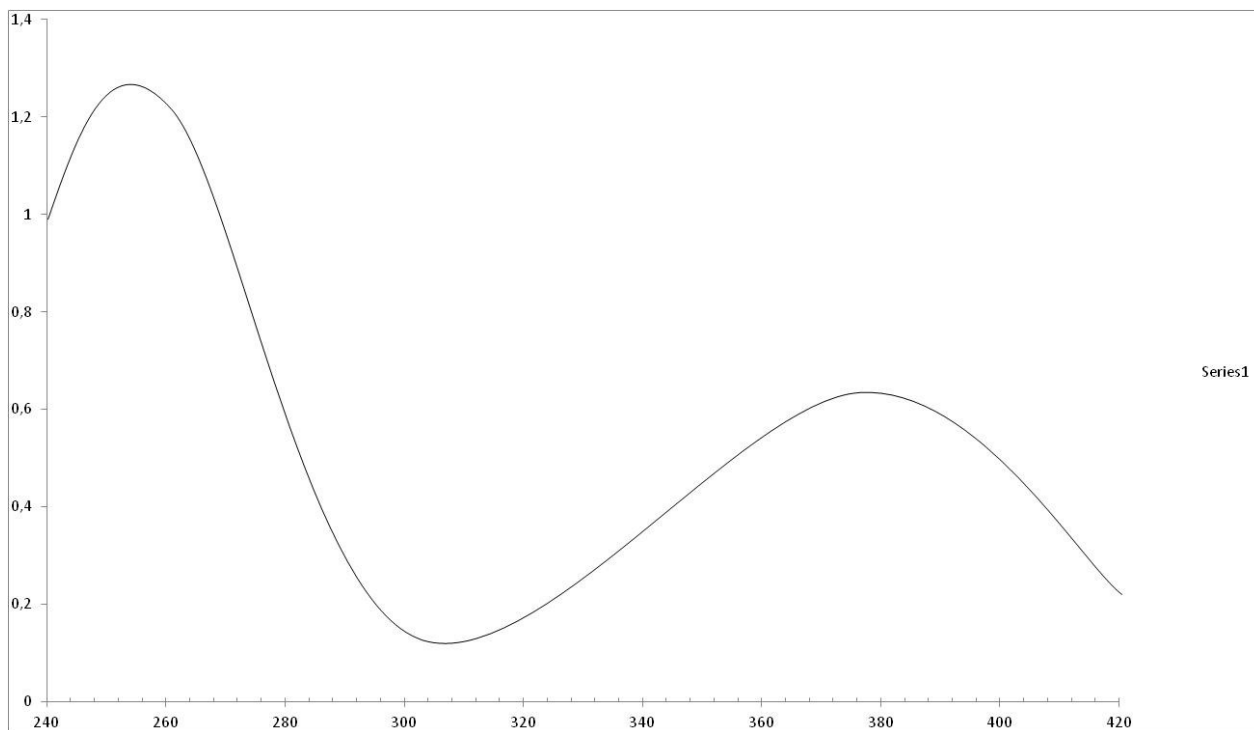
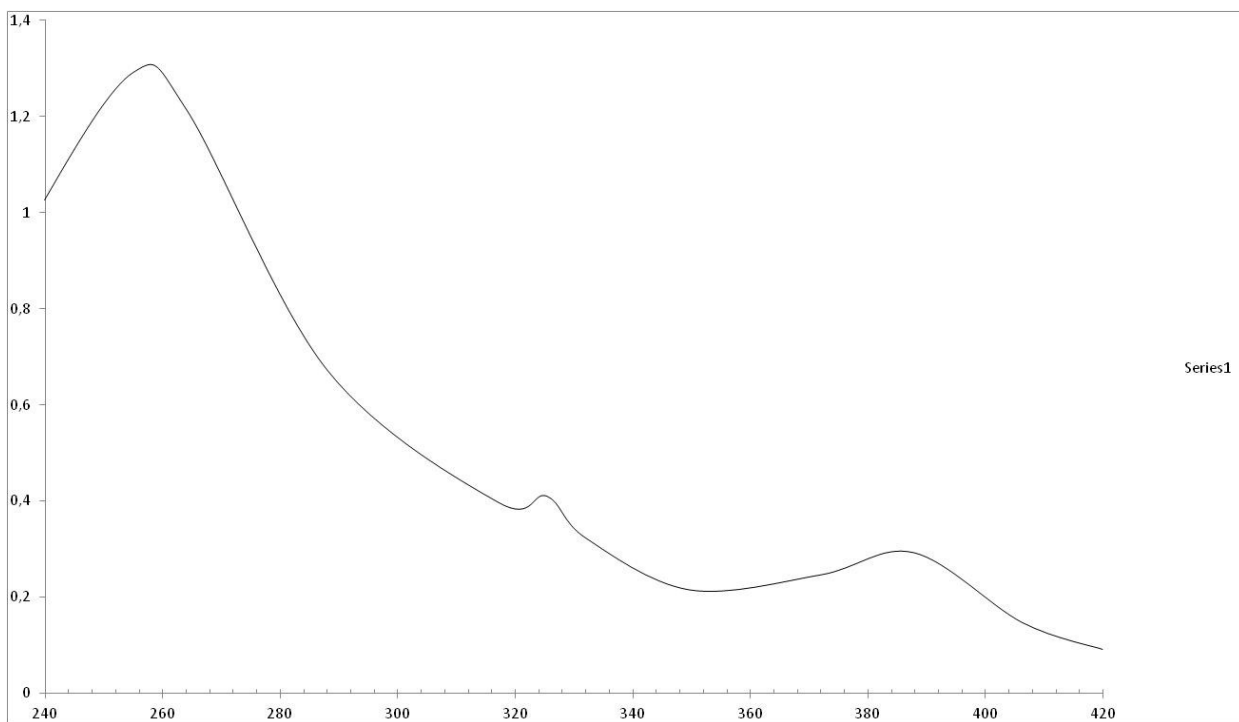


Fig. 16 Compuesto E en Acetato de Sodio**Fig.17 Compuesto E en Metóxido de Sodio**

Espectro IR

El espectro del compuesto D el pico a $3392,3\text{ cm}^{-1}$ es ancho y de media intensidad, debido a las vibraciones stretching del enlace O-H. Los picos $2956,0$; $2924,9$ y $2854,1\text{ cm}^{-1}$ muestran bandas agudas de mediana a alta intensidad correspondientes a enlaces C-H de hidrocarburos insaturados, que sugieren la presencia de un glucósido. En el espectro también se puede observar dos picos a $1711,0$ y $1655,0\text{ cm}^{-1}$ que son correspondientes a la absorción del grupo carbonilo. La señal en $1711,0\text{ cm}^{-1}$ es aguda y de baja intensidad, que podría ser asignada a algún sustituyente del glucósido^{77,78}.

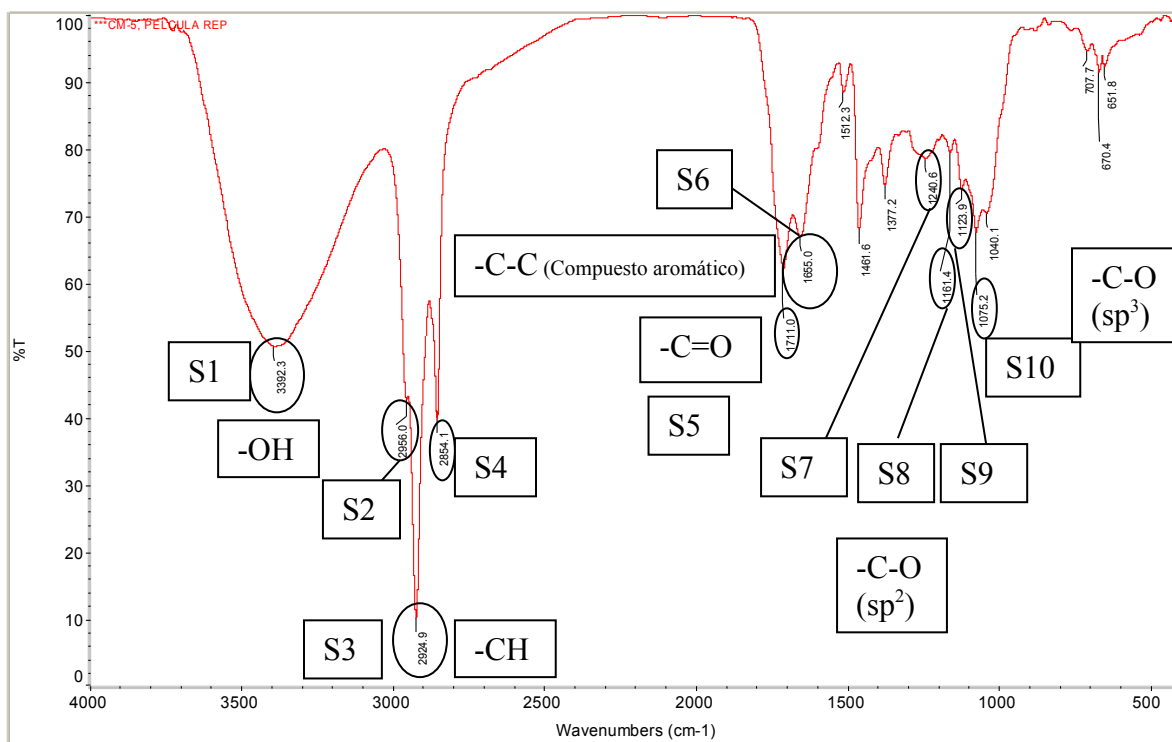
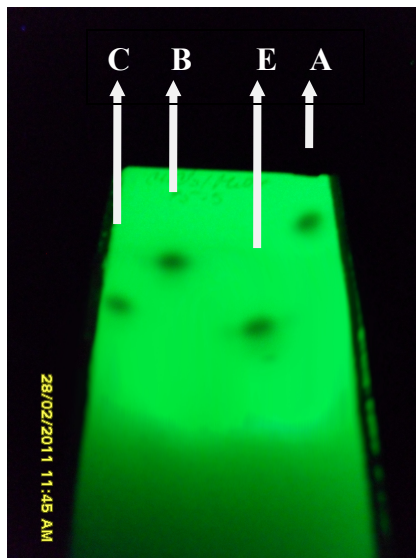


Fig. 18 Espectro IR del Compuesto E

Para comprobar que los compuestos A, B, C y E eran diferentes entre sí, se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) comparativa con diferentes solventes, para comparar los valores de Rf. Por ejemplo, una cromatografía de capa fina en cloroformo, dio los siguientes resultados: compuesto A tuvo un Rf de 4,2cm; el compuesto B presentó un Rf de 3,6cm; el compuesto C mostró un Rf de 3cm y el compuesto D tuvo un Rf de 2,5 cm. Los Rf resultantes fueron diferentes entre sí, por lo que se puede inferir que los compuestos son diferentes ya que presentan distinta polaridad. Se podría inferir que los compuestos presentan un solo sustituyente de tipo glicósido, ya que presentan Rf relativamente altos para ser compuestos con una gran cantidad de grupos hidroxilo.

Placa Corrida en CHCl_3



Placa Rociada con Naturstoff



Fig.19 Fotos de TLC comparativa realizadas para los compuestos aislados C,B,D y A

Se pueden observar diferencias entre los compuestos que se colorearon de amarillo con el reactivo especial para flavonoides, naturstoff. La diferencia entre dichos espectros se encuentra en lo que se refiere a las señales correspondientes a la “huella dactilar” del compuesto, por ejemplo el compuesto A presentó sólo una señal en 724,5

cm^{-1} , el compuesto B presentó dos señales en $723,2$ y $583,4$ cm^{-1} , el compuesto C presentó varias señales, $979,5$; $942,3$; $913,6$; $874,7$; $839,8$; $653,9$ y $593,3$ cm^{-1} y el compuesto E presentó tres señales en $707,7$; $670,4$ y $651,8$ cm^{-1} . Este hecho podría ayudar a deducir que aunque son compuestos que presentan el mismo esqueleto de quercetina mostrado anteriormente, a su vez son compuestos que pueden poseer en su estructura distintos sustituyentes entre ellos, lo que hace notable su diferencia en esa zona del espectro.

Si se compara el espectro IR reportado en la literatura para la quercetina, se puede observar que hay señales similares; por ejemplo: la señal en 3407 cm^{-1} que indica la presencia de grupos hidroxilos, 1093 cm^{-1} que indica la presencia de C-O sp^3 , 1169 cm^{-1} debido a la presencia de C-O sp^2 , 1660 cm^{-1} que muestra que se está en presencia de un compuesto aromático. Estas señales son cercanas a los resultados arrojados por los espectros IR de los compuestos A, B, C y E. Lo que no dejaría lejos la posibilidad de que el esqueleto principal de esos compuestos fuese el de la quercetina.

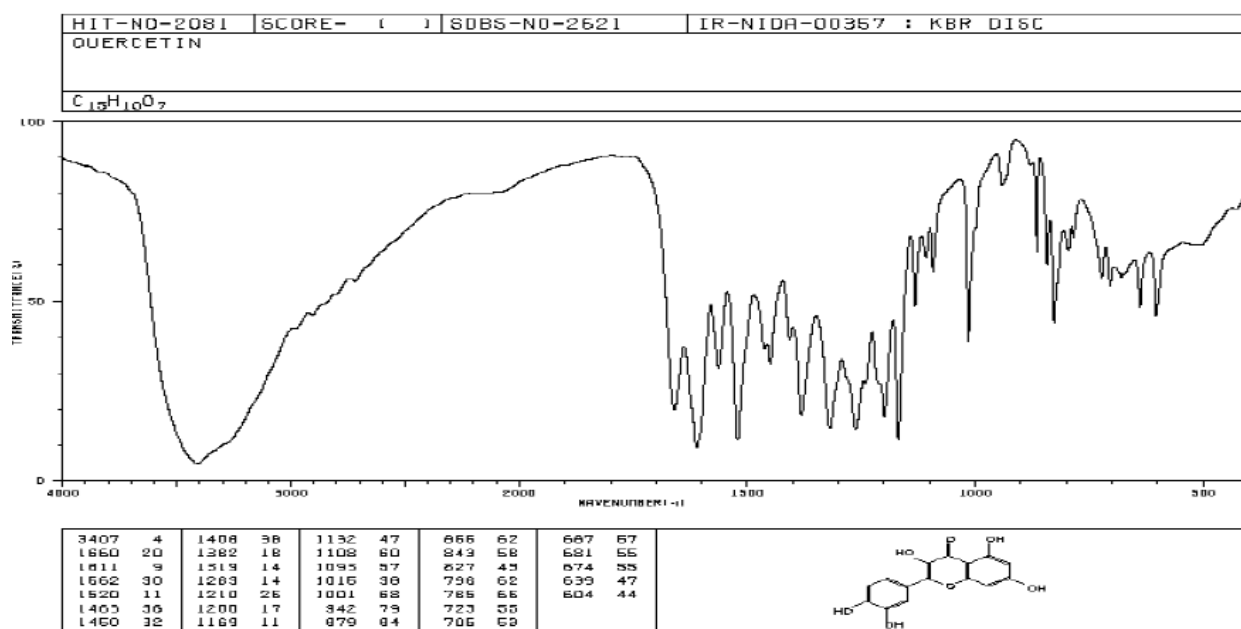


Fig.20 Espectro reportado en la literatura para la Quercetina⁷⁹

Como se sospecha de la existencia de compuestos glicosilados es válido hacer una comparación de los espectros IR de los compuestos aislados con los espectros IR de azúcares como la glucosa y la fructosa.

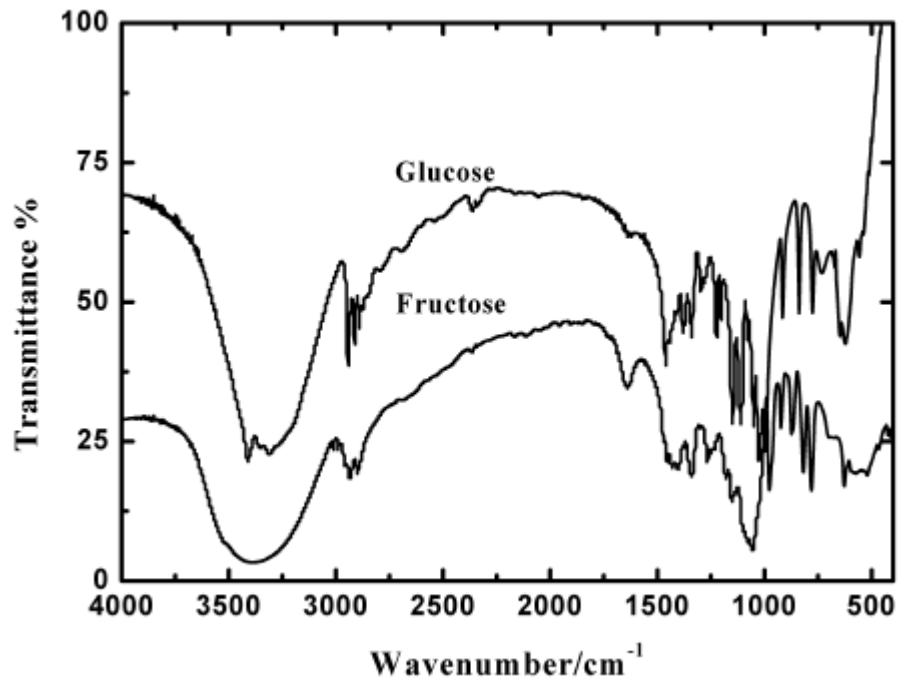


Fig.21 Espectro reportado en la literatura de la Glucosa y la Fructosa

En la figura se observa en la región de 600 a 1500 cm^{-1} , señales las vibraciones de los grupos C-O y C-C que están presente y generalmente los carbohidratos muestran esas bandas características. Si se compara esa región con los espectros IR de los compuestos A, B, C, D y E, se puede apreciar en esa región hay señales que podrían indicar la presencia de azúcares. Por otra parte el espectro de esas azúcares presenta señales de 2900 a 3450 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de los grupos C-H y O-H⁸⁰. Señales que se pueden observar en los espectros IR de los compuestos aislados. Si bien no se puede afirmar con certeza que se trata de la glucosa o de la fructosa, si se pudiese decir que se está en presencia de compuestos glicosilados.

Comparando estos resultados con los reportados en la literatura se puede inferir sobre la presencia de flavonoides en ambas fracciones de la planta (fracción de cloroformo y fracción de cloroformo/metanol 8:2). Podrían tratarse de flavonoides glicosilados debido a particulares señales observadas en los espectros de IR. Aunque no se pudieron identificar los compuestos, parcialmente se caracterizaron, cuyos resultados concuerdan con los estudios que anteriormente se han hecho sobre la especie *Cnidocolus chayamansa* y su género *Cnidocolus*.

V-. Conclusiones

- De las hojas de la planta *Cnidocolus chayamansa* se aislaron cinco compuestos con características de flavonoides.
- Se lograron aislar cuatro compuestos diferentes pero que presentan esqueleto de quercetina.
- Se aisló un compuesto con características de presentar un esqueleto de kaempferol.
- Los cinco compuestos aislados parecen estar glicosilados, debido a comparaciones realizadas entre los espectros de la fructosa y la glucosa con la región de “huella dactilar” de los compuestos obtenidos.
- No hay discrepancia entre los resultados obtenidos provenientes de las caracterizaciones realizadas de los compuestos, con los datos reportados en la literatura sobre el estudio de la planta *Cnidocolus chayamansa*.

VI- Recomendaciones

- Tomando en cuenta los resultados obtenidos por este trabajo se recomienda la continuación del estudio de los compuestos aislados mediante técnicas de RMN H-1 y RMN C13 para la lograr su completa identificación.
- Finalmente, se propone realizar un estudio biológico de los compuestos aislados, por ejemplo: actividad antitumoral y antioxidante, puesto que, se encuentran reportes de que ciertos compuestos extraídos de esta planta presentan una apreciable actividad biológica.

VI- Referencias Bibliográficas

- 1-. a) Sánchez – Medina A., K. García – Sosa, F. May – Pat y L. M. Peña – Rodríguez (2001): Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan, Traditional Medicine. Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*. 8 (2); 144 – 155. b) Lakshmi V. M. Folleto: Las plantas y sus propiedades curativas. Ediciones Gnosis Internacional, 1 – 36. c) Lira Mejía, M.C.: “Análisis de estudio para conocer el consumo de plantas medicinales en la localidad presa San Franco, San Diego de la Unión Guanajuato, México” en Observatorio de la Economía Latinoamericana, N°119, 2009.

- 2-. Díaz – Boglio J., (1975): Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*, Euphorbiaceae), A marvelous food. *Tierra*, 30, 407 – 408.

- 3-. Pérez B., Mariam (2004): La Chaya ¿Planta Milagrosa o falsa propaganda?

http://www.periodicolaperla.com/04_12_01/locales/locales_1.htm.

- 4-. *Cnidoscolus chayamansa* [Internet] 2009. Consultada en Diciembre 2009. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Cnidoscolus_chayamansa.

- 5-. Montoya Navarro, Wilson: Las maravillas de la Chaya Medicinal. *Revista El Agro*. (2004)

<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/agricultura/chaya.htm>.

- 6-. Nar Luis Fernando: Perfil de la Chaya. (2006)

<http://portal.camp.gov.mx/C15/C3/Diagnósticos/Document&20Library/CHAYA.pdf>.

- 7-. *Cnidoscolus chayamansa* [Internet] Consultada en Noviembre 2009 Disponible en:
<http://helviobh.googlepages.com/chayamansa>.
- 8-. Fernández C. Francisco J. (2007): *Cnidoscolorum notulae: C. aconitifolius* (Miller) I. M. Johnston subsp. *Aconitifolius*. *Editionem Adumbrationes*. 21; 1 – 46.
- 9-. Giovanna María del Rosario Palos Suárez, Minierva Ramos – Gómez, Rosalía Reynoso – Camacho, Eva González – Jasso (2006). Estudio de la administración subcrónica del té de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en la diabetes inducida químicamente en ratas. 2^{do} Congreso nacional de Química Médica. México.
- 10-. Kuti, J. O.; Torres, E. S. (1996): Potential nutritional and Elath benefits of tree spinach. In *Progress In New Crops (3rd Series)*; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Alington, VA; 516 – 520.
- 11-. Trease G.E. and Evans W.C. (1986): *Tratado de Farmacognosia Interamericano*. 12^a Ed., EMALSA S.A., Madrid., p. 205.
- 12-. E. Strasburger (1986): *Botánica*. Gustav Fischer Verlag 32^a Edición actualizada por V. Denffer. Ziegler. Eherendorfer. Bresinsky 7^{ma} española Editorial Marin, S.A. Barcelona., p. 867.
- 13-. Heywood, V. H. (1985): *Las plantas con flores*. Ed. Reverté. S.A. Barcelona. p. 181.
- 14-. Joachim Heller (1996): *Physiic nutt Jatropha curcas L* International Plant Genetics Resources Institute.
- 15-. De – Ji Pan, Chang – Oi Hu, Jer – Jan Chang (1991): Kanmiphorin – C and D Cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, 30 (3) 1018 – 1020.
- 16-. Schoeder, G., Rohmer, M., Beck, J y Anton R. (1980): 7-oxo-7-hydroxy and 7-hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*, 19, 2213 – 2215.

- 17-. Kupchan, S.M., Nelida, I., Branfman A.R., Dailey, R.G.Jr. y Fei, B. Y. (1976): Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants. *Science*, 191, 571 – 572.
- 18-. Evans, F.J. y Kinghorn D.A. (1977): A comparative phytochemical study of the diterpenes of some species of the genera *Euphorbia* and *Elaeophorbium* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 74, 93.
- 19-. Hecker, E. (1968): Carcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Research*, 28, 2338 – 2349.
- 20-. Kinghorn D.A. "Carcinogenic irritant Euphorbiaceae". In A.D. Kinghorn, (Ed.) *Toxic plants*, 137 – 139. New York. Columbia University.
- 21-. James E. Williams (2001): Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Drago. *Altern Med Rev* 6 (6): 567 – 579.
- 22-. Adbel, F. y Rizk, M. (1987): The Chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 94, 293 – 326.
- 23-. Hegnauer, B. (1989): *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Vol VIII Birkhauser Verlag Basel. Germany; p. 440.
- 24-. Perdue, G.P., Blomster, R.N., Blake, D.A and Farnsworth, N.R. (1979): South American Plants II: Taspine isolation and antiinflammatory activity *J. Pharm. Sci*, 68, 124 (1979).
- 25-. Isopertenoides Diversos. [Internet] Consultada en NOviembre 2009. Disponible en: mazinger.sisib.uchile.cl/.../evanswc01/29.html

- 26-. Itokawa, H., Ichilara, Y., Mochizuti, M., Enomeri, T., Morita, H., Shirota, O., Imamatsu, M. y Takeya K. (1991): A Cytotoxic Substance from Sangre de Drago. Chem. Pharm. Bull, 39, 1041.
- 27-. Vaisberg, A., Milla, M., Del Carmen Planas, M., Cordova, J.L., Rosas de Agusti, E., Ferreyra, R., Del Carmen Mestiga, M., Carlin, L. Y Hammond, G.B. (1989): Tapsine is the cicatrizant principie in Sangre de Drago extracted from *Croton lechleri*. Planta Med, 55, 140.
- 28-. Lewis, W.H. y Lewis, E, M.P.F. (1977): Medical Botany Plants effecting man's health. John Wiley and Sons. New York, London.
- 29-. Ivor, C. A., Keith, O. P., Manchard, P. y Lawrence A.D. W. (1991): An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. *Phytochemistry*, 30, 1801 – 1803.
- 30-. Graham, J.G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S. y Farnsworth, N. R. (2000): Review Plants used against cancer-an extensionof the work of Jonathan Hartwell. *Journal Of Ethnopharmacology*. 73: 347 – 377.
- 31-. Comunicación personal jasmine Jakupovic. Universidad Técnica de Berlín. Alemania (1993).
- 32-. Ugarte, Méndez, E. (1970): Estudio Químico Comparativo de los Compuestos presentes en *Adenopeltis colliguaya*, *Colliguaya dombeyana* y *Colligayua odorífera*, Tesis para optar al título de Licenciado en Biología, Universidad de Concepción.
- 33-. Ugarte, E., Silva, M., y Sammes, P.G. (1972): Flavonoids and Fatty Constituents of *Adenopeltis colliguaya*. *Phytochemistry*, 11 1859 – 1860.

- 34-. Kuti Joseph O. Y Konoru Hima B. (2006): Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*) J. of Food Composition and Analysis; 19: 556 – 561.
- 35-. Bittner, M., Silva, M., Aqueveque., Kufer, J., Jakupovic, J., y Murillo, R. (1997): Alkaloids and other constituents from *Croton chilensis*. Bol. Soc. Chile. *Quim.*, 42, 223 – 228.
- 36-. Jakupovic, J., Morgernstern, T., Bittner, M., y Silva, M. (1998): Diterpenes from *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry* 47 (8), 1601 – 1609.
- 37-. Información obtenida del Banco de Datos. STN. (Chemical Abstract Service). (1997).
- 38-. Información obtenida del Banco de Datos. STN. (Chemical Abstract Service). (1997).
- 39-. Jakupovic, J., Morgernstern, T., Aqueveque, P. Bittner, M., y Silva, M. (1996): Diterpenes and phloroacetofenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochemistry*, 41, 1149 – 1153.
- 40-. Muñoz, M.S., Barrera, E.M. y Meza, I.P. (1981): El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas de Chile. Publicación ocasinal 33, 3. Museo Natural de Historia Natural, Santiago de Chile.
- 41-. Masturah Markoma, Masitah Hasan, Wan Ramli Wan Daud, Harcharan Singh, Jamaliah Md. Jahim. (2006): Extraction of hydrolysable tannis from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. Separation and Purification *Technolgy*. 52. 487 – 496.

- 42-. Olapeju O. Aiyelaagbe, Kayode Adesogan, Olusegun Ekundayo, James, B. Gloer. (2007): Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica*. Hook. *Phytochemistry*. 68. 2420 – 2425.
- 43-. Seigler, D.S., Bloomfield, J.J. (1967): The Chemistry of the genus *Cnidocolus*. The fatty acid components of the seed oil. *Phytochemistry*. 6. 451.
- 44-. Seigler, D.S., Bloomfield, J.J. (1969): Constituent of genus *Cnidocolus*. *Phytochemistry*. 8. 935.
- 45-. Brum Rosenei, Honda Neli, Hess Sonia, Cavalheiro Alberto y Delle Monache Franco. (1998): Acyl lupeols from *Cnidocolus vitifolius*. *Phytochemistry*. 49 (4); 1127 – 1128.
- 46-. Almeida, C. F., Lima e Silva, T., Amorim, E., Maia, M., Albuquerque U. (2005): Life strategy and Chemicals composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments*. (62) 127 – 142.
- 47-. Awoyinka, O.A., Balogun, I.O. y Ogunnowo, A.A. (2007): Phytochemical Screening and in Vitro bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal Of Medicinal Plants Research*. 1(3); 63 – 65.
- 48-. Ivor, C. A., Keith, O. P., Manchard, P. y Lawrence A.D. W. (1991): An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. *Phytochemistry*, 30, 1801 – 1803.
- 49-. Torrico, F. M.; Gabay, J.; Suarez, A. y Compagnone, R. (2004): Estudio toxicológico de *Cnidocolus Chayamansa* Mc Vaugh. *Revista Facultad de Farmacia*. 66 (2). 58 – 66.
- 50-. Litchfield, J.; Wilcoxon, F. (1949): A simplified method of evaluating dose – effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99 – 108.

- 51-. Kuti Joseph O. Y Konoru Hima B. (2006): Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*) *J. Agric. Food Chem.*; 52: 117 – 121.
- 52-. Cao, G.; Alessio, H. M.; Culter, R. G. (1993): Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biol. Med.* 14, 303 – 311.
- 53-. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidaron substrates and antioxidante by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*; 299: 152 – 178.
- 54-. Egan, S. V., Yeoh, H. H., Bradbury, J. H. (1998): Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 76, 39 – 48.
- 55-. Alonso-Amelot, M. E., Oliveros, A. (2000): A method for practical quantification and kinetic evaluation of the cyanogenesis in plant material. Application to Pteridium quinilium and Passiflora capsularis. *Phytochemical Analysis*, 11, 309 – 316.
- 56-. a) Bradbury, J. H., Egan, S. V., Lynch, M. J. (1991): Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *Journal of Science, Food and Agriculture* 55, 277 – 290. b) Cooke, R. D. (1978). An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Science, Food and Agriculture*, 29, 345 – 352. c) Yeoh, H. H., Truong, V. D. (1993). Quantitative analysis of linamarin in cassava using a cassava b-glucosidase electrode. *Food Chemistry*, 47, 295 – 298.
- 57-. Dicurú, Marly. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara* Linn perteneciente a la familia de las Verbenaceae. *Universidad Central de Venezuela*; 2006; pág 13.

- 58-. Zaneta Nikolovska-Coleska. Identification of phenolic constituents isolated from *Macedonia propolis*. [Artículo en Internet]. Macedonia, 1994. Pág 14. Disponible en: www.mjcce.org.mk/PDF/14_1_233.pdf
- 59-. Markham, K.R. **Techniques of flavonoid identification. New Zealand. Academic Press INC; 1982; pág 39-40.**
- 60-. Zaneta Nikolovska-Coleska. Identification of phenolic constituents isolated from *Macedonia propolis*. [Artículo en Internet]. Macedonia, 1994. Consultado en Octubre 2011. Pág 17. Disponible en: www.mjcce.org.mk/PDF/14_1_233.pdf
- 61-. Xiao, J.B. **Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone.** [Artículo en Internet]. China, 2006. Consultado en Octubre 2011. Pag 312. Disponible en: <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/jophas3.10china.pdf>
- 62-. Yaque, J.G. Caracterización del flavonoide gossypitrina por métodos espectroscópicos. [Artículo en Internet]. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/vol1%20no3/caracterizacion.htm>
- 63-. Dicurú, Marly. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara Linn* perteneciente a la familia de las Verbenaceae. Universidad Central de Venezuela; 2006; pág 13.
- 64-. Markham, K.R. **Techniques of flavonoid identification. New Zealand. Academic Press INC; 1982; pág 39-40.**
- 65-. Xiao, J.B. **Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone.** [Artículo en

Internet]. China, 2006. Consultado en Octubre 2011. Pag 312. Disponible en: <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/jophas3.10china.pdf>

66- Yaque, J.G. Caracterización del flavonoide gossypitrina por métodos espectroscópicos. [Artículo en Internet]. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/vol1%20no3/caracterizacion.htm>

67- Dicurú, Marly. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara Linn* perteneciente a la familia de las Verbenaceae. Universidad Central de Venezuela; 2006; pág 13.

68- Markham, K.R. **Techniques of flavonoid identification. New Zealand. Academic Press INC; 1982; pág 39-40.**

69- Xiao, J.B. **Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone.** [Artículo en Internet]. China, 2006. Consultado en Octubre 2011. Pag 312. Disponible en: <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/jophas3.10china.pdf>

70- Yaque, J.G. Caracterización del flavonoide gossypitrina por métodos espectroscópicos. [Artículo en Internet]. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/vol1%20no3/caracterizacion.htm>

71- Dicurú, Marly. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara Linn* perteneciente a la familia de las Verbenaceae. Universidad Central de Venezuela; 2006; pág 13.

72- Markham, K.R. **Techniques of flavonoid identification. New Zealand. Academic Press INC; 1982; pág 39-40.**

- 73-.** Xiao, J.B. Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone. [Artículo en Internet]. China, 2006. Consultado en Octubre 2011. Pag 312. Disponible en: <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/jophas3.10china.pdf>
- 74-.** Yaque, J.G. Caracterización del flavonoide gossypitrina por métodos espectroscópicos. [Artículo en Internet]. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/vol1%20no3/caracterizacion.htm>
- 75-.** Dicurú, Marly. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de diclorometano-metanol (8:2) y metanólico de la planta *Lantana camara Linn* perteneciente a la familia de las Verbenaceae. Universidad Central de Venezuela; 2006; pág 13.
- 76-.** Markham, K.R. **Techniques of flavonoid identification. New Zealand. Academic Press INC; 1982; pág 39-40.**
- 77-.** Xiao, J.B. Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone. [Artículo en Internet]. China, 2006. Consultado en Octubre 2011. Pag 312. Disponible en: <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/jophas3.10china.pdf>
- 78-.** Yaque, J.G. Caracterización del flavonoide gossypitrina por métodos espectroscópicos. [Artículo en Internet]. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/vol1%20no3/caracterizacion.htm>
- 79-.** Martínez Alejandro. Flavonoides. [Artículo en Internet]. Consultado en Septiembre 2011. Disponible en: farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf
- 80-.** *Medhat Ibrahim*. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. [Artículo en Internet]. 2006. Consultado en Octubre 2011. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010046702006000300002&script=sci_arttext

