



ESTUDIO QUIMICO DE LOS EXTRACTOS SEMIPOLARES
DE FRUTOS DE K. PARVIFOLIA Y K. JOHNSTONII

POR:

QCB VERONICA MAYELA RIVAS GALINDO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA

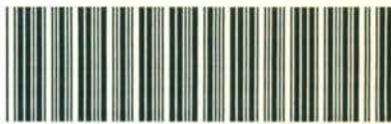
MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

TM
Z6658
FM
1995
R5

2-901.

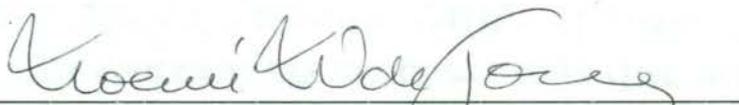
0095-67460



1020090178

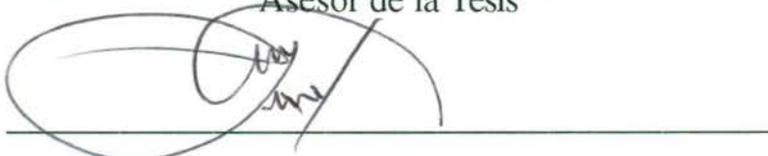
**ESTUDIO QUIMICO DE LOS EXTRACTOS
SEMIPOLARES DE FRUTOS
DE *K. parvifolia* y
*K. johnstonii***

Aprobación de la Tesis:

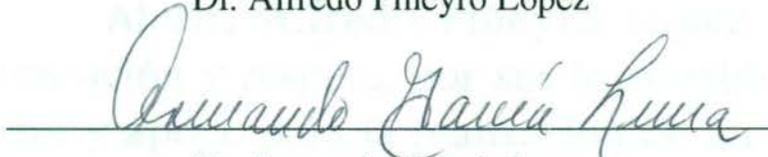


Dra. Noemí Waksman de Torres

Asesor de la Tesis



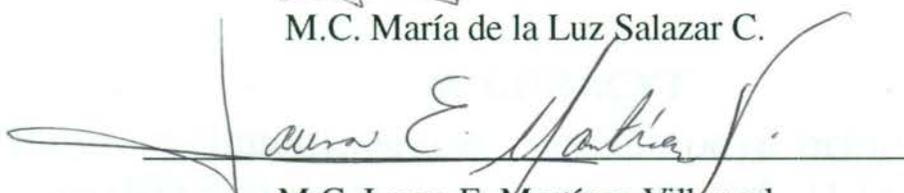
Dr. Alfredo Piñeyro López



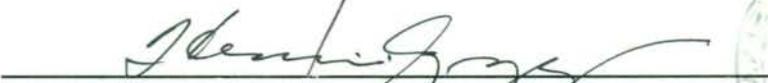
Dr. Armando García Luna



M.C. María de la Luz Salazar C.



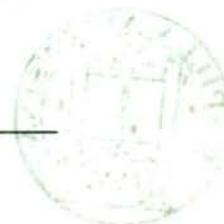
M.C. Laura E. Martínez Villarreal



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Secretario Académico del Area Básica

Subdirección de Estudios de Postgrado



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Noemí Waksman

Con profundo respeto, cariño y admiración. No encuentro las palabras adecuadas para agradecerle todo lo que me da día con día: Apoyo, Amistad, Cariño (porque yo se que me quiere), Confianza y tantas cosas más que no terminaría de escribirlas nunca. Porque gracias a usted he realizado mi tesis y he llegado hasta donde estoy.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López

Con Admiración y respeto, por sus invaluable consejos, enseñanzas y apoyo para la realización de mi tesis dentro del Depto. de Farmacología y Toxicología.

A CONACYT

Mi agradecimiento sincero por el apoyo brindado para la realización de mi tesis. Proyecto Ref. 3122-M9306.

A mis Maestros

Porque con sus enseñanzas contribuyeron grandemente en mi formación profesional.

INDICE GENERAL

	pág.
INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE CROMATOGRAMAS	II
INDICE DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS	IV
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	17
CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS	18
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	18
2.1.1 CLASIFICACION TAXONOMICA	18
2.2 MATERIAL Y EQUIPO	20
2.3 METODOS	22
2.3.1 SEPARACION DE LOS COMPUESTOS DE t_R SIMILAR A LA T 514 DEL EXTRACTO SEMIPOLAR DEL FRUTO DE <i>K.</i> <i>parvifolia.</i>	22
2.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACTIVO DEL FRUTO DE <i>K. johnstonii.</i>	24
2.3.3 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.	26
2.3.4 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA.	26
2.3.5 ENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE <i>Artemia salina.</i>	27
2.3.6 DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION DE LA CATALASA.	28
2.3.6.1 Preparación de reactivos.	28
2.3.6.2 Determinación de la actividad de la catalasa.	28
2.3.6.3 Determinación del grado de inhibición sobre la actividad de catalasa.	29
2.3.6.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media CI_{50} .	29

CAPITULO 3. RESULTADOS	30
3.1 <i>Karwinskia parvifolia</i>	30
3.1.1 COMPUESTO X.	30
3.1.1.1 Determinación de la pureza.	30
3.1.1.2 Elucidación de la estructura.	31
3.1.2 COMPUESTO Y ₁ .	31
3.1.2.1 Determinación de la pureza.	31
3.1.2.2 Elucidación de la estructura.	32
3.1.3 COMPUESTO C.	32
3.1.3.1 Determinación de la pureza.	32
3.1.3.2 Elucidación de la estructura.	32
3.1.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN EL BIOENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE <i>Artemia salina</i> .	33
3.1.5 DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION PRODUCIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.	33
3.1.5.1 Grado de inhibición producido sobre la actividad de la catalasa por efecto de los compuestos antracénicos evaluados a una concentración fija.	33
3.1.5.2 Determinación de la CI ₅₀ .	34
3.2 <i>Karwinskia johnstonii</i>	63
3.2.1 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE EL BIOENSAYO EN LARVAS DE <i>Artemia salina</i> .	63
3.2.2 ANALISIS DE LA FRACCION DE R _f INTERMEDIO.	63
3.2.3 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS (ENSAYO EN LARVAS DE <i>Artemia salina</i>).	64
CAPITULO 4. DISCUSION	68
4.1 <i>K. parvifolia</i>	68
4.1.1 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS X, Y ₁ Y C.	69
4.1.2 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO X.	70
4.1.3 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO Y ₁ .	72
4.1.4 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO C.	73
4.1.5 BIOENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE <i>Artemia salina</i> .	74

4.1.6 GRADO DE INHIBICION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LA CATALASA.	75
4.2 <i>K. johnstonii</i>	78
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	81
APENDICE	82
Espectro de RMN ¹ H de la T 514.	83
Espectro de RMN ¹³ C del Diast. T 514.	84
REFERENCIAS	85

INDICE DE CROMATOGRAMAS

	pág.
Cromatograma 1. Diast. T 514, T 514 y T 496 en el extracto semipolar de <i>K. parvifolia</i> . Recolección de 1989.	14
Cromatograma 2. Compuestos de t_R similar a la T 514 en el extracto semipolar de <i>K. parvifolia</i> . Recolección de 1991.	14
Cromatograma 3. CLAR de los compuestos X, Y ₁ y C; las condiciones son 1d.	35
Cromatograma 4. CLAR de los compuestos T 514, X, Y ₁ y C; las condiciones son 2d.	36
Cromatograma 5. CLAR del componente O; las condiciones son 1d.	67
Cromatograma 6. CLAR del componente P; las condiciones son 1d.	67

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1. Toxinas aisladas del fruto de <i>K. humboldtiana</i> por Dreyer en 1975.	2
Fig. 2. Curvas de distribución de la mortalidad en células de hígado de origen normal y neoplásico expuestas a T 514.	4
Fig. 3. Distribución geográfica de las especies del género <i>Karwinskia</i> en México.	5
Fig. 4. Diast. T 514, T 510 e Iso T 514 aislados de <i>K. parvifolia</i> , <i>K. tehuacana</i> y <i>K. umbellata</i> .	8
Fig. 5. Flegmacinas y anhidroflegmacinas aisladas de <i>Cassia torosa</i> .	9
Fig. 6. Torosacrisona y germicrisona aisladas de <i>Cassia singueana</i> .	9
Fig. 7. Antracenas diméricas aisladas de <i>Cassia occidentalis</i> .	11
Fig. 8. Torosalol 1 y 2 aislados de <i>Cassia torosa</i> .	11
Fig. 9. Espectro UV-Visible del compuesto X en Etanol.	37
Fig. 10. Espectro de Masas del compuesto X por Ionización Electrónica.	38
Fig. 11. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto X.	39

Fig. 12. Espectro DEPT del compuesto X.	40
Fig. 13. Espectro de RMN ¹ H del compuesto X.	41
Fig. 14. Ampliación de la zona de aromáticos del espectro de RMN ¹ H del compuesto X.	42
Fig. 15. Ampliación de la zona de alifáticos del espectro de RMN ¹ H del compuesto X.	43
Fig. 16. Espectro HETCOR del compuesto X.	44
Fig. 17. Ampliación de la zona de aromáticos del espectro HETCOR del compuesto X.	45
Fig. 18. Ampliación de la zona de alifáticos del espectro HETCOR del compuesto X.	46
Fig. 19. Estructura y nombre químico del compuesto X.	47
Fig. 20. Espectro UV-Visible del compuesto Y ₁ en Metanol.	48
Fig. 21. Espectro de Masas del compuesto Y ₁ por Ionización FAB.	49
Fig. 22. Espectro de RMN ¹ H del compuesto Y ₁ .	50
Fig. 23. Espectro HMQC del compuesto Y ₁ . Ampliación de la zona de aromáticos.	51
Fig. 24. Estructura y nombre químico del compuesto Y ₁ .	52
Fig. 25. Espectro UV-Visible del compuesto C en Metanol.	53
Fig. 26. Espectro de Masas del compuesto C por Ionización FAB.	54
Fig. 27. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto C.	55

Fig. 28. Espectro DEPT del compuesto C.	56
Fig. 29. Espectro de RMN ¹ H del compuesto C.	57
Fig. 30. Espectro HETCOR del compuesto C.	58
Fig. 31. Estructura y nombre químico del compuesto C.	59
Fig. 32. Curva de inhibición del compuesto X sobre la catalasa.	60
Fig. 33. Curva de inhibición del compuesto Y ₁ sobre la catalasa.	61
Fig. 34. Curva de inhibición del compuesto C sobre la catalasa.	62
Fig. 35. Espectro UV-Visible del componente O en Metanol.	65
Fig. 36. Espectro UV-Visible del componente P en Etanol.	66

ABREVIATURAS

aprox.	aproximadamente
C	Carbono
cm	centímetro
Cols.	Colaboradores
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CL ₅₀	Concentración Letal Media
J	Constante de acoplamiento
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
Diast.	Diasteroisómero
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	Distorsionless Enhancement Polarization Transfer
DL ₅₀	Dosis Letal Media
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
EM	Espectro de Masas
FAB	Fast Atom Bombardment
Fig.	Figura
F	Fracción
°C	grados Centígrados
g	gramo
Hz	Hertz
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
H	Hidrógeno
IPN	Instituto Politécnico Nacional
Iso	Isómero
kg	Kilogramo

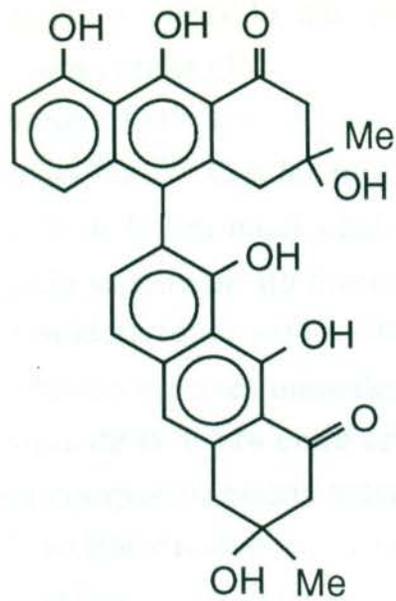
L	Litro
Log	Logaritmo base diez
MHz	Megahertz
m	Metro
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minuto
M	Molar
nm	nanómetro
OH	Oxhidrilo
O	Oxígeno
ppm	partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
Ppt.	Precipitado
Rf	Razón de la velocidad de flujo de la muestra con respecto al eluente
m/e	Relación masa - carga
v/v	Relación volúmen sobre volúmen
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ^{1H}	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ^{13C}	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono trece
Sob.	Sobrenadante
t _R	Tiempo de retención
T	Toxina
UV-Visible	Ultravioleta Visible
U/mL	Unidades por mililitro
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

CAPITULO 1

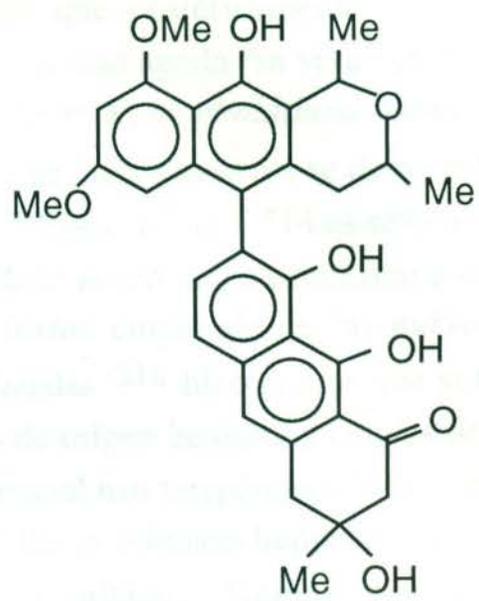
INTRODUCCION

El género *Karwinskia* es un taxón constituido básicamente de arbustos y pequeños árboles, los cuales crecen tanto en áreas desérticas como en áreas tropicales. Incluye 15 especies encontradas desde Texas hasta Colombia^(1, 2 y 3). De acuerdo con las investigaciones realizadas en el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina podemos decir que este género se caracteriza por la toxicidad de sus frutos y contenido de antracenonas diméricas biológicamente activas por lo que ha sido objeto de estudios tanto químicos como toxicológicos^(4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16). Existen abundantes datos en la literatura sobre el efecto tóxico de una de las especies del género: la *K. humboldtiana*^(6, 7, 8, 12, 16, 17). Desde el siglo XVIII se conoce que el agente tóxico se encuentra en la semilla y posteriormente se supuso que era de naturaleza química hidrosoluble⁽¹⁴⁾. Escobar y Nieto observaron y describieron una polineuropatía desmielinizante segmentaria desarrollada experimentalmente en gatos y ratas blancas⁽⁴⁾. La ingestión del fruto provoca una polineuropatía ascendente, simétrica y progresiva en el humano⁽¹⁰⁾. Del fruto de esta planta fueron aisladas por Dreyer y cols. por primera vez en 1975 cuatro toxinas a las que denominaron por su peso molecular como T 514, T 544, T 516 y T 496 (fig. 1)⁽¹²⁾. Se aislaron también del fruto crisofanol y β -amirina⁽¹³⁾, además de la flavona baicaleína y el flavonol quercetina que se aislaron de la raíz⁽⁷⁾.

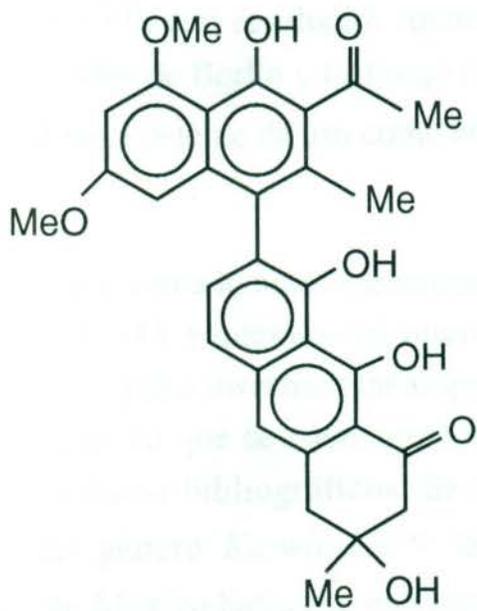
Dada la falta de información toxicológica acerca de las toxinas antes mencionadas, se comenzó en nuestro departamento en el año de 1981 un proyecto cuyo primer paso fue la obtención de los mismos. Se introdujeron sucesivas modificaciones a la técnica de obtención original de Dreyer⁽¹⁸⁾ para contar con las



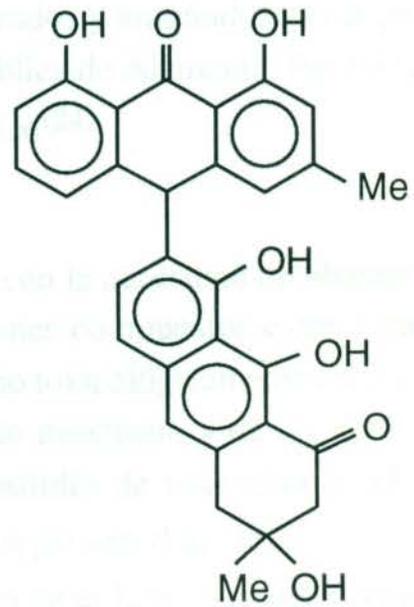
T 514



T 544



T 516



T 496

Fig. 1 Toxinas aisladas del fruto de *K. humboldtiana* por Dreyer en 1975⁽¹²⁾.

sustancias aisladas y puras lo que permitió que posteriormente en el mismo departamento fueran realizados ensayos de toxicidad aguda "in vivo" en diferentes especies de animales tanto con el fruto molido de *K. humboldtiana*, como con las toxinas purificadas^(19 y 20). Con los resultados de dichos ensayos se demostró que la toxina responsable de la neurotoxicidad es la T 544 y que la T 514 es selectivamente tóxica para hígado y pulmón, sin presentar daño neurológico periférico a las dosis ensayadas. Tal selectividad, junto con la forma empinada de las curvas dosis respuesta en todas las especies animales utilizadas⁽²¹⁾, hizo pensar que si hubiera toxicidad selectiva de la T 514 entre células de origen benigno y células de origen neoplásico, este compuesto podría tener potencial uso terapéutico. Para comprobar esto, se estudió la citotoxicidad in vitro en 11 líneas celulares humanas: 3 benignas y 8 de origen neoplásico. Se compararon los resultados obtenidos con 5 agentes antineoplásicos conocidos. Se logró confirmar la toxicidad selectiva de la T 514 la cual resultó ser más tóxica para las células neoplásicas que para las células benignas (fig. 2), además mostró mayor selectividad que los medicamentos antineoplásicos de referencia^(22 y 23). Los resultados fueron corroborados y ampliados por expertos de las universidades de Berlín y Friburgo en la República de Alemania. Por tal razón se ha solicitado una patente de uso como antineoplásico⁽²⁴⁾.

En referencia a lo antes mencionado, junto con la necesidad de obtener mayor cantidad de T 514 y además del interés en obtener compuestos estructuralmente similares, se propuso investigar tanto química como toxicológicamente otras especies del mismo género que se encuentran en territorio mexicano y de las cuales no se encontraron datos bibliográficos. Se hizo un estudio de toxicidad aguda con 9 especies del género *Karwinskia*⁽⁴⁾, las cuales representaban todas las especies conocidas en México hasta ese momento (fig. 3) y se utilizaron ratones cepa CD1 a los que se les administró fruto molido por vía oral y a diferentes dosis. Con ello se logró observar que las especies que resultaron más tóxicas fueron *K. humboldtiana*, *K. umbellata* y *K. parvifolia* (Tabla 1). También se hizo un análisis químico de los extractos clorofórmicos de frutos de las mismas especies, por medio de cromatografía en capa fina⁽⁴⁾. Las toxinas se cuantificaron espectrofotométricamente

El área bajo la curva representa siempre el 100 % de la población celular.

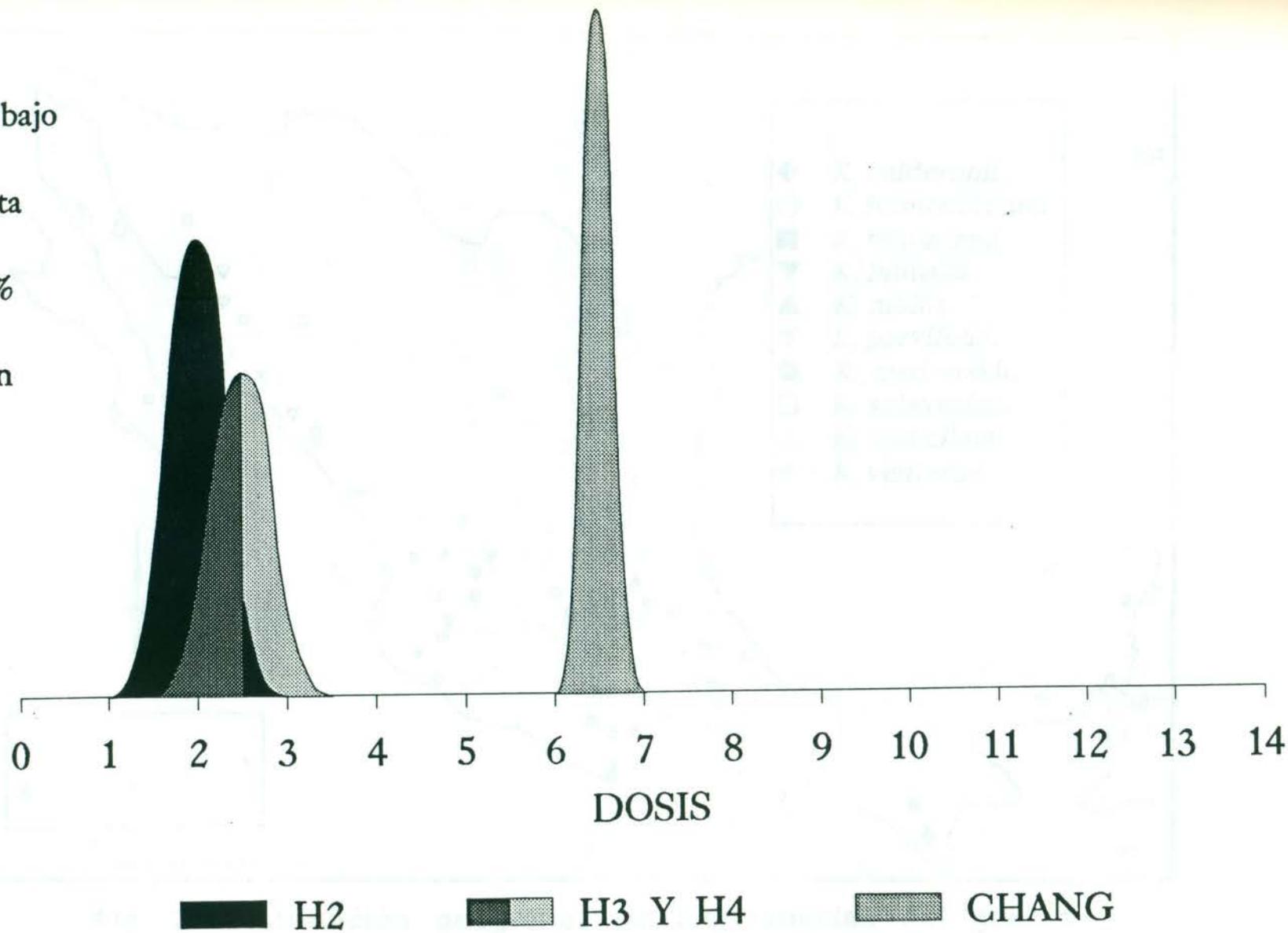


Fig. 2. Curvas de distribución de la mortalidad en células de hígado de origen normal y neoplásico expuestas a T 514. Piñeyro López, Tesis Doctoral, 1990⁽²²⁾.

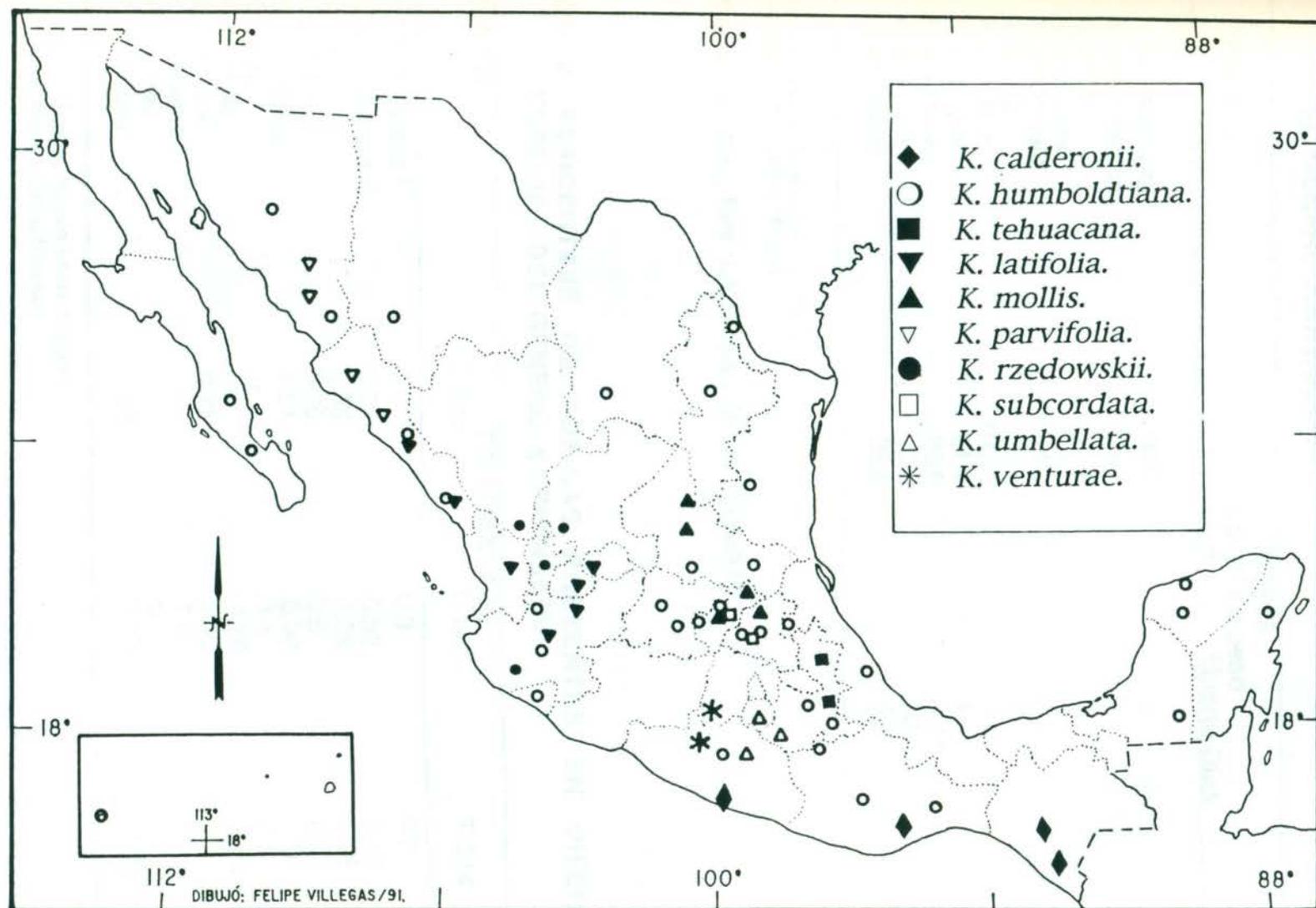


Fig. 3. Distribución geográfica de las especies del género *Karwinskia* en México. Fernández Nava, 1992^(2 y 3).

Tabla 1. LETALIDAD EN RATONES CEPA CD1 CON DIFERENTES ESPECIES DEL GENERO *KARWINSKIA*.

ESPECIES	DOSIS 2.5 gr/ Kg peso	
	% Letalidad	Muerte-Días
<i>K. humboldtiana</i> ¹	100.0	2
<i>K. humboldtiana</i> ²	85.7	2-6
<i>K. mollis</i>	71.4	2-5
<i>K. umbellata</i>	85.7	2-6
<i>K. subcordata</i>	14.3	2-4
<i>K. latifolia</i>	0	30
<i>K. parvifolia</i>	100.0	2-6
<i>K. calderonii</i>	21.4	4-11
<i>K. rzedowskii</i>	28.5	8-14
<i>K. venturae</i>	0	30
<i>K. tehuacana</i>	28.5	8-2

1. Villa de García, Nuevo León, México

2. Linares, Nuevo León, México

Waksman y cols., Rev. Latinoam. Quím., (1989)⁽⁴⁾.

Tabla 2. PORCENTAJE DE TOXINAS PRESENTES EN DIFERENTES ESPECIES DEL GENERO *KARWINSKIA*.

ESPECIE	PORCENTAJE		
	T 544	T 496	T 514
<i>K. humboldtiana</i> ¹	1.6	0.8	0.7
<i>K. humboldtiana</i> ²	0.7	0.58	0.36
<i>K. mollis</i>	1.33	1.08	0.95
<i>K. umbellata</i>	0.75	0.5	0.05
<i>K. subcordata</i>	1.51	0.98	1.07
<i>K. latifolia</i>	-	1.1	0.5
<i>K. parvifolia</i>	-	1.58	2.04
<i>K. calderonii</i>	0.75	2.00	0.7
<i>K. rzedowskii</i>	-	1.6	-
<i>K. venturae</i>	-	0.11	-
<i>K. tehuacana</i>	0.83	0.40	0.33

1. Villa de García, Nuevo León, México

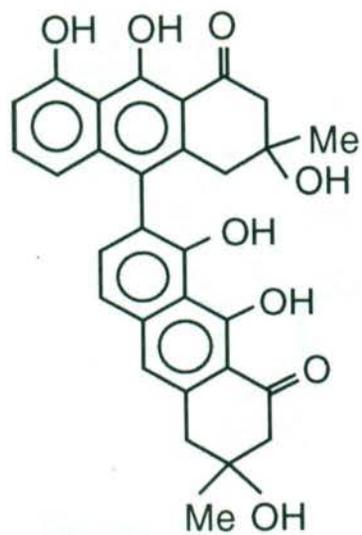
2. Linares, Nuevo León, México

Waksman y cols., Rev. Latinoam. Quím., (1989)⁽⁴⁾.

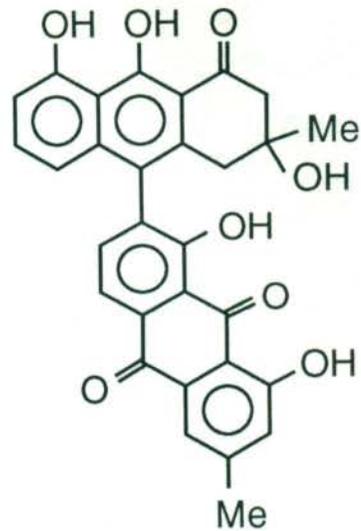
por reflectancia, ya que estos compuestos presentan fuerte absorción en la región visible (Tabla 2). Las especies que resultaron con mayor cantidad de T 514 fueron la *K. subcordata* y la *K. parvifolia*. Esto originó que se evaluara a la segunda como posible fuente de obtención de T 514 y hasta la fecha, ha resultado la mejor opción para este propósito, debido a que contiene menor cantidad de contaminantes y el porcentaje de T 514 presenta poca variación con la época y el lugar de recolección⁽²⁵⁾.

Al realizar estudios químicos más exhaustivos a los extractos semipolares de los frutos de *K. parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. umbellata*, se aislaron y caracterizaron otros tres compuestos de tipo antracenónico no descritos anteriormente en la literatura^(26 y 27) y se denominaron como diastereoisómero de la T 514 (Diast. T 514), T 510 e isómero de la T 514 (iso T 514) respectivamente (fig. 4). La T 514 y el diast. de la T 514 difieren en la posición espacial de los metilos 3 y/o 3', la T 510 tiene un monómero de tipo antraquinónico y otro monómero de tipo antracenónico y el iso T 514 tiene unidos los monómeros en la posición 7,7' a diferencia de la T 514 donde la unión es 7, 10'.

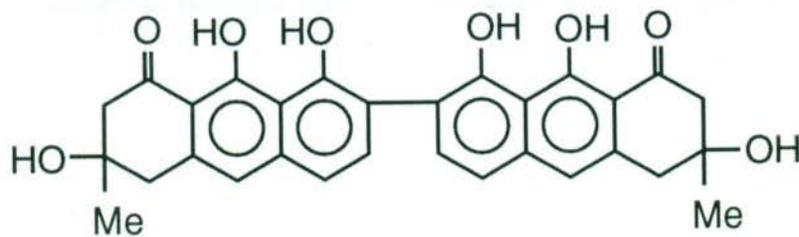
En la literatura se reporta la existencia de otros compuestos de tipo antracenónico aislados de diferentes especies de plantas del género *Cassia*; por ejemplo de la *Cassia torosa* se aislaron las flegmacinas A2 y B2 y las anhidroflegmacinas A2 y B2 9-10 quinonas⁽²⁸⁾. Las primeras son estructuralmente parecidas a la T 514 excepto en los grupos metoxilo en las posiciones 6 y 6' y las anhidroflegmacinas al igual que la T 510 tienen un monómero antraquinónico (fig. 5). Las flegmacinas fueron patentadas como posibles agentes antineoplásicos⁽²⁹⁾. De la *Cassia singueana* se aislaron la torosacrisona que presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y la Germicrisona que presenta actividad antimicrobiana contra *Corynebacterium equi*⁽³⁰⁾. Estos dos compuestos son antracenas monoméricas (fig. 6). De la *Cassia occidentalis* se aislaron el Singueanol-1, el Occidentalol-1 y el Occidentalol-II (fig. 7); el Singueanol-1 resultó



Diast T 514

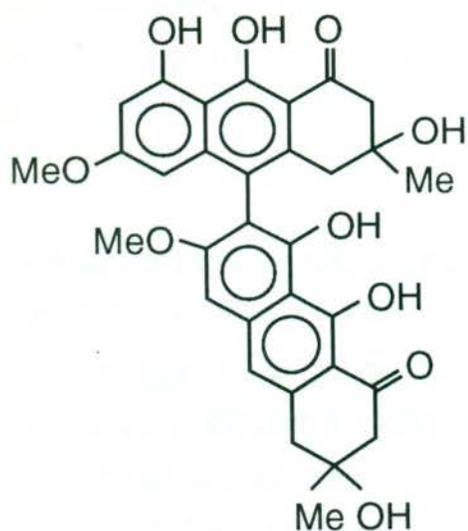


T 510

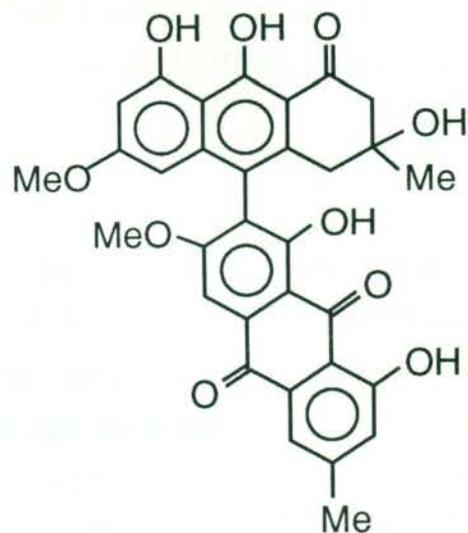


Iso T 514

Fig. 4. Diast T 514, T 510 e Iso T 514 aislados de *K. parvifolia*, *K. tehucana* y *K. umbellata* por Waksman y cols. en 1990 y 1992^(26 y 27).

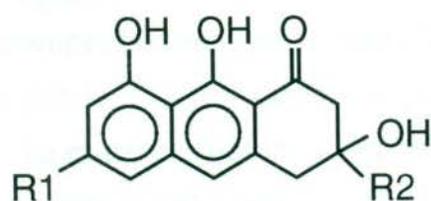


Flegmacinas A2 y B2



Anhidroflegmacinas A2 y B2
9 - 10 Quinonas

Fig. 5. Flegmacinas y anhidroflegmacinas aisladas de *Cassia torosa* por Takahashi y cols. en 1977⁽²⁸⁾.



Torosacrisona :
R1= MeO, R2= Me

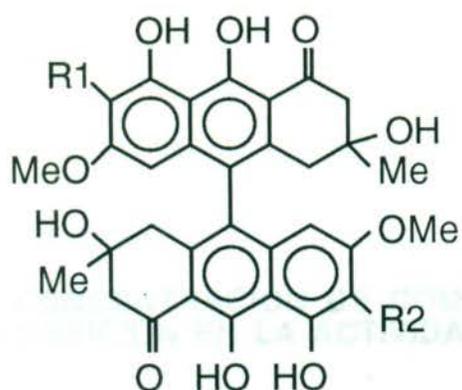
Germicrisona:
R1= Me, R2= H

Fig. 6. Torosacrisona y germicrisona aisladas de *Cassia singueana* por Endo y Naoki en 1980⁽³⁰⁾.

tener actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y mostró también actividad antiespasmódica⁽³¹⁾. De la *Cassia torosa* también se aislaron el Torosalol-I y el Torosalol-II (fig. 8), los cuales mostraron actividad citotóxica contra células neoplásicas⁽³²⁾.

Dentro de los intentos hechos para dilucidar el mecanismo de acción de la T 514 se puede mencionar el efecto sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática⁽³³⁾. Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción, ciertas observaciones experimentales permiten señalar que no actúa sobre el núcleo celular como la mayoría de los antineoplásicos de referencia. Se demostró también que dicho compuesto produce daño selectivo e irreversible a los peroxisomas, lo cual fue comprobado mediante estudios con levaduras⁽³⁴⁾. Por este motivo a la T 514 se le ha denominado peroxisomicina.

Dentro de esta misma línea se decidió investigar el efecto "in vitro" de la peroxisomicina y otros compuestos afines sobre la actividad de enzimas de origen peroxisomal. Para ello se utilizó, entre otras, la enzima catalasa, la cual, fuera de la existente en los glóbulos rojos, es exclusiva del peroxisoma y juega un papel muy importante en los organismos vivos, ya que cataliza la destrucción del exceso de peróxido de hidrógeno, el cual es altamente tóxico para la célula en estas condiciones. Se comprobó así que la actividad de dicha enzima es inhibida no competitivamente por la T 514 y otros compuestos antraquinónicos, encontrándose una relación estrecha entre estructura y porcentaje de inhibición⁽³⁵⁾. Es decir, entre más parecidos sean estructuralmente a la T 514, mayor inhibición presentan. Así la T 510 que tiene en su estructura un monómero antraquinónico, mostró una inhibición significativamente menor que la T 514. Se utilizaron también para este estudio emodina y crisofanol, los cuales son compuestos antraquinónicos y no inhibieron la actividad de la enzima catalasa. El aminotriazol se utilizó como referencia debido a que se conoce el efecto inhibitorio que presenta sobre la actividad de la enzima, sin embargo, la inhibición producida por éste requirió una concentración aproximadamente tres mil veces mayor (Tabla 3).

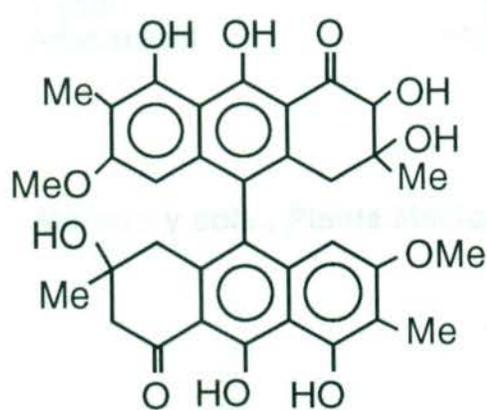


Singueanol 1: R1=R2=Me

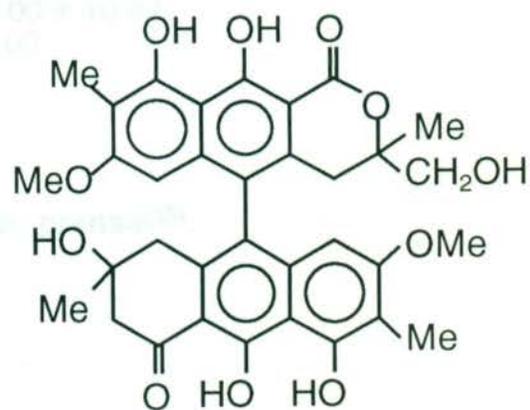
Occidentalol 1: R1=Me, R2=H

Occidentalol 2: R1=R2=H

Fig. 7. Antracenas diméricas aisladas de *Cassia occidentalis* por Kitanaka y Takido en 1989⁽³¹⁾.



Torosalol 1



Torosalol 2

Fig. 8. Torosalol 1 y 2 aislados de *Cassia torosa* por Kitanaka y Takido en 1990⁽³²⁾.

Tabla 3. CONCENTRACION DE COMPUESTOS QUE PRODUCEN EL 50% DE INHIBICION EN LA ACTIVIDAD DE CATALASA

COMPUESTO	CONCENTRACION (μM)
T 514	3.34 ± 0.99
Diast. T 514	3.64 ± 1.10
Flegmacina 1	6.33 ± 2.79
Flegmacina 2	8.54 ± 3.23
T 544	40.08 ± 1.57
T 496	99.50 ± 19.03
T 510	120.00 ± 10.44
Aminotriazol	10000.00

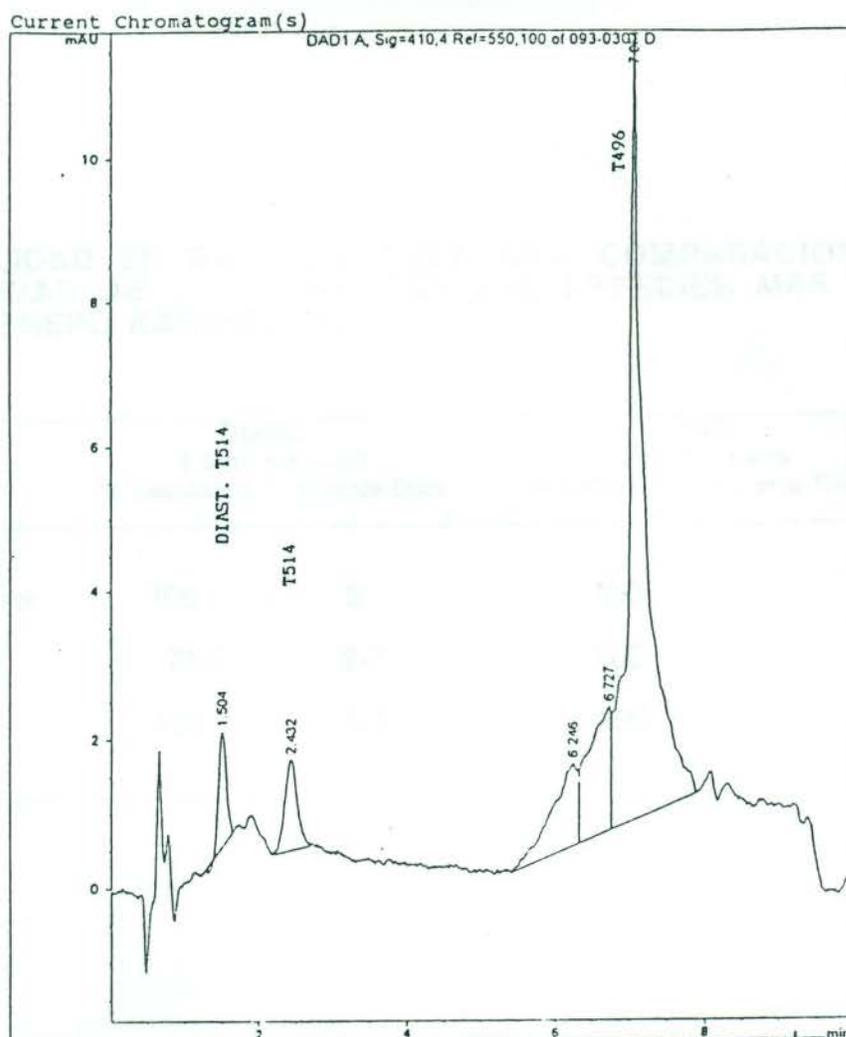
Moreno y cols., Planta Médica, en prensa⁽³⁵⁾.

Con el fin de aumentar el conocimiento sobre la actividad de este tipo de compuestos y conocer más sobre el potencial de las plantas mexicanas, escogimos para el presente trabajo dos de las especies del género *Karwinskia* que nos parecieron de mayor interés: *Karwinskia parvifolia* y *Karwinskia johnstonii*.

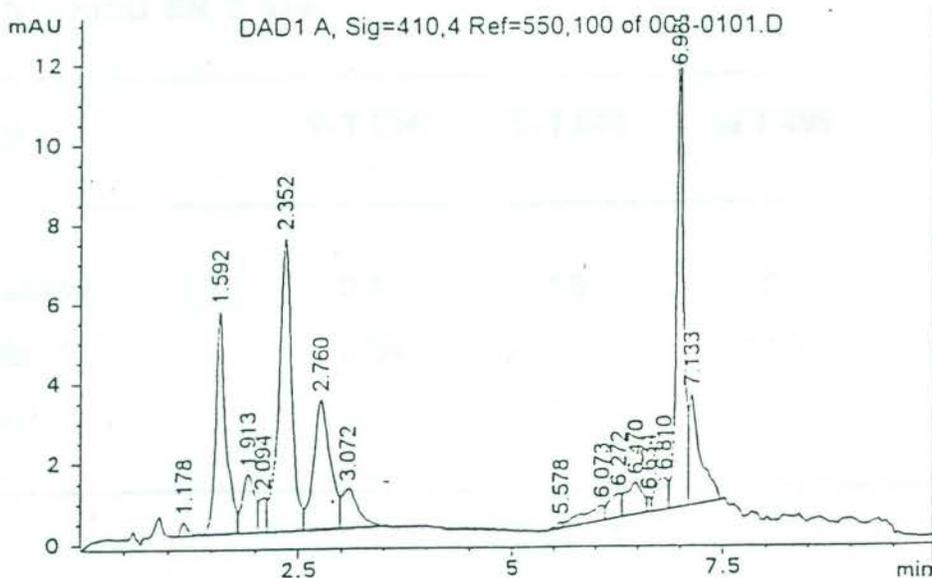
Hace algunos años se identificaron en el extracto semipolar de la *K. parvifolia* por medio de CLAR, tres compuestos principales: Diast. T 514, T 514 y T 496 (Cromatograma 1); sin embargo en colectas posteriores se observó que además de los tres compuestos anteriormente dichos, estaban presentes otros compuestos de tiempo de retención semejante al de la T 514 (Cromatograma 2), específicamente los compuestos con tiempos de retención de 2.7 y 3.1.

Consideramos de interés conocer la estructura de esos compuestos que antes no se habían detectado y que podrían resultar ser de importancia farmacológica y toxicológica. Además el conocer su estructura y propiedades fisicoquímicas podría ayudar a la purificación de la T 514 ya que tienen tiempos de retención muy similares a la misma, tanto en fase reversa como en sílica, y habitualmente dificultan el proceso de obtención.

La otra de las plantas que nos pareció interesante estudiar fue la *K. johnstonii*, ya que no había sido estudiada fitoquímicamente. En 1990 cuando se hizo una primer colecta de la planta se hicieron ensayos preliminares en las mismas condiciones que anteriormente se habían hecho para las otras plantas y presentó una toxicidad elevada en estudios in vivo con ratones cepa CD1 (Tabla 4), y al determinar el contenido de toxinas presentes en el fruto no se detectó T 514 (con el método entonces utilizado), solo se cuantificó T 496 y T 544 (Tabla 5). Posteriormente al extracto clorofórmico del fruto de esta planta se realizó el ensayo de letalidad en larvas de camarón (*Artemia salina*) y resultó tener actividad biológica, este bioensayo es utilizado para la detección de productos naturales bioactivos y fue desarrollado por Jerry Mc. Laughlin^(36 y 37). Los resultados encontrados en el mismo, concuerdan con la toxicidad elevada observada en los ensayos in vivo con ratones.



Cromatograma 1. Diast. T 514, T 514 y T 496 en el extracto semipolar de *K. parvifolia*. Recolección de 1989.



Cromatograma 2. Compuestos de t_R similar a la T 514 en el extracto semipolar de *K. parvifolia*. Recolección de 1991.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar y purificar los compuestos de tipo antracénico y caracterizarlos en el fruto de *K. parvifolia*.
- 2) Aislar y purificar los compuestos de tipo antracénico y caracterizarlos en el fruto de *K. johnstonii*.

OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar y caracterizar compuestos de tipo antracénico del fruto de *K. parvifolia* y analizar las fracciones biológicamente activas de *K. johnstonii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar y purificar los compuestos de tiempo de retención similar a la T 514 (t_R de 2.7 y 3.1 min.), del fruto de *K. parvifolia*.
- 2) Determinar su pureza química.
- 3) Determinar sus constantes físicas y realizar análisis espectroscópicos para la elucidación de las estructuras de dichos productos.
- 4) Valorar la actividad biológica de los productos aislados mediante el bioensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina*, según el método descrito por Jerry L. Mc. Laughlin.
- 5) Determinar el grado de inhibición en la catalasa.
- 6) Fraccionar el extracto activo del fruto de *K. johnstonii*.
- 7) Valorar la actividad biológica de las fracciones obtenidas mediante el bioensayo en larvas de *Artemia salina*.
- 8) Separar y analizar los compuestos que pudieran aparecer en dichas fracciones.
- 9) Valorar la actividad biológica (bioensayo en larvas de *Artemia salina*) de cada uno de los productos obtenidos.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con el fruto de *K. parvifolia* recolectada en el municipio de Choix en Sinaloa en Octubre de 1991. Esta planta fue identificada y clasificada por primera vez por el Biól. Rafael Fernández Nava del I.P.N. y el lote con el que se trabajó fue recolectado por el Ing. Rubén Luján Rangel. Hay un ejemplar depositado en los herbarios E.N.C.B. y MEXU.

El fruto de *K. johnstonii* fue recolectado en Octubre de 1990 en una zona perteneciente a la depresión del río Balsas, localizada entre los municipios de Arteaga y Huetamo en Michoacán. Esta planta también fue recolectada y clasificada por el Biól. Rafael Fernández Nava y también existe un ejemplar depositado en los mismos herbarios.

2.1.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

K. parvifolia (38)

Familia: Rhamnaceas

Nombre común: Cacachila

Distribución geográfica: Sinaloa y Sonora

Usos: A este taxón no se le conoce uso alguno. En el Noroeste de México se le teme mucho, ya que se ha visto que animales, principalmente ganado caprino, que

consumen frutos de esta planta perecen, generalmente por asfixia, a los pocos minutos de haberlos ingerido.

Descripción botánica: Arbusto de 2-3 m de alto, ramas glabras. Hojas opuestas o subopuestas, láminas oblongo-lanceoladas, de 1.4-2 cm de largo, 1-1.2 cm de ancho, haz y envés glabros; margen crenado, con pequeñas manchas negras, ápice obtuso, base obtusa o redondeada; pecíolos delgados de 3-5 mm de largo, glabros; estípulas deltoides de aproximadamente 1 mm de largo, glabras, persistentes. Inflorescencias dispuestas en cimas axilares de 3 a 4 flores, pedúnculo floral ausente o de estar presente hasta de 2 mm de largo, con pequeñas motas negras sobre la superficie, glabro; pedicelos en la fructificación de 4-5 mm de largo; copa floral infundibuliforme, de 2 mm de largo, glabra; sépalos deltoides, de 0.5-1 mm de largo, carinados; glabros; pétalos blancos, unguiculados y cimbiformes, ligeramente más cortos que los estambres, persistentes, disco delgado, verde a café-oscuro, estigma 2-lobado, persistente en los frutos maduros. Frutos axilares, frecuentemente solitarios, verdes en la juventud, café-claros en la madurez, de 4.5-5 mm de largo; semilla 1 por lóculo.

K. johnstonii (1)

Familia: Rhamnaceas

Nombre común: Cerezo, guanito, huanito.

Distribución geográfica: Michoacán y Guerrero

Usos: Medicinal, en la zona del Infiernillo, Michoacán, se prepara un té a partir de hojas, que es ingerido para bajar las fiebres provocadas por la enfermedad conocida como dengue.

Descripción botánica: Arbusto o árbol de 2-6 m de alto, ramas glabras. Hojas opuestas, láminas ovado-elípticas a ovado-lanceoladas, de 2.5-6 cm de largo, 1-3 cm de ancho, haz glabro, verde oliva, envés ligeramente más pálido, glabro con 10 a 12 pares de nervaduras secundarias, margen entero, ápice agudo a redondeado, base cordada, pecíolos de 1-2 mm de largo, glabro; estípulas deltoides de

aproximadamente 0.5 mm de largo, café claras, glabras, persistentes. Inflorescencias dispuestas en cimas axilares de 2 a 4 flores, pedúnculo floral de 1-2 mm de largo, glabro; copa floral campanulada, glabra, sépalos deltoides, de más o menos 1 mm de largo, glabros; pétalos blancos, del mismo tamaño o ligeramente más cortos que los estambres, persistentes; anteras dorsifijas, bitecas, disco no muy evidente, verde amarillento, estilo dividido en 2 lóbulos pequeños. Fruto drupáceo, verde, subesférico, de 7-10 mm de largo, indehiscente; 1 semilla por lóculo, blanca con pequeñas motas negras sobre la superficie.

2.2 MATERIAL Y EQUIPO

Los solventes utilizados para las extracciones, CCF, CC Gravitacional y de baja presión fueron de grado analítico. Las extracciones y cromatografías fueron desarrolladas a temperatura ambiente.

Evaporaciones: Rotavapor Büchi a temperatura inferior a los 40° C y protegido de la luz.

CCF de sílica: Cromatofolios AL de Sílica gel 60 F₂₅₄, espesor de capa de 0.2 mm, Merck.

Eluentes:

1a. Benceno-Acetona 1:1

2a. Benceno-Acetona 3:1

CCF de Fase Reversa: Cromatoplasmas TLC, Sílica gel RP-18 F₂₅₄ Merck. Eluente: Metanol-Agua 7:3.

CC Flash: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, Merck.

Eluentes:

1b. Benceno-Acetona 8:1, 5:1, 3:1 y 1:1 (todos con 0.1% de Ac. Acético).

2b. Benceno-Acetona 8:1, 4:1 y 1:1 (todos con 0.1% de Ac. Acético).

CC Gravitacional: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, Merck.

Eluentes:

1c. Benceno-Acetona 10:1, 8:1, 5:1, 3:1 y 1:1 (todos con 0.05 % de Ac. Acético).

2c. Benceno- Acetona 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 y 5:1 (todos con 0.1 % de Ac. Acético).

3c. Benceno- Acetona 100:1, 80:1, 60:1, 40:1, 30:1, 20:1 y 10:1 (todos con 0.1% de Ac. Acético).

4c. Benceno-Acetona 50:1, 40:1, 30:1, 20:1 y 10:1 (todos con 0.1 % de Ac. Acético).

CC de baja presión: Columna Lobar Lichroprep RP-18 (0.040-0.063 mm), Merck. Eluente: Metanol-Agua 7:3, 8:2, 9:1 (todos con 0.1% de Ac. Acético) y Metanol,

CLAR: Cromatógrafo HP 1090 con detector de arreglo de diodos.

Condiciones: Eluente A: Metanol.

Eluente B: Agua , Acetonitrilo y Acido Acético (70: 30: 1.6).

Flujo: 0.4 mL/min.

Temperatura: 21°C.

1d. Columna C₁₈, 65% de eluente A con 35% de eluente B hasta el minuto cuatro y se aumentó en forma gradual el porcentaje de A hasta llegar al 100% en el minuto seis.

2d. Columna C₈, 50% de eluente A con 50% de eluente B hasta el minuto cuatro y se aumentó en forma gradual el porcentaje de A hasta llegar al 100% en el minuto seis.

Punto de Fusión: Aparato electrothermal.

Espectro Ultravioleta-Visible: Espectrómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.

Espectro de Masas: Espectrómetro HP 5985.

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear: Espectrómetros Bruker y Varian de 400 MHz.

Bioensayo de Letalidad en Larvas de *Artemia salina*:

1. *Artemia salina* (huevecillos de larvas de camarón).

2. Sal de Mar "Instant Ocean".

3. Recipiente pequeño rectangular de plexiglas con medidas interiores de 13.5 cm de largo, 7.8 de ancho y 3.7 cm de altura, dividido a la mitad con una barrita de plexiglas de 7.8 cm de largo, 2 cm de altura y 0.5 cm de espesor

ubicada en el borde superior de la caja, de tal manera que exista solución de continuidad de 2 cm en el fondo del recipiente. Este recipiente dividido en dos mitades de la manera antes dicha, tiene un lado cubierto y protegido de la luz en el que se siembran los huevecillos de *Artemia salina*.

4. Lámpara de luz blanca.
5. Pipetas lineales de 5 y 10 mL y Pipetas automáticas de 500, 50 y 5 μ L.
6. Vasos de precipitado de 10 mL (9 por muestra).

Determinación del Grado de Inhibición de la Enzima Catalasa:

1. Catalasa de hígado bovino Sigma (E.C.1.11.1.6.).
2. Peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) Sigma.
3. Solución amortiguadora de Fosfato de potasio (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) 50 mM, pH=7.4.
4. Etanol Merck grado analítico.
5. Cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor, 1 mL de capacidad.
6. Espectrómetro UV-Visible Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.

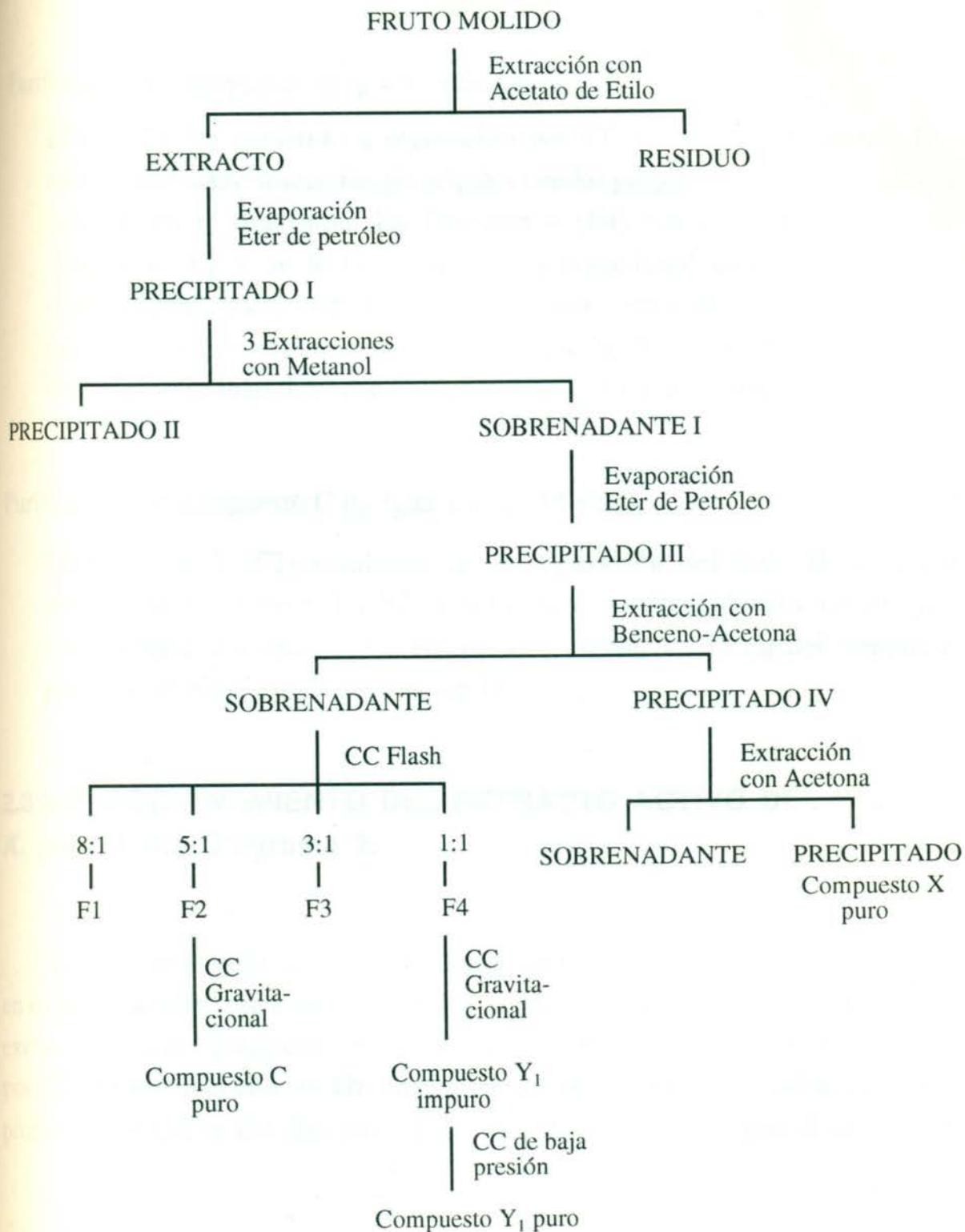
2.3 METODOS

2.3.1 SEPARACION DE LOS COMPUESTOS DE t_R SIMILAR A LA T 514 DEL EXTRACTO SEMIPOLAR DEL FRUTO DE *K. parvifolia*. Diagrama 1.

El fruto molido de *K. parvifolia* (1 kg) se extrajo 3 veces con 2 L de Acetato de Etilo cada una. El extracto se evaporó y precipitó con Eter de Petróleo (Ppt. I). El Ppt. I se le hizo una extracción rápida con Metanol y el sobrenadante resultante (Sob. I) contenía principalmente T 514, Diast T 514 y los compuestos de t_R similar a la T 514. En el precipitado (Ppt. II) quedó la mayor parte de la T 496. El Sob. I se evaporó y precipitó con Eter de Petróleo (Ppt. III). El Ppt. III (6.7 g aprox.) se extrajo con Benceno-Acetona 10:1 y se obtuvo un precipitado (Ppt. IV) y un sobrenadante (Sob. II).

DIAGRAMA 1

Karwinskia parvifolia



Purificación del compuesto de $t_R = 2.8$ (Compuesto **X**).

El Ppt. IV (600 mg aprox.) fue lavado cuatro veces con Acetona (5 mL en cada lavado) para eliminar la T 514 remanente ya que ésta es soluble en Acetona y el compuesto **X** no lo es. Se obtuvieron 300 mg del compuesto **X** puro.

Purificación del compuesto de $t_R = 3.1$ (Compuesto **Y₁**).

El Sob. II fue sometido a separación por CC Flash con el eluyente **1b**. Se obtuvieron cuatro fracciones principales con las proporciones de eluentes que se detallan en el diagrama. La Fracción 4 (F4) contenía principalmente el compuesto **Y₁** y se le hizo una CC Gravitacional con el eluyente **1c**. El compuesto **Y₁** eluyó principalmente con las proporciones 5:1 y 3:1 y se obtuvo impuro. Posteriormente se purificó por medio de CC de baja presión. Este último paso se hizo dos veces. Se obtuvieron 41 mg del compuesto **Y₁** puro.

Purificación del compuesto **C** (t_R igual a la T 514 =2.5).

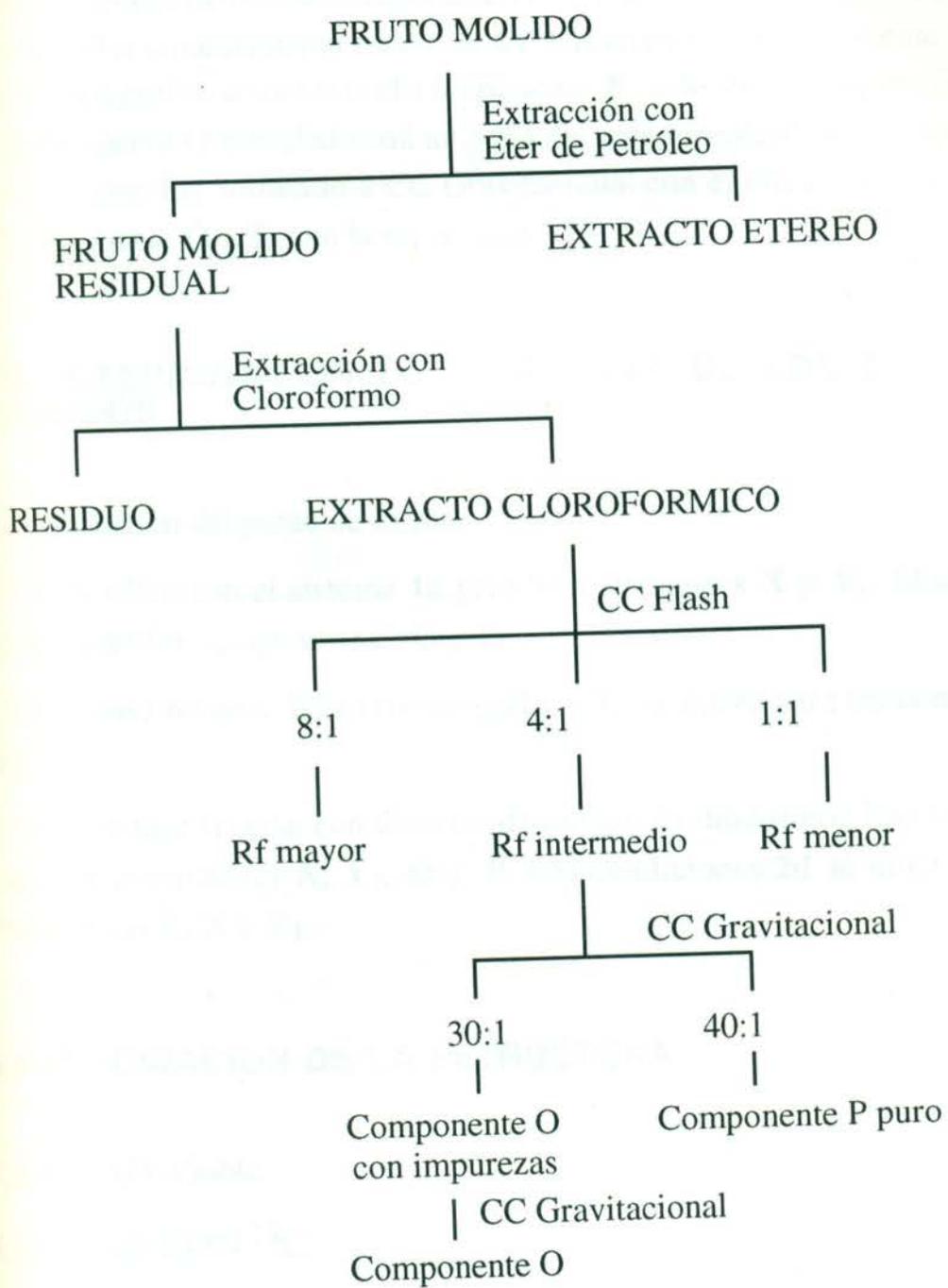
La Fracción 2 (F2) resultante de la separación del Sob. II, contenía el compuesto **C** impuro. La F2 se sometió a purificación por medio de CC Gravitacional dos veces con el eluyente **2c** para obtener 35 mg del compuesto **C** puro el cual eluyó con la proporción 15:1.

2.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACTIVO DEL FRUTO DE *K. johnstonii*. Diagrama 2.

El fruto de *K. johnstonii* (1 kg) se extrajo tres veces con Eter de Petróleo (2 L en cada extracción) para desengrasarlo y al fruto molido residual se le hicieron tres extracciones con Cloroformo de 2 L cada una. El extracto clorofórmico se fraccionó por CC Flash con el eluyente **2b**. Se obtuvieron así tres fracciones principales con las proporciones que se detallan en el diagrama; las fracciones, según el Rf en CCF de

DIAGRAMA 2

Karwinskia johnstonii



sílica con el eluyente **2a**, se denominaron Fracción de Rf mayor (200 mg), intermedio (10 g) y menor (160 mg).

Obtención de los componentes **O** y **P**.

Estos componentes se encontraron en la fracción de Rf intermedio la cual se sometió a separación por medio de CC Gravitacional con el eluyente **3c**. Con esta cromatografía se obtuvo el componente **P** solo en la proporción 40:1 y el componente **O** mezclado con un poco del componente **P** en la proporción 30:1, por lo que fue sometido a CC Gravitacional con el eluyente **4c** para obtener el componente **O** solo con la proporción 30:1.

2.3.3 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

- a. Determinación del punto de fusión.
- b. CCF en sílica con el sistema **1a** para los compuestos **X** y **Y₁**. El sistema **2a** se utilizó para los compuestos **C**, **O** y **P**.
- c. CCF en fase reversa. Esta cromatografía solo se utilizó para los compuestos **X** y **Y₁**.
- d. CLAR en fase reversa con detector de arreglo de diodos con las condiciones **1d** para los compuestos **X**, **Y₁**, **O** y **P**. Las condiciones **2d** se utilizaron para los compuestos **C**, **X** y **Y₁**.

2.3.4 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA

- a. Espectro UV-Visible.
- b. Espectro de RMN ¹³C.
- c. Espectro de RMN ¹H.

d. Espectro de RMN de doble dimensión.

e. Espectro de Masas.

2.3.5 ENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE *Artemia salina*^(36 y 37)

1. Se preparó agua de mar (38 g de sal por litro).
2. Se colocó agua de mar en el recipiente rectangular descrito y se añadieron huevos de larvas de *Artemia salina* en el lado cubierto.
3. Se dejaron 48 horas bajo luz blanca para que crecieran y maduraran las larvas.
4. Se prepararon los vasos de precipitado para 1000, 100 y 10 ppm. Se utilizaron tres vasos por concentración. Se preparó una solución de 20 mg en 2 mL de solvente. De esta solución se transfirieron 500, 50 o 5 μ L a los vasos correspondientes a 1000, 100 y 10 ppm respectivamente.
5. Se prepararon los vasos de precipitado para 100, 10 y 1 ppm. Se utilizaron tres vasos por concentración. Se preparó una solución de 2 mg en 2 mL de solvente. De esta solución se transfirieron 500, 50 o 5 μ L a los vasos correspondientes a 100, 10 y 1 ppm respectivamente.
6. El solvente fue evaporado con Nitrógeno. El material se disolvió en 50 μ L de DMSO, por cada 5 mL de solución con larvas.
7. Después de 2 días (cuando las larvas ya maduraron), se añadieron 5 mL de agua de mar y 10 larvas a cada vaso (30 larvas por dilución).
8. Se contó y anotó el número de larvas sobrevivientes a las 24 horas.
9. Se analizaron los datos con el programa de computadora Finney para determinar la DL_{50} y el intervalo de confianza del 95%.
10. Se hicieron diluciones adicionales en los casos necesarios.

Se considera actividad positiva cuando los valores son menores a 1000 o 100 ppm para extractos o sustancias puras respectivamente.

2.3.6 DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION DE LA CATALASA⁽³⁵⁾

2.3.6.1 Preparación de reactivos.

- Solución amortiguadora de Fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4: dilución 1:20 de solución patrón 1 M de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 .
- Solución de catalasa: dilución 1:200 de solución patrón de la enzima 10 mg/mL en solución amortiguadora de Fosfato de potasio, pH 7.4.
- Peróxido de hidrógeno 1 M: Dilución 1:10 de Peróxido de Hidrógeno al 30 % en solución amortiguadora de Fosfato de potasio, pH 7.4.
- Dilución 1:10 en etanol de cada compuesto probado a partir de una solución patrón de 1 mg/mL.

2.3.6.2 Determinación de la actividad de la catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 950 μL de solución amortiguadora de Fosfato de potasio.
- 40 μL de la solución de catalasa
- Se agitó y leyó a 240 nm (Blanco).
- Se disparó la reacción agregando 10 μL de Peróxido de hidrógeno. Se mezcló y leyó a 240 nm cada minuto durante 6 minutos.
- Lo anterior se repitió tres veces para obtener el valor promedio.

La actividad enzimática de la catalasa se expresó como U/mL (μM de Peróxido de hidrógeno utilizado/min/mL). Las tasas de reacción enzimática se midieron en un espectrómetro Beckman DU 7500 equipado con paquete de cinética enzimática.

2.3.6.3 Determinación del grado de inhibición sobre la actividad de la catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 930 μL de solución amortiguadora de fosfato de potasio.
- 40 μL de la solución de catalasa.
- 20 μL de la solución del compuesto a probar.
- Se agitó y leyó a 240 nm (Blanco).
- Se disparó la reacción con 10 μL de la solución de Peróxido. Se agitó rápidamente y leyó a 240 nm durante 6 min.
- Lo anterior se repitió tres veces para cada compuesto evaluado y se promediaron los resultados.

Se determinó el 100% de actividad sin el compuesto o sustancia problema y en base a ello se calculó el grado de inhibición de la catalasa causado por la adición del compuesto.

2.3.6.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}).

Se hicieron curvas de inhibición para cada compuesto utilizando varias concentraciones y graficándolas versus el logaritmo de la actividad de cada una de ellas.

Concentraciones utilizadas de cada compuesto:

Compuesto X : 1.945, 3.891, 9.727, 11.673 y 15.564 μM .

Compuesto Y_1 : 1.945, 3.891, 5.836, 7.782 y 9.727 μM .

Compuesto C : 3.875, 7.7519, 15.504 y 23.256 μM .

Para cada concentración se hicieron tres determinaciones del porcentaje de actividad de tal forma que se graficó el valor promedio de las mismas. Para el análisis estadístico se utilizó el método de los mínimos cuadrados con el programa Mynstat. Se obtuvo así la ecuación de la curva para calcular de ella la CI_{50} .

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 *Karwinskia parvifolia*

Se separaron y purificaron tres compuestos antracénicos a partir del fruto de *K. parvifolia*. La purificación se llevó a cabo de acuerdo al diagrama 1. Los compuestos fueron denominados como **X**, **Y₁** y **C** para fines de este trabajo.

3.1.1 COMPUESTO X

3.1.1.1 Determinación de la pureza.

Punto de Fusión: 271 - 273 °C.

Características Cromatográficas:

CCF de Sílica con el eluyente **1a**.

R_f: 0.22

Fluorescencia a 375 nm: Naranja oscura.

CCF de Fase Reversa.

R_f: 0.28

Fluorescencia a 375 nm: Negra.

CLAR con las condiciones **1d** (Cromatograma 3).

t_R: 2.7

CLAR con las condiciones **2d** (Cromatograma 4).

t_R: 2.8

3.1.1.2 Elucidación de la estructura.

Se realizaron los siguientes espectros para la elucidación de la estructura del compuesto **X**:

- Espectro UV - Visible en Etanol Merck (fig. 9).
- Espectro de Masas con Ionización Electrónica (fig. 10).
- Espectro de RMN ^{13}C en Dimetilsulfóxido (fig. 11).
- Espectro DEPT en Dimetilsulfóxido (fig. 12).
- Espectro de RMN ^1H en Cloroformo Deuterado (fig. 13, 14 y 15).
- Espectro HETCOR en Cloroformo Deuterado (fig. 16, 17 y 18).

Con la ayuda de estos espectros, se propone para el compuesto **X** la estructura expuesta en la figura 19.

3.1.2 COMPUESTO **Y₁**

3.1.2.1 Determinación de la pureza.

Punto de Fusión: 250 - 255 °C (Carbonizó).

Características Cromatográficas:

CCF de Sílica con el eluente **1a**.

Rf: 0.27

Fluorescencia a 375 nm: Amarilla.

CCF de Fase Reversa.

Rf: 0.34

Fluorescencia a 375 nm: Amarillo-Naranja.

CLAR con las condiciones **1d** (Cromatograma 3).

t_R : 3.02

CLAR con las condiciones **2d** (Cromatograma 4).

t_R : 3.6

3.1.2.2 Elucidación de la estructura.

- Espectro UV - Visible en Metanol Merck (fig. 20).
- Espectro de Masas con Ionización FAB (fig. 21).
- Espectro de RMN ^1H en Cloroformo Deuterado (fig. 22).
- Espectro HMQC en Dimetilsulfóxido (fig. 23).

Se propone para el compuesto **Y₁** la estructura expuesta en la figura 24.

3.1.3 COMPUESTO C

3.1.3.1 Determinación de la pureza.

Punto de Fusión: 145 - 146 °C.

Características Cromatográficas:

CCF de Sílica con el eluente **2a**.

Rf: 0.4

Fluorescencia a 375 nm: Verde-Amarillo.

CLAR con las condiciones **1d** (Cromatograma 3).

t_R : 2.4

CLAR con las condiciones **2d** (Cromatograma 4).

t_R : 3.3

3.1.3.2 Elucidación de la estructura.

- Espectro UV - Visible en Metanol Merck (fig. 25).
- Espectro de Masas con Ionización FAB (fig. 26).
- Espectro de RMN ^{13}C en Cloroformo Deuterado (fig. 27).
- Espectro DEPT en Cloroformo Deuterado (fig. 28).

- Espectro de RMN ^1H en Cloroformo Deuterado (fig. 29).

- Espectro HETCOR en Cloroformo Deuterado (fig. 30).

Se propone para el compuesto **C** la estructura que se muestra en la figura 31.

3.1.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN EL BIOENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE *Artemia salina*

Compuesto **X**: no presentó actividad.

Compuesto **Y₁**: no presentó actividad.

Compuesto **C**: presentó actividad con una $DL_{50} = 4.49$ ppm.

3.1.5 DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION PRODUCIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA

3.1.5.1 Grado de inhibición producido sobre la actividad de la catalasa por efecto de los compuestos antracénicos evaluados a una concentración fija (3.9 mM).

- 100% de la actividad de catalasa sin compuesto = 28.628 U/mL.

Compuesto	Actividad de catalasa (U/mL)	% de inhibición
X	21.687	24.24
Y₁	18.024	37.04
C	25.372	11.37

3.1.5.2 Determinación de la CI_{50} .

- Las curvas de inhibición obtenidas para los compuestos **X**, **Y₁** y **C** se muestran en las figuras 32, 33 y 34 respectivamente.

- Las ecuaciones obtenidas de las curvas son las siguientes:

Compuesto **X** Log Actividad = $1.910 - 0.012$ Concentración

Compuesto **Y₁** Log Actividad = $1.826 - 0.014$ Concentración

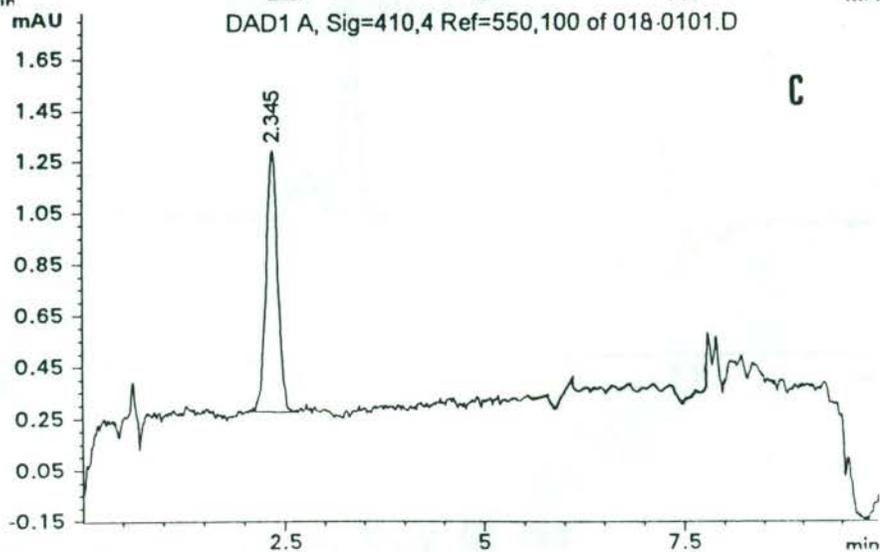
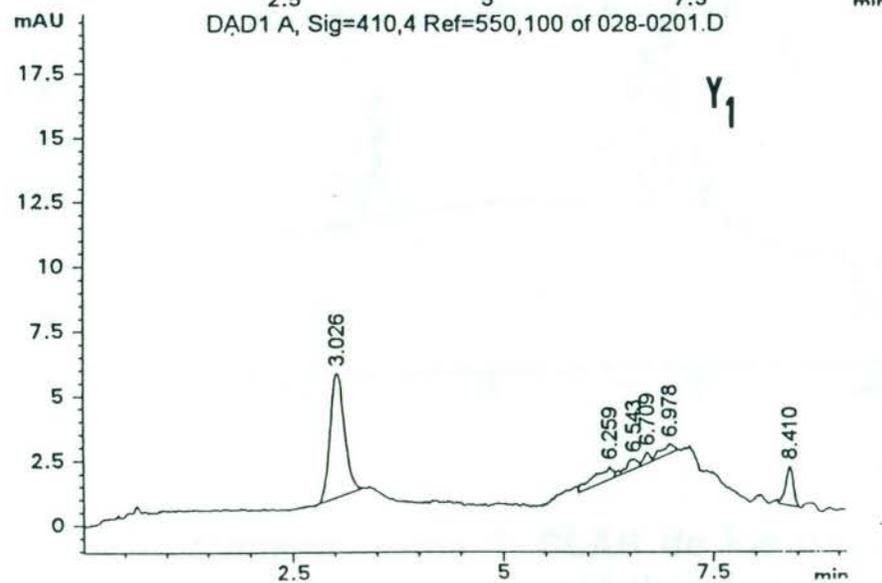
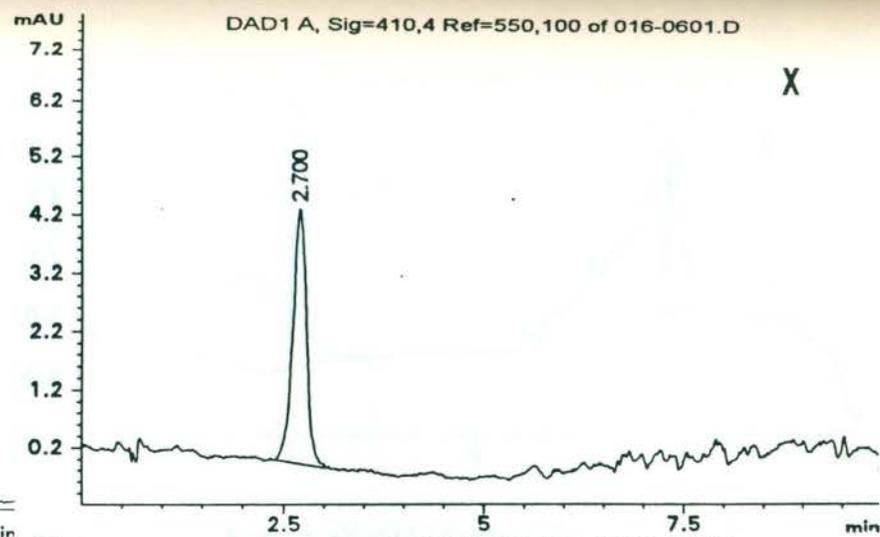
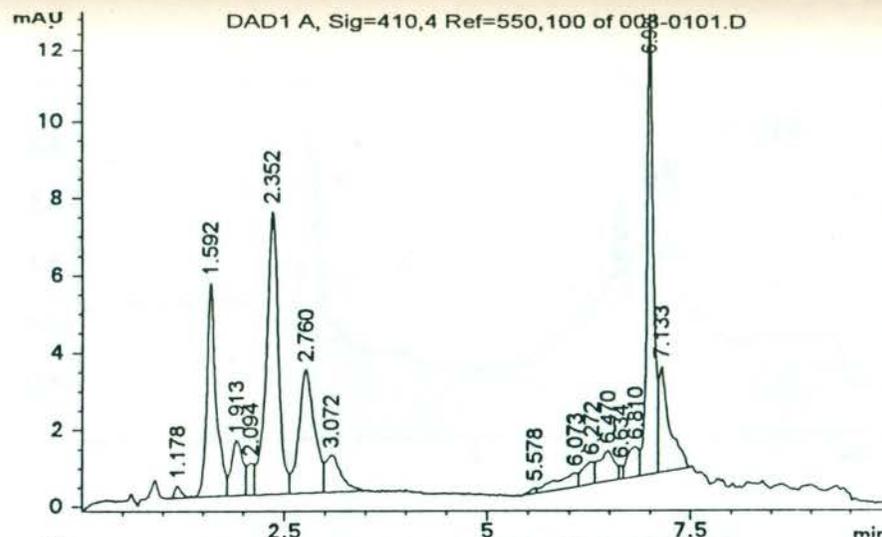
Compuesto **C** Log Actividad = $1.978 - 0.004$ Concentración

- La CI_{50} calculada para cada compuesto fue la siguiente:

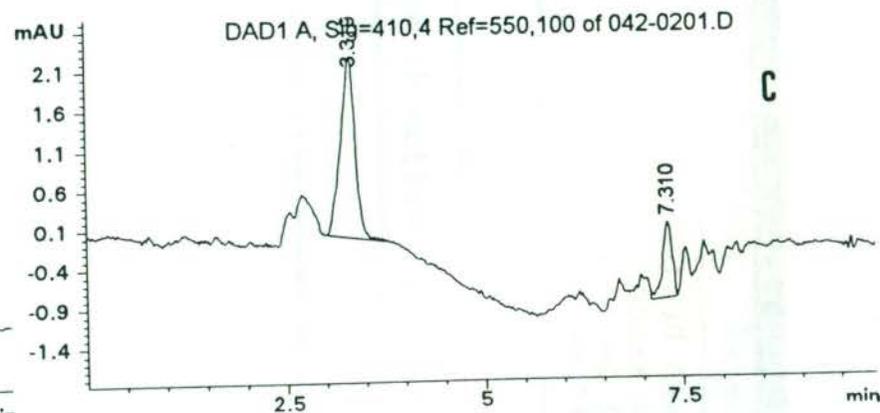
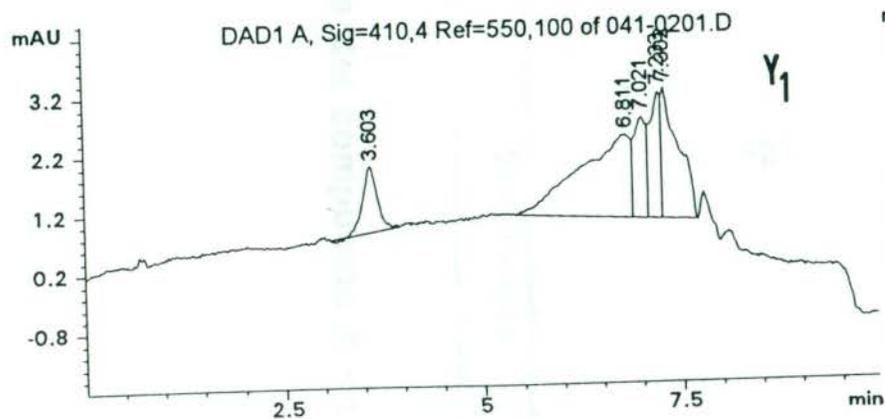
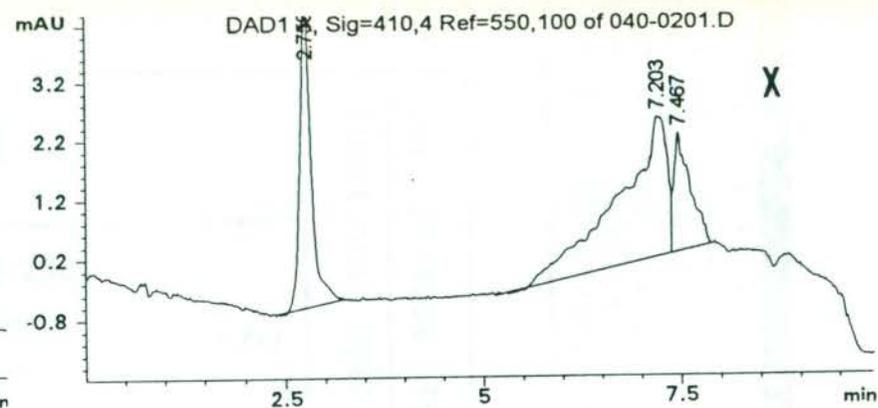
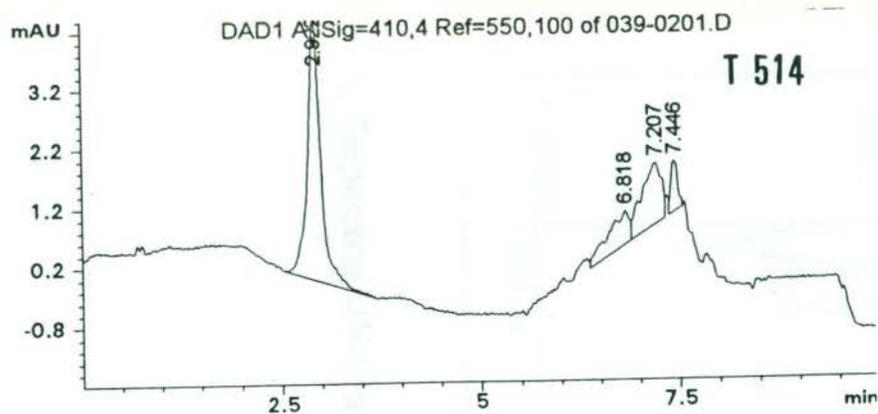
Compuesto **X** = $17.59 \pm 1.00 \mu\text{M}$

Compuesto **Y₁** = $9.07 \pm 0.54 \mu\text{M}$

Compuesto **C** = $69.77 \pm 1.99 \mu\text{M}$



Cromatograma 3. CLAR de los compuestos X, Y₁ y C; las condiciones son 1d.



Cromatograma 4. CLAR de los compuestos T 514, X, Y₁ y C; las condiciones son 2d.

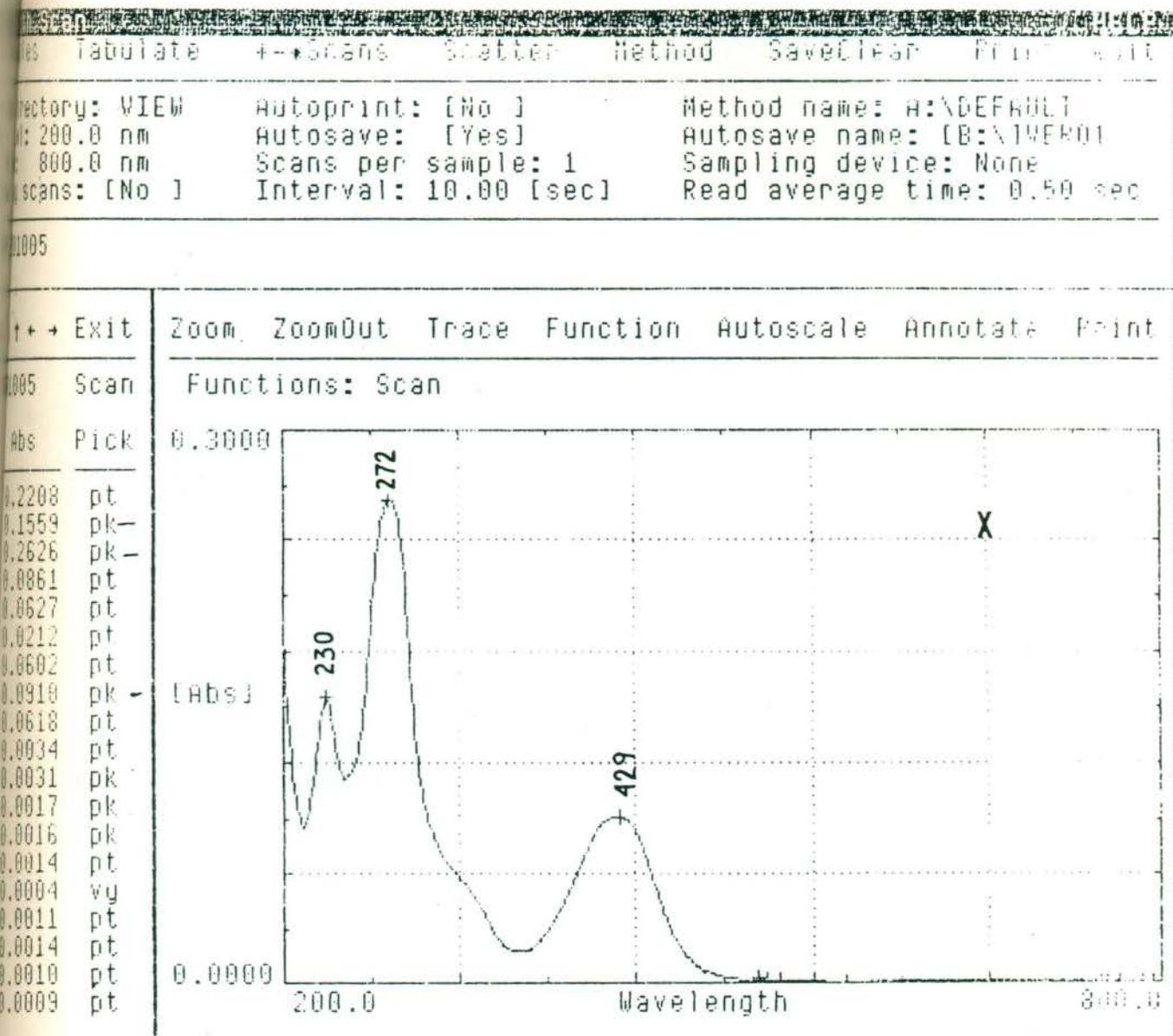


Fig. 9. Espectro UV-Visible del compuesto X en Etanol.

C-13 en DMSO-d6 muestra

Current Data Parameters
 NAME
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 940321
 Time 16.13
 PULPROG zgdc
 SOLVENT CDCl3
 AQ 0.4915400 sec
 FIDRES 1.017253 Hz
 DW 15.0 usec
 RG 32768
 NUCLEUS 13C
 D11 0.1000000 sec
 S2 30 dB
 HL1 1 dB
 D1 2.0000000 sec
 P1 10.0 usec
 DE 18.8 usec
 SF01 125.7730288 MHz
 SWH 33333.33 Hz
 TD 32768
 NS 30727
 DS 4

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 125.7598113 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 2.00 Hz
 GB 0
 PC 4.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 215.000 ppm
 F1 27038.35 Hz
 F2P 15.000 ppm
 F2 1886.40 Hz
 PPMCM 10.00000 ppm/cm
 HZCM 1257.59814 Hz/cm

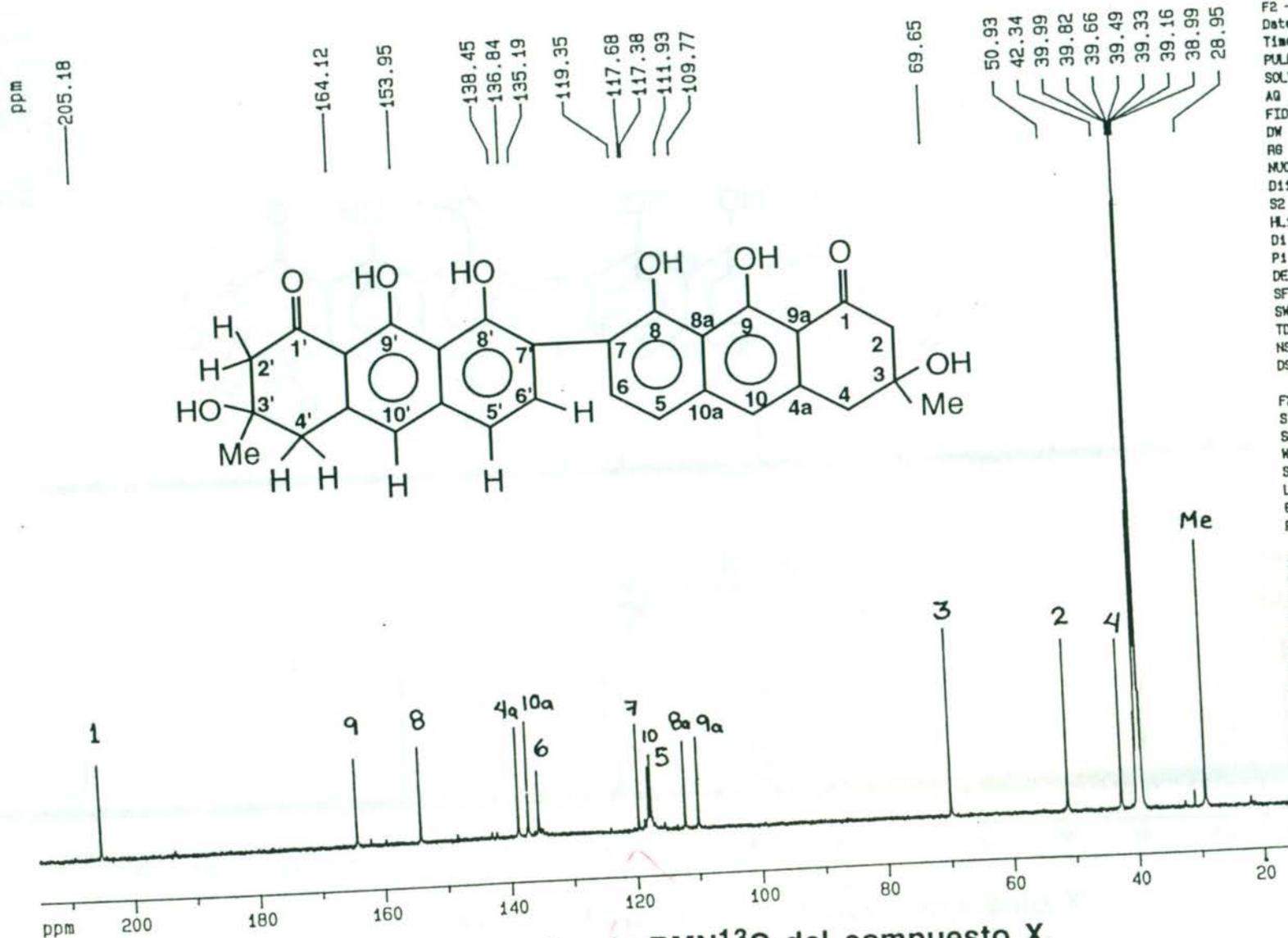


Fig. 11. Espectro de RMN¹³C del compuesto X.



HEYLC.006

SOLVENT DMSO-d6

SF 100.614

SI 65536

TD 65536

SW 25000.000

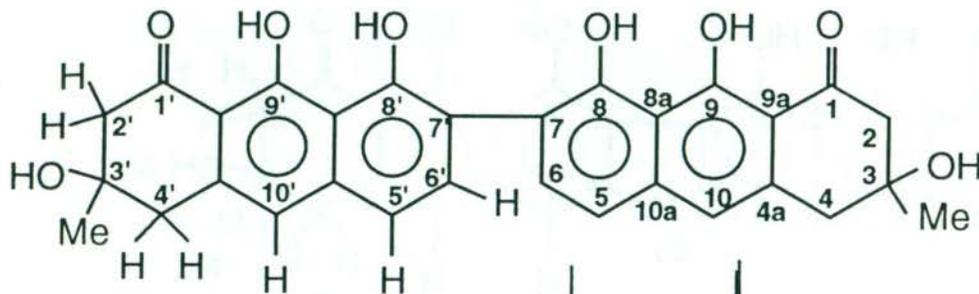
HZ/PT .763

AQ 1.311

RG 200

NS 4292

X



40

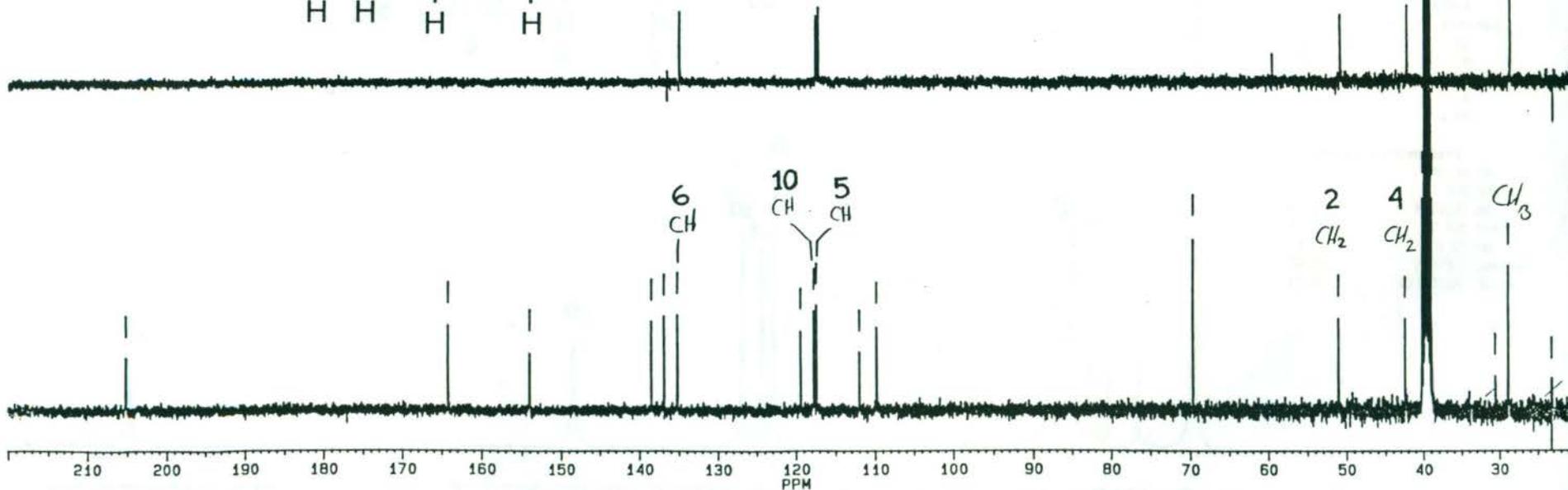


Fig. 12. Espectro DEPT del compuesto X.

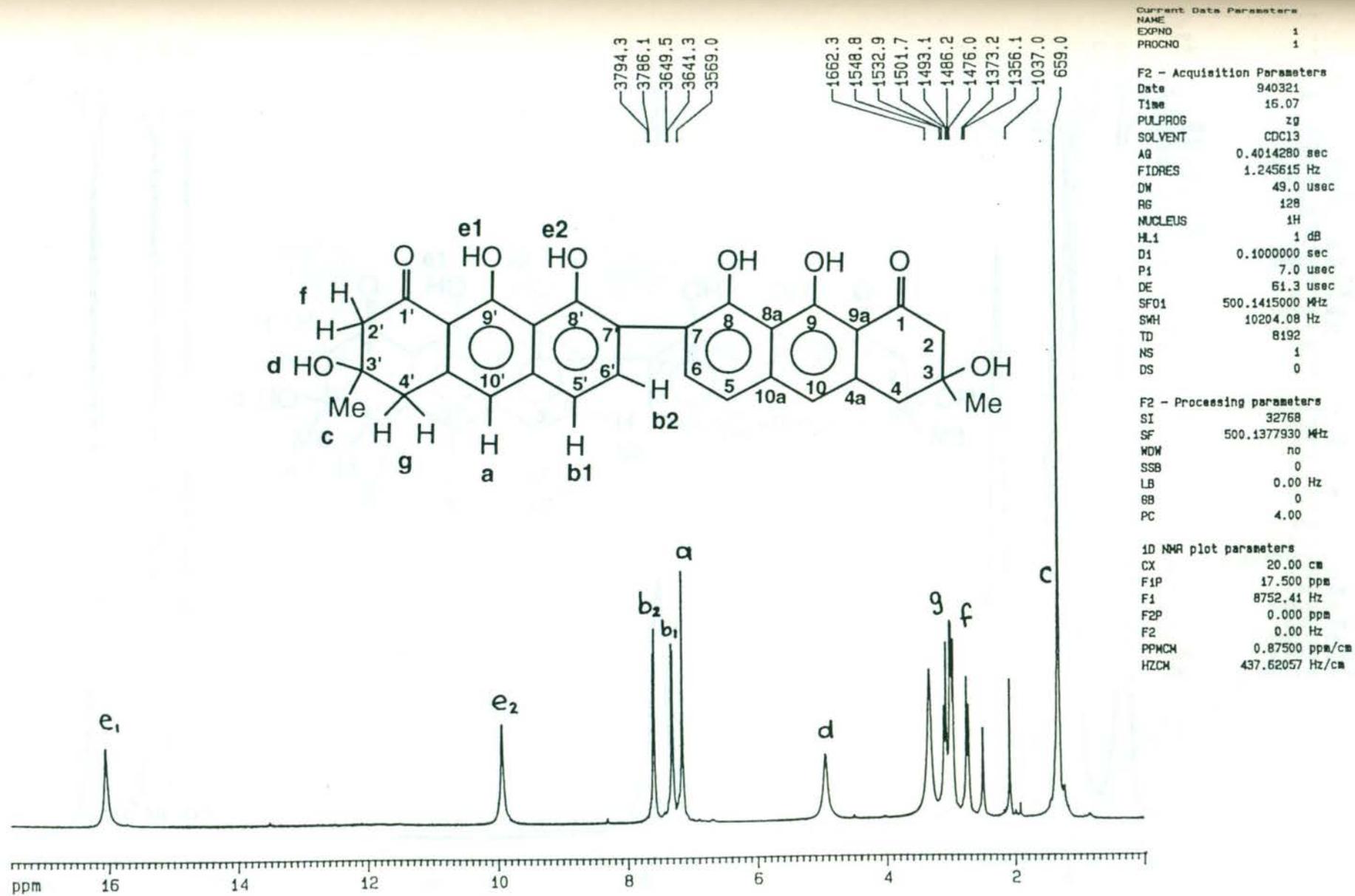


Fig. 13. Espectro de RMN¹H del compuesto X.

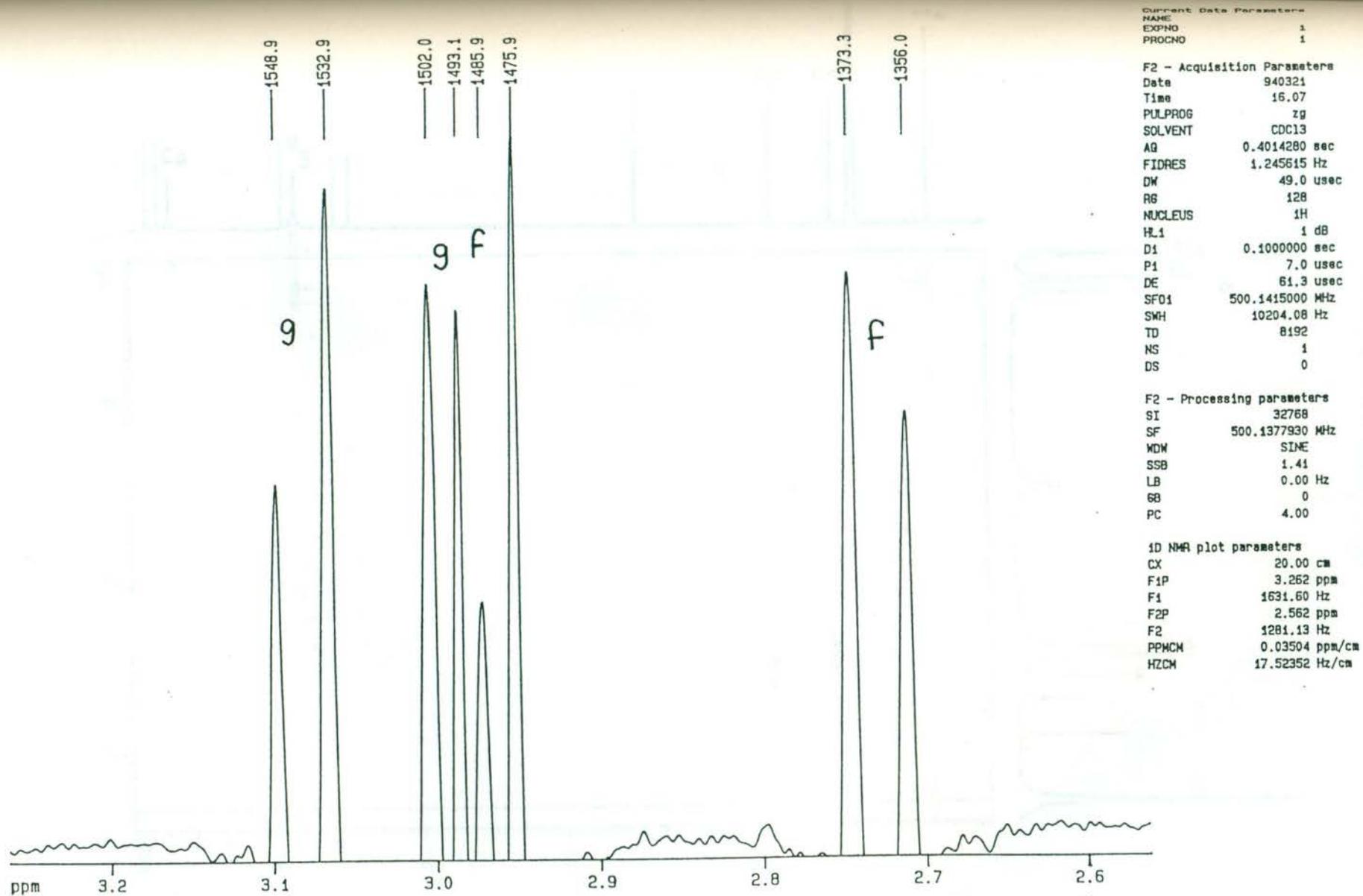


Fig. 15. Ampliación de la zona de alifáticos del espectro de RMN¹H del compuesto X.

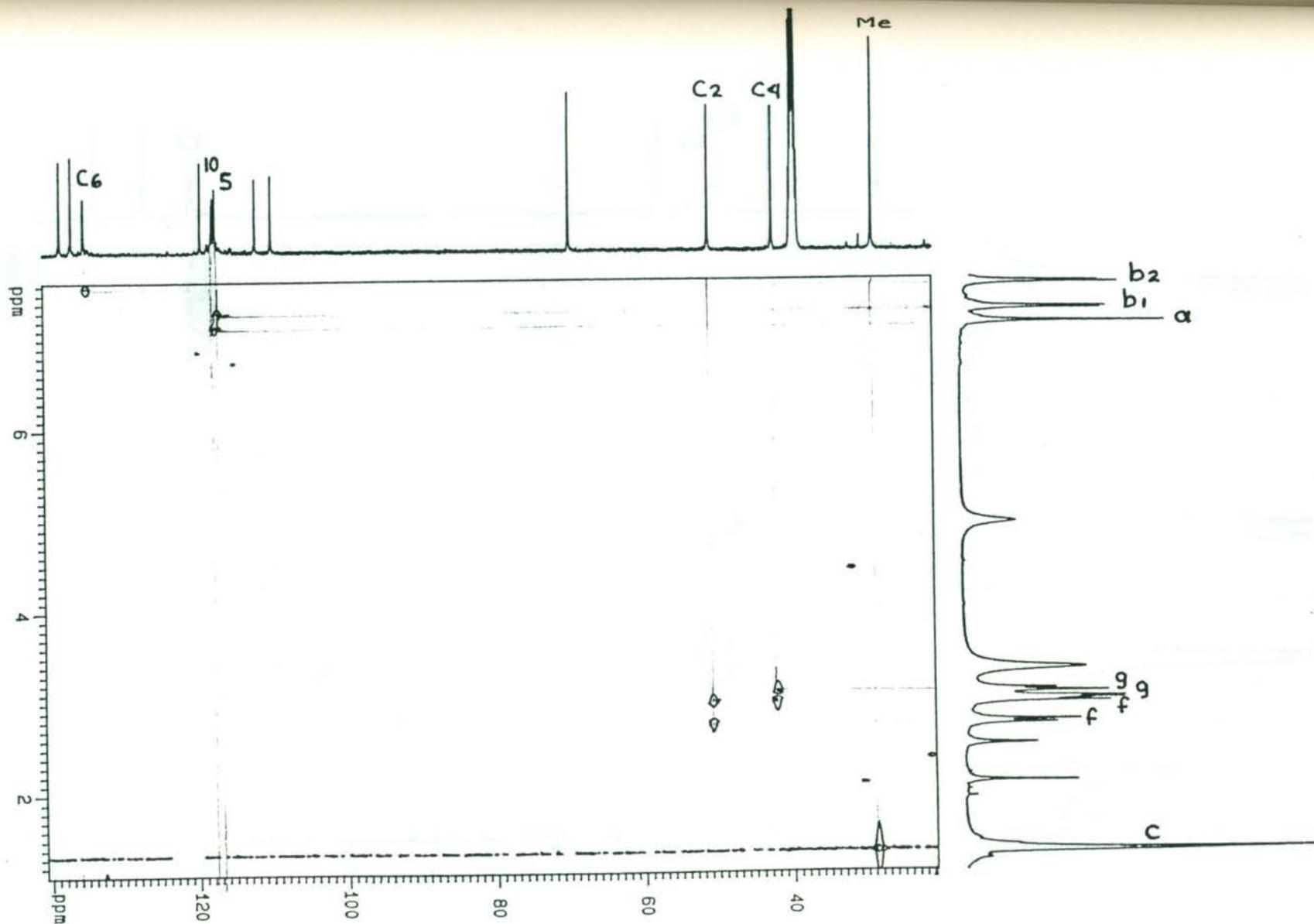


Fig. 16. Espectro HETCOR del compuesto X.

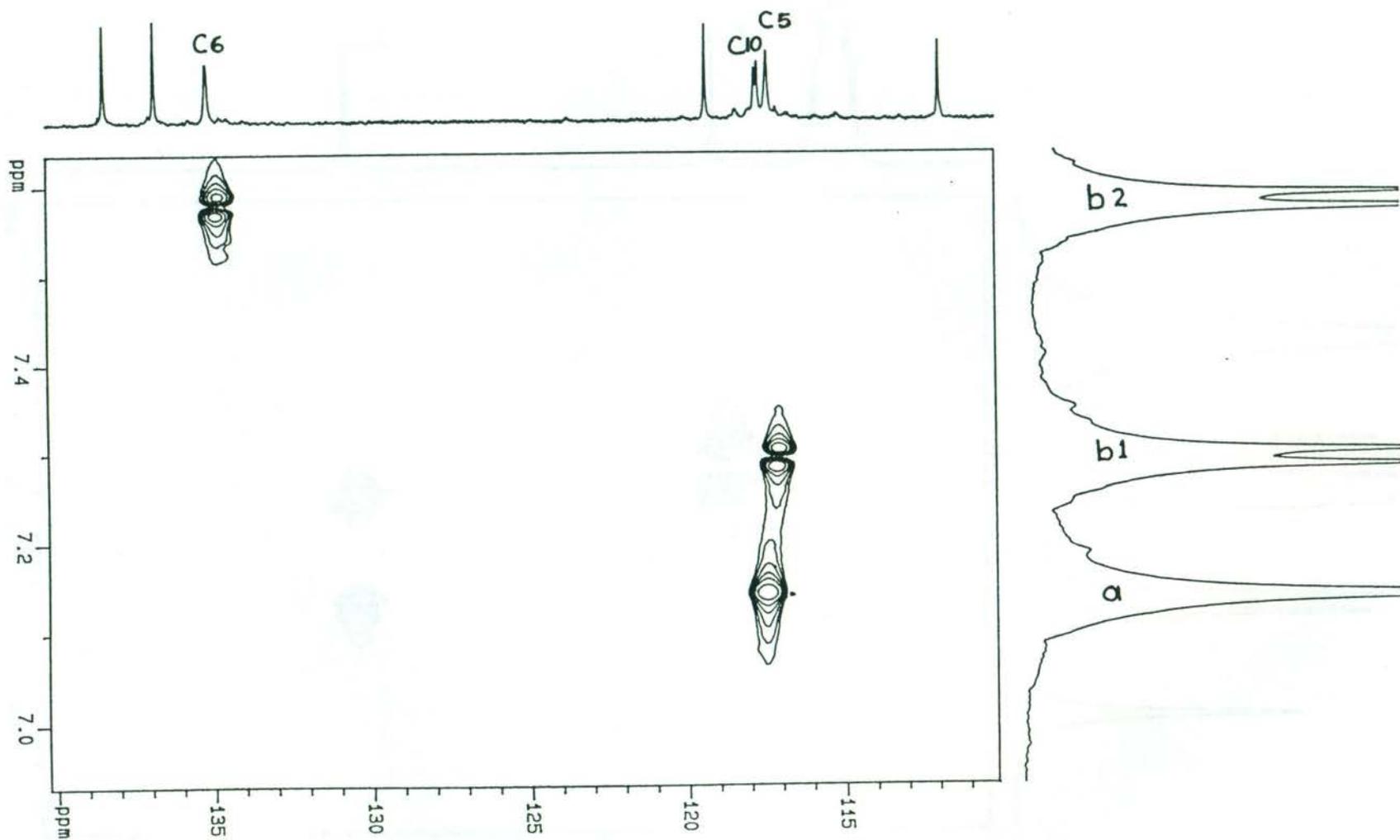


Fig. 17. Ampliación de la zona de aromáticos del espectro HETCOR del compuesto X.

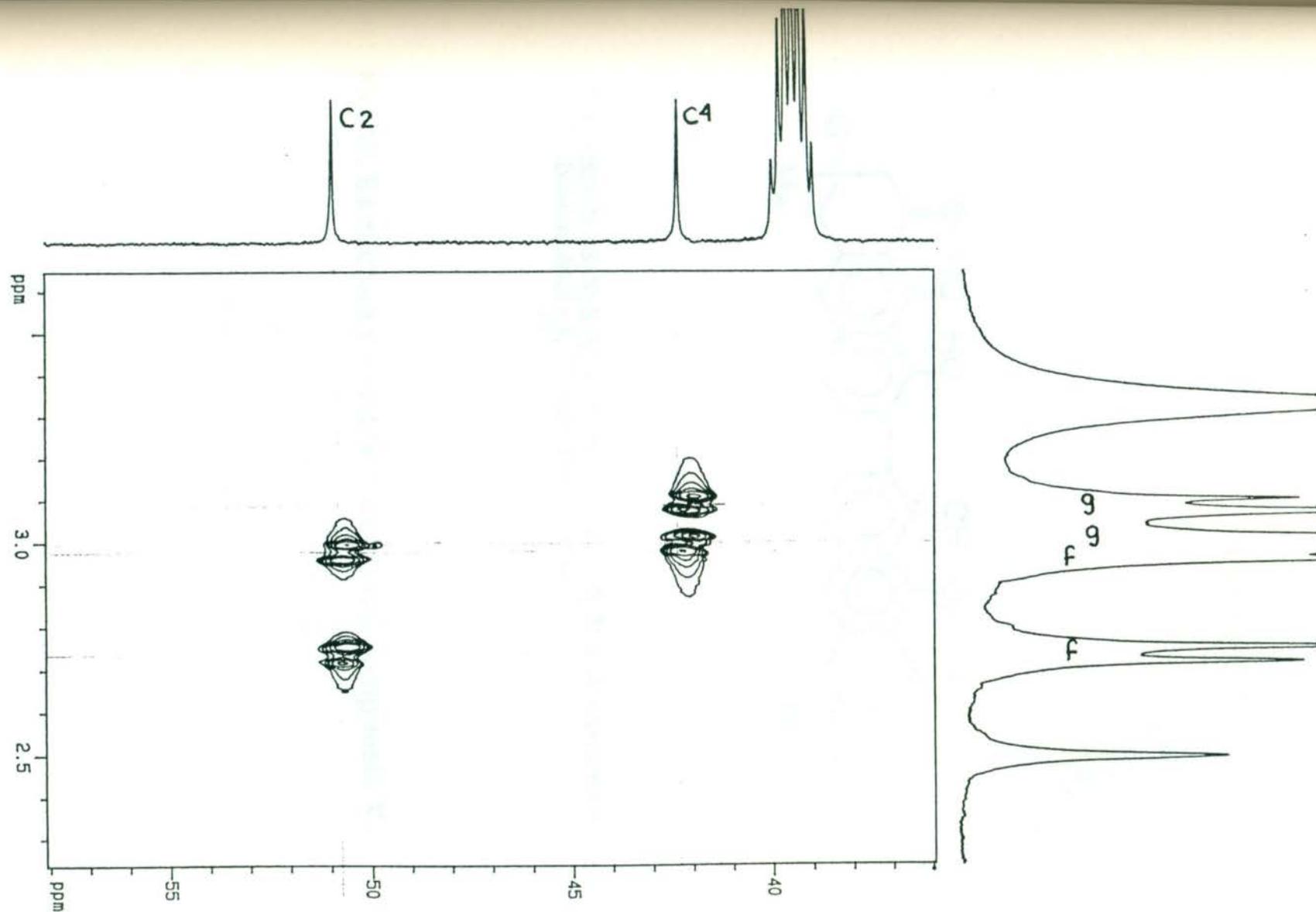
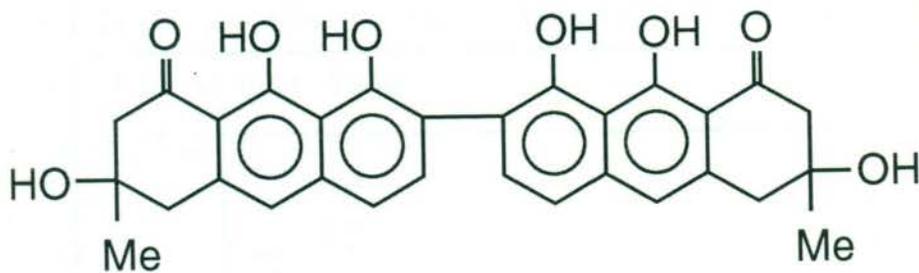


Fig. 18. Ampliación de la zona de alifáticos del espectro HETCOR del compuesto X.



3, 3' - dimetil - 3, 3', 8, 8', 9, 9' - hexahidrohi - 3, 3', 4, 4' - tetrahidro -
 (7, 7' - biantraceno) - 1, 1' - (2H, 2'H) - diona.

Fig. 19. Estructura y nombre químico del compuesto X.

```

File  Table  +*Scans  Cursor  Method  SaveClear  Print  ...
Directory: VIEW      Autoprint: [No ]      Method name: A:\DEFAULT
Wavelength: 200.0 nm  Autosave: [Yes]     Autosave name: [B:\DEFAULT]
Wavelength: 800.0 nm  Scans per sample: 1  Sampling device: None
By scans: [No ]      Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

```

01001

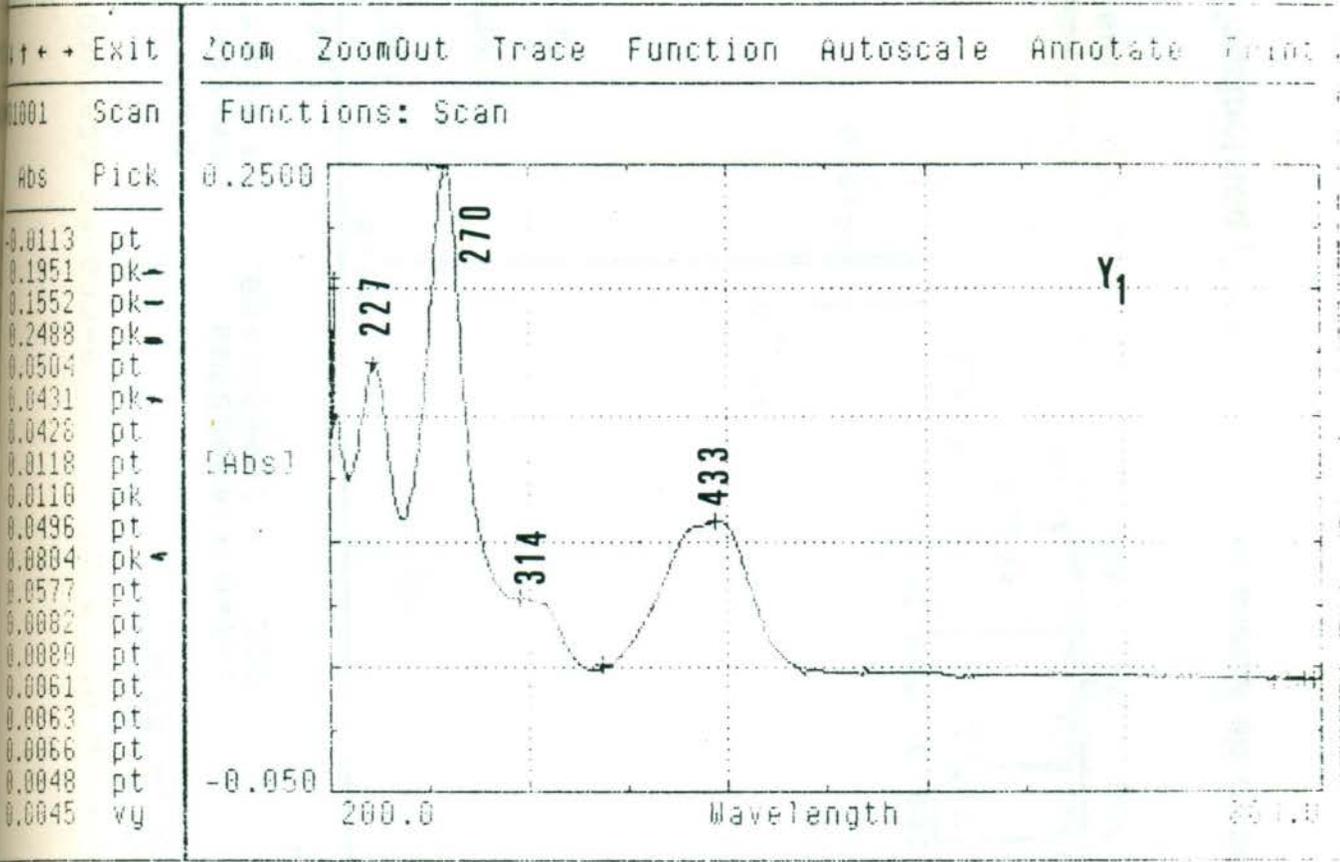


Fig. 20. Espectro UV-Visible del compuesto Y₁ en Metanol.

SPEC: A020095 ver 4 on UIC 2 2
Samp: Y1 EM Y RMN'H
Mode: EI +Q1MS LMR UP PROF
Oper: TRACY
Base: 514.9
Norm: 514.9
Peak: 1000.00 mmu
Data: + 1>13

8-FEB-95 DERIVED SPECTRUM 9
Start: 16:42:26 13

Inten: 48955392
RIC: 1008081408

Inlet:
Masses: 200 > 700
peaks: 804

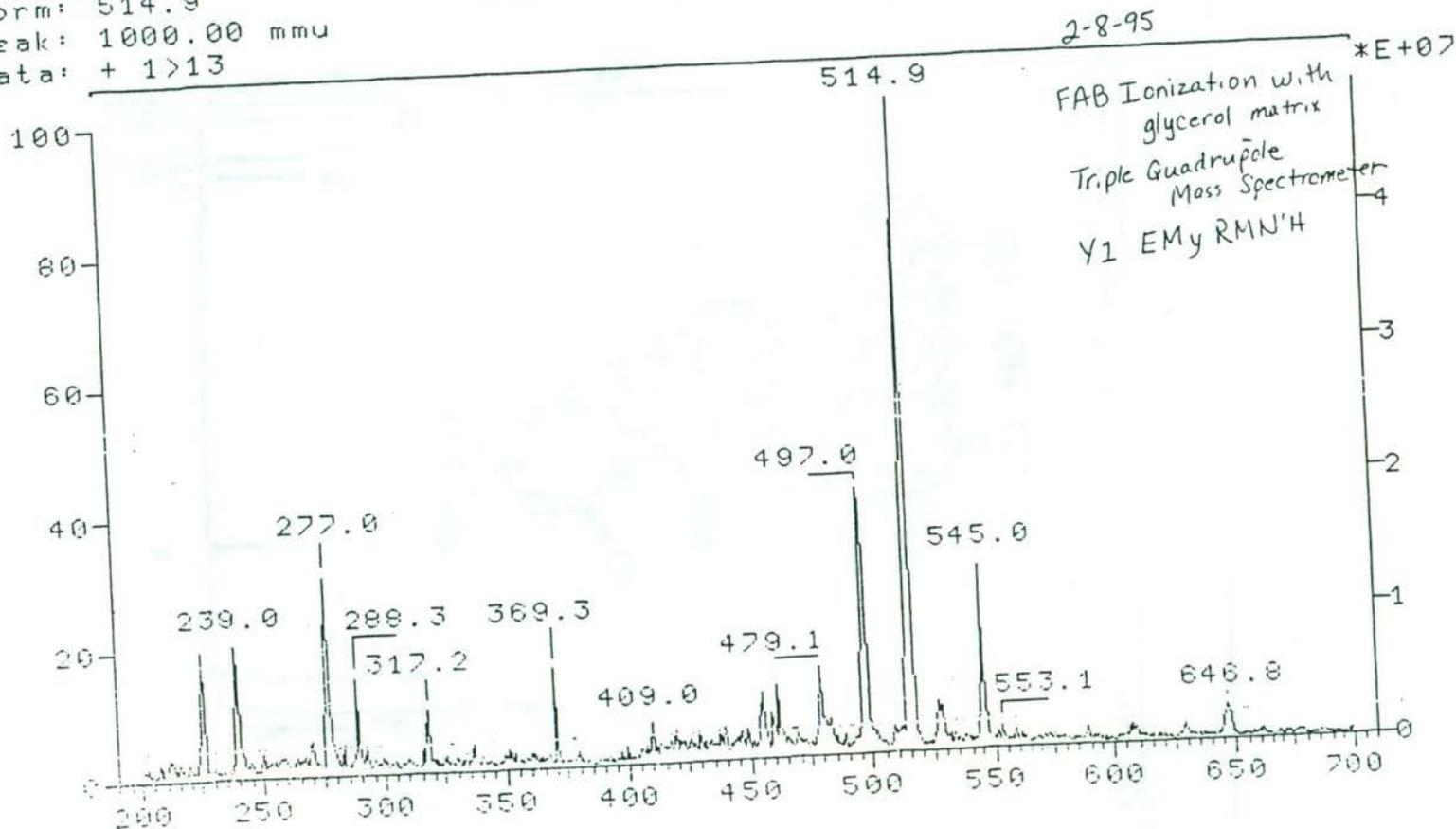


Fig. 21. Espectro de Masas del compuesto Y₁ por Ionización FAB.

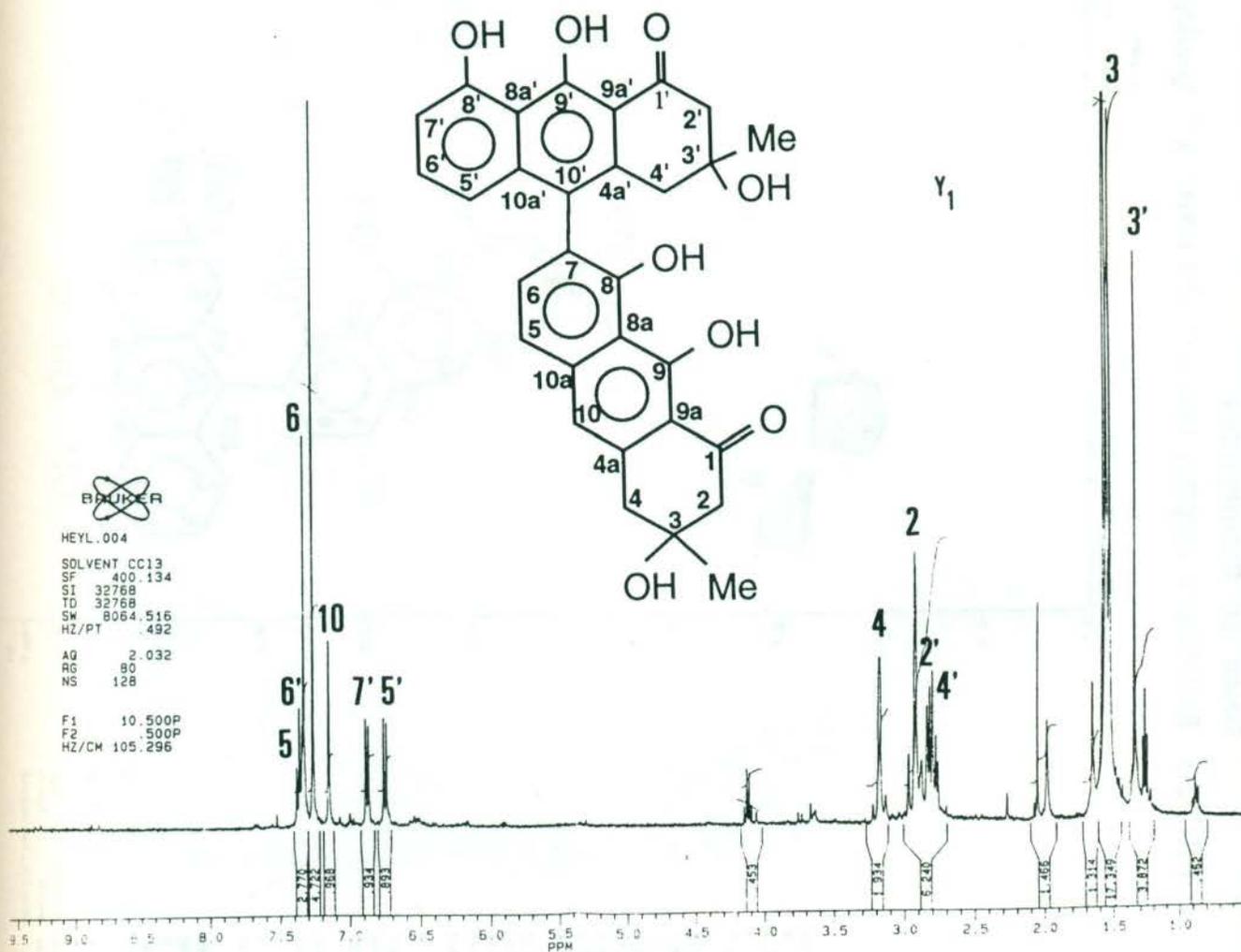
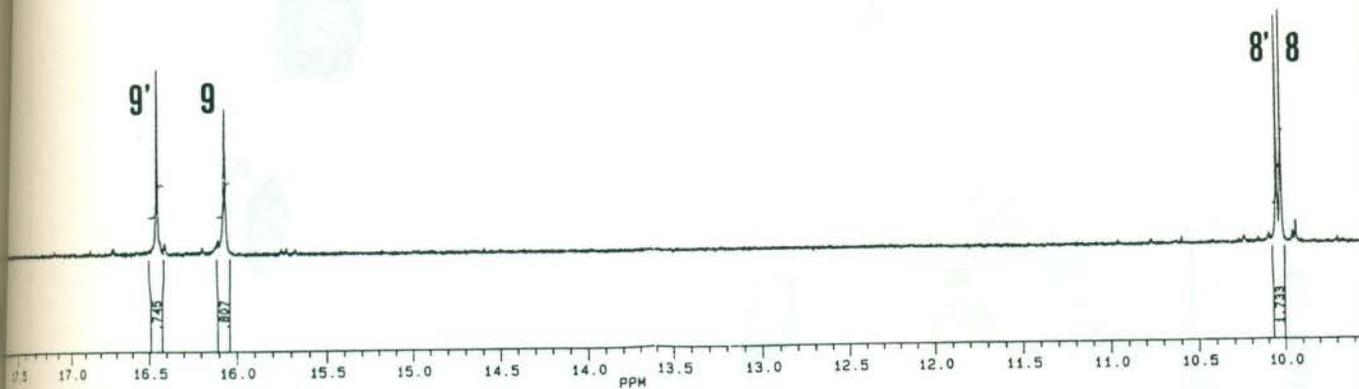


Fig. 22. Espectro de RMN¹H del compuesto Y₁.

TIME: 1 hour and 41 minutes
 exp3 pulse sequence: hmqc2d

ACQUISITION	SAMPLE	ACQUISITION ARRAYS
av 5704.5	date Apr 29 94	array phase
at 0.180	solvent DMSO	arraydia 256
np 2048	file /home/sun	
lb 3200	11/leon/p28_hmqc2d	1 phase
as 8	SPECIAL	1 1
dl 0.952	temp 25.0	2 2
nl 32	gain 20	
ct 0	spin 0	
2D ACQUISITION		
awl 20000.0	het 0.008	
nl 128	pw90 24.000	
phase arrayed	FLAGS	
TRANSMITTER	ha nn	
tn H1	DECOUPLER2	
sfrq 300.068	dn2 undefined	
tof 1337.8	de2 undefined	
tpwr 63	PROCESSING	
pu 24.000	gf 0.083	
DECOUPLER	gfa not used	
dn C13	fn 2048	
dof -900.2		
puxlvl 57	2D PROCESSING	
pux 9.000	abl -0.013	
da nny	abal -0.013	
daw ccg	gfl 0.006	
daf 22222	gfa1 not used	
dpwr 42	fnl 512	
dseq garpl	DISPLAY	
drea 1.0	ap 1957.4	
	wp 323.4	
HMOC	apl 7878.2	
null 0.350	wpl 2274.5	
J 140.0	rfl 446.0	
HMBC	rfl 446.0	
abond n	rflp 0	
jnxh 8.0	rfl1 10000.0	
PRESATURATION	rflp1 6268.3	
astfrq 0	PLOT	
astdly 0	uc 155.0	
astpwr 0	ac 0	
astflg nn	uc2 155.0	
slpflg nn	ac2 0	
astshape slpaatd	va 10000	
h2off 1500.0	th 1	
	ai cdc ph	

90178 51

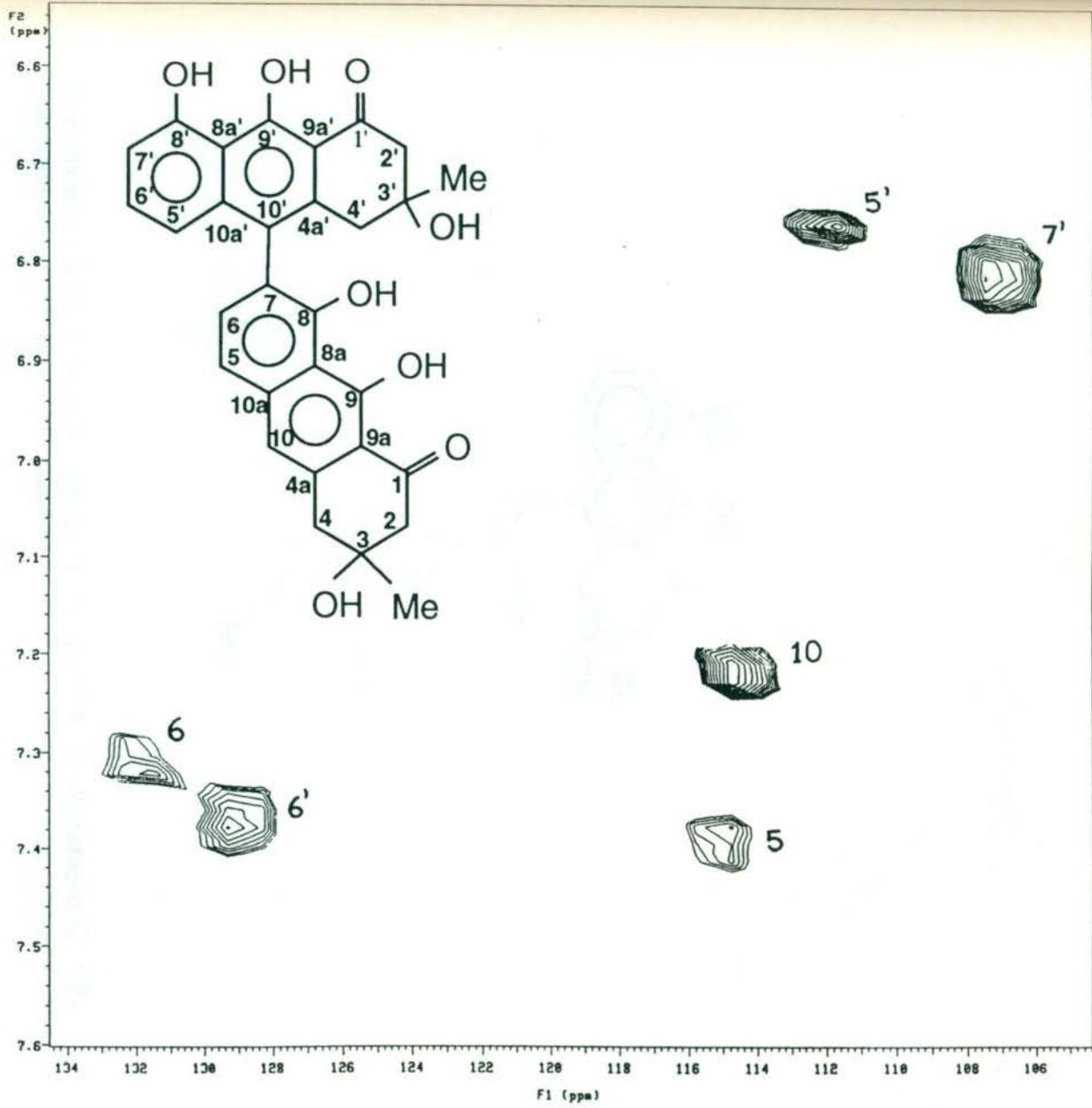
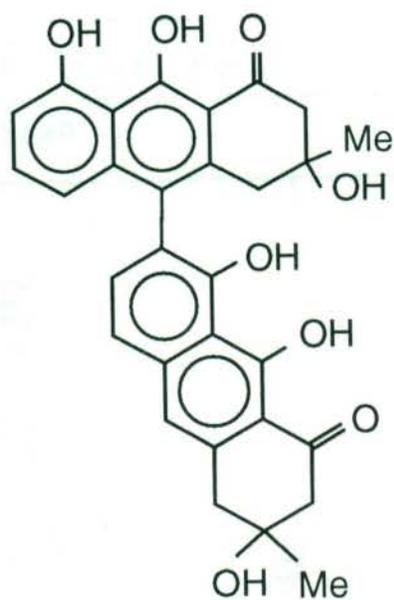


Fig. 23. Espectro HMBC del compuesto Y₁. Ampliación de la zona de aromáticos.



3,3'- dimetil - 3, 3', 8, 8', 9, 9' - hexahidroxi - 3, 3', 4, 4' - tetrahidro (7, 10' - biantraceno) - 1, 1' (2H, 2'H) - diona.

Fig. 24. Estructura y nombre químico del compuesto Y₁

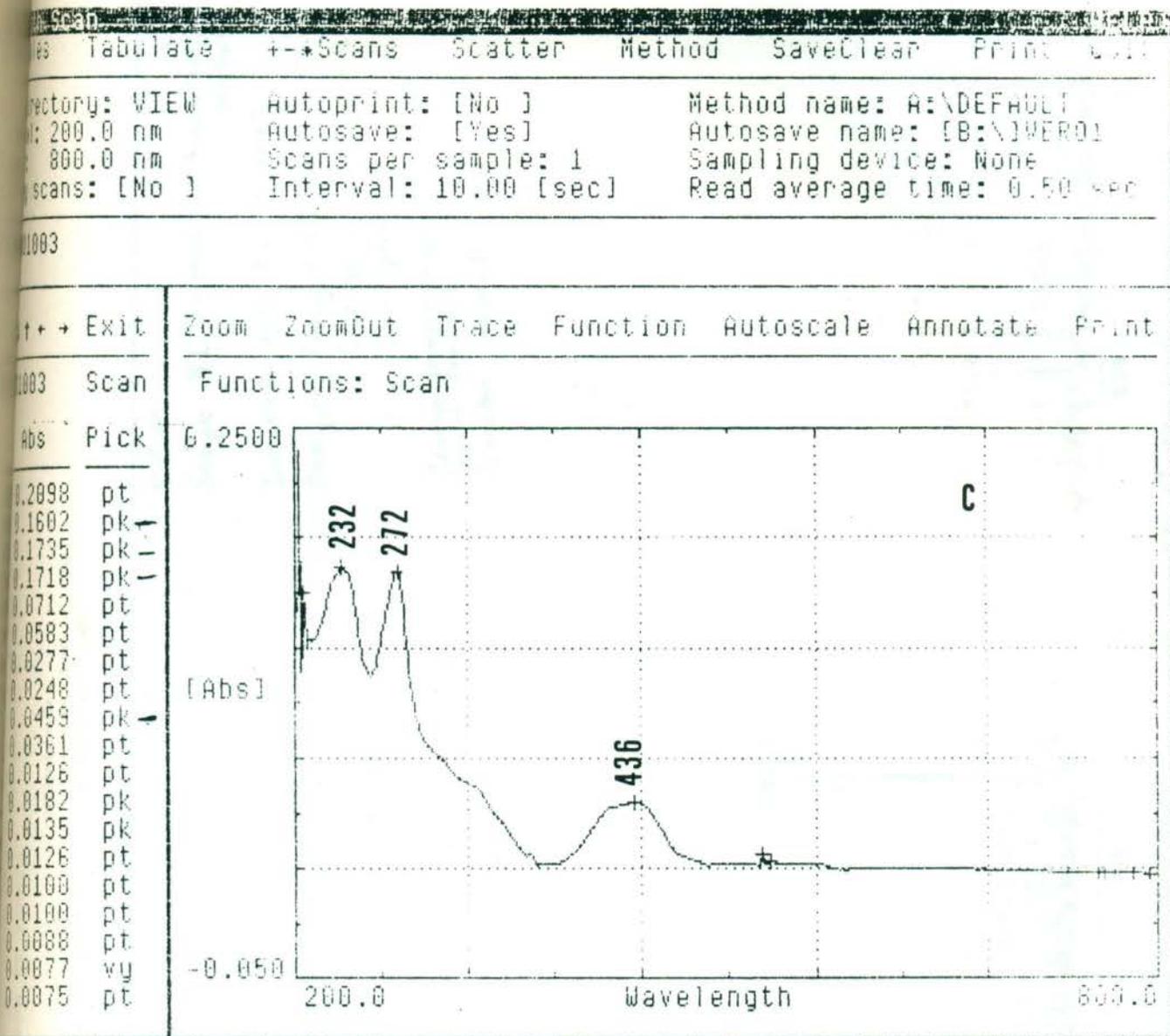


Fig. 25. Espectro UV-Visible del compuesto C en Metanol.

Sample: C
 Name: NBR, FOR DRG. NOEMI WAKSNAH DE TORRES
 Mode: EI +01MS LMR UP PROF
 Opert: TRACY MCCA
 Base: 154.1
 Norm: 154.1
 Peak: 1000.00 m/z
 Data: 1, 10

Inlet: 1
 Masses: 100 - 650
 # peaks: 1100

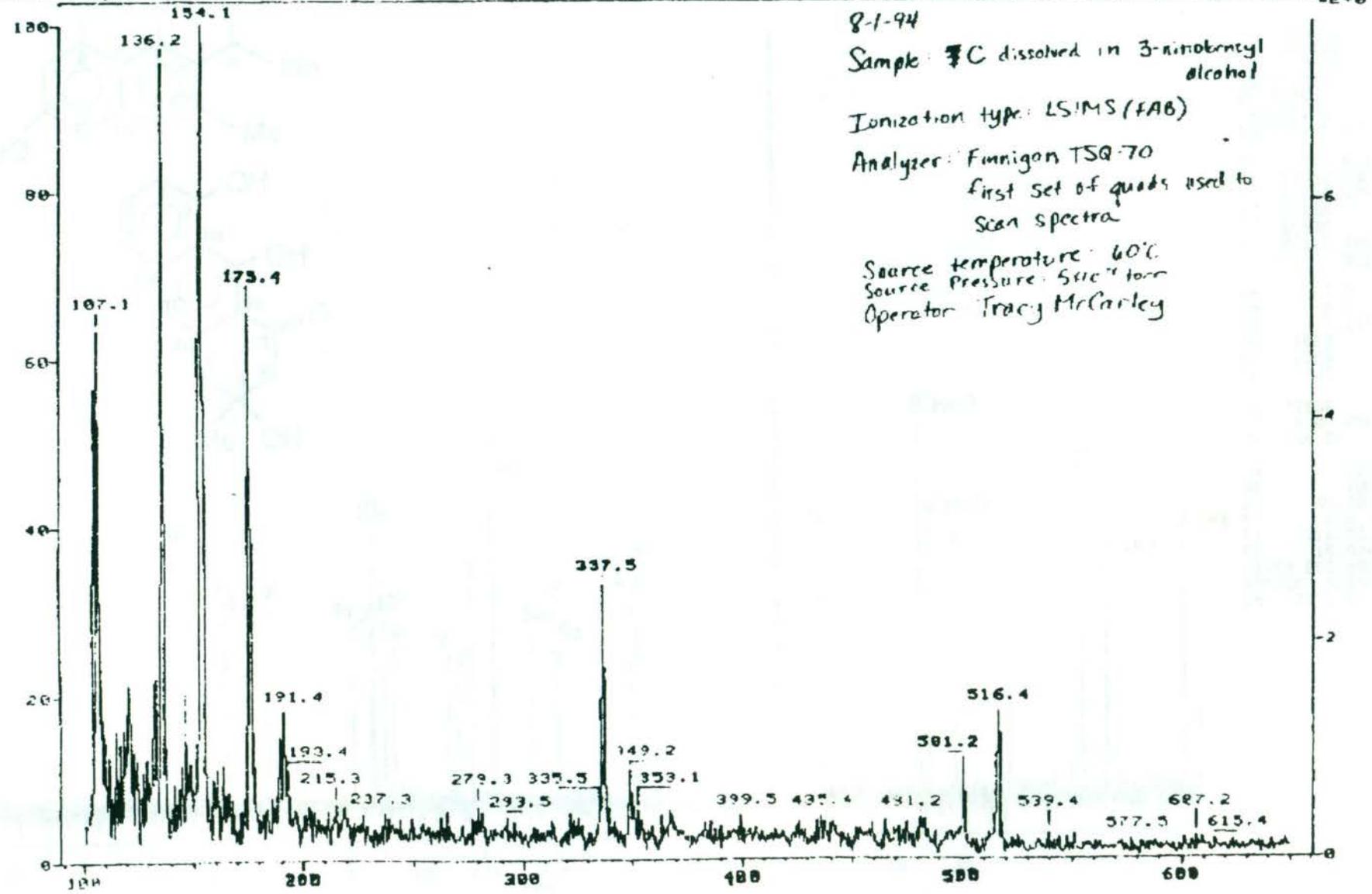


Fig. 26. Espectro de Masas del compuesto C por Ionización FAB.

54

56

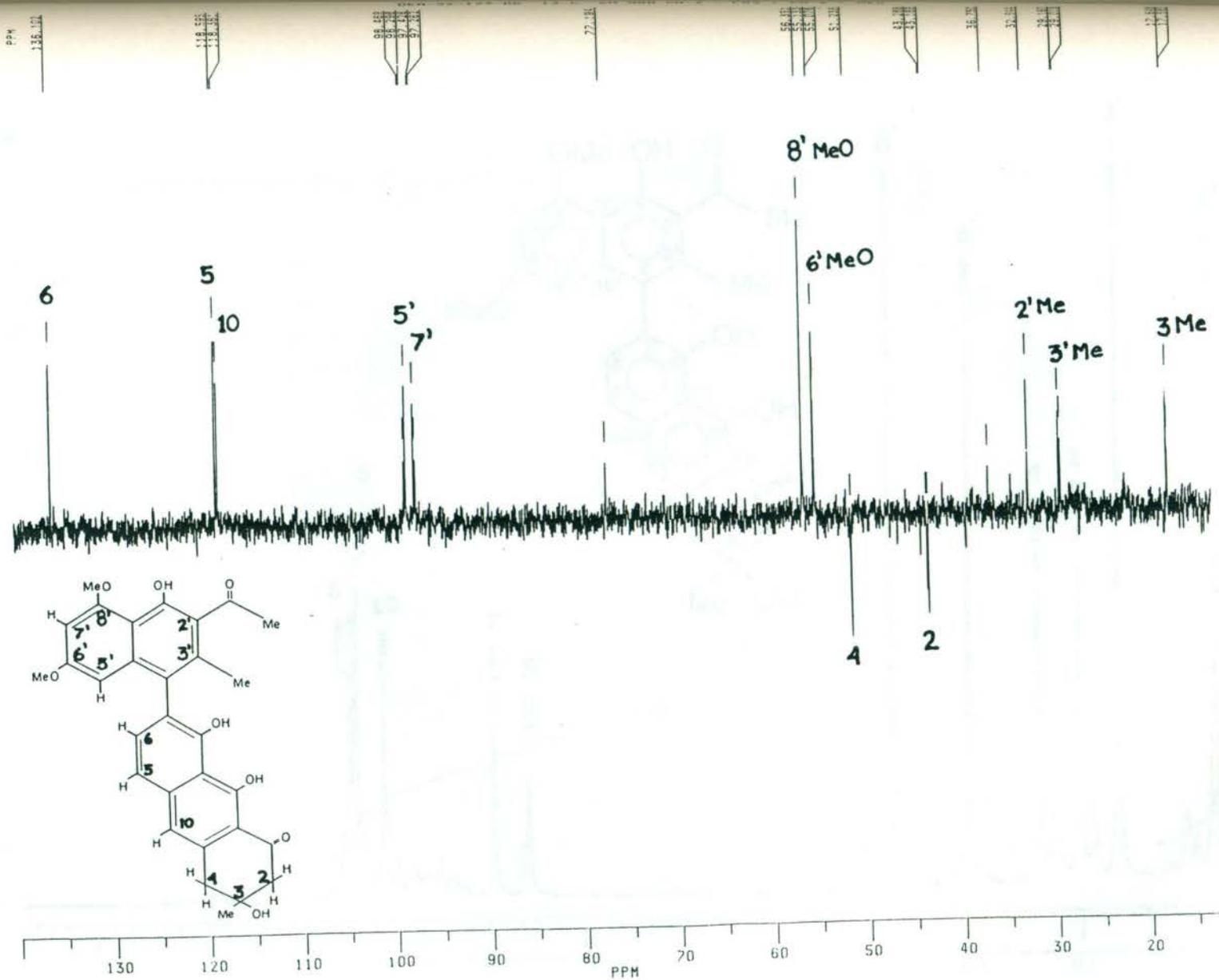


Fig. 28. Espectro DEPT del compuesto C.

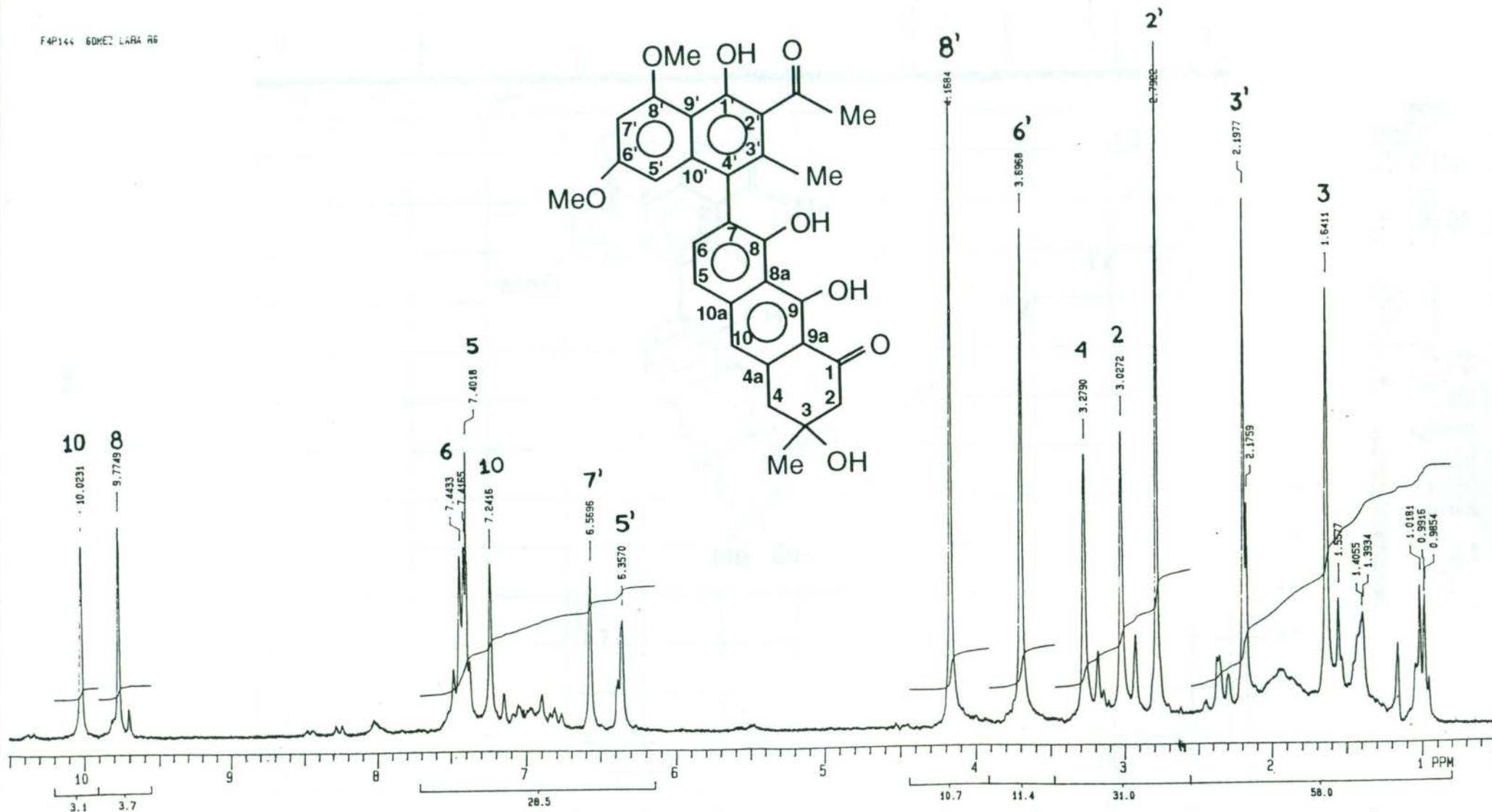
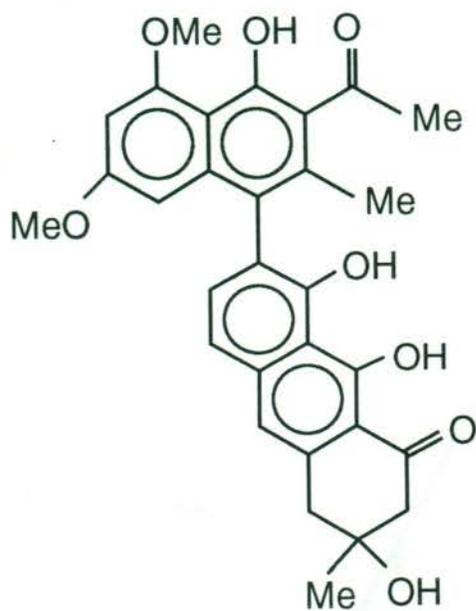


Fig. 29. Espectro RMN¹H del compuesto C.



7 - (2' - acetil - 6', 8' - dimetoxi - 3' - metil - 1' - hidroxil - 4' naftil) - 3, 4 - dihidro - 3 - metil - 3, 8, 9 - trihidroxil - 1 (2H) - antracena.

Fig. 31. Estructura y nombre químico del compuesto C

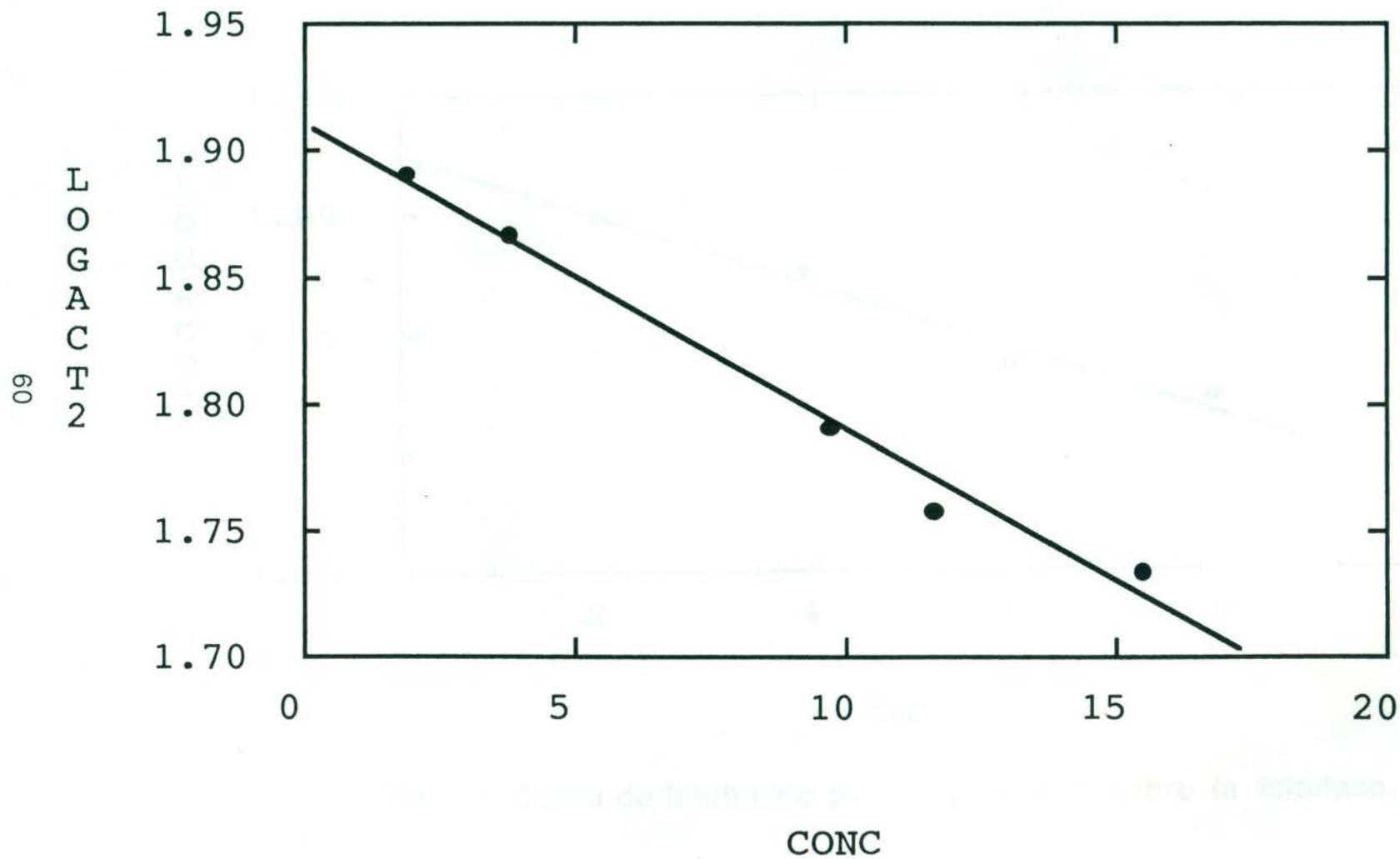


Fig. 32. Curva de Inhibición del compuesto X sobre la catalasa.

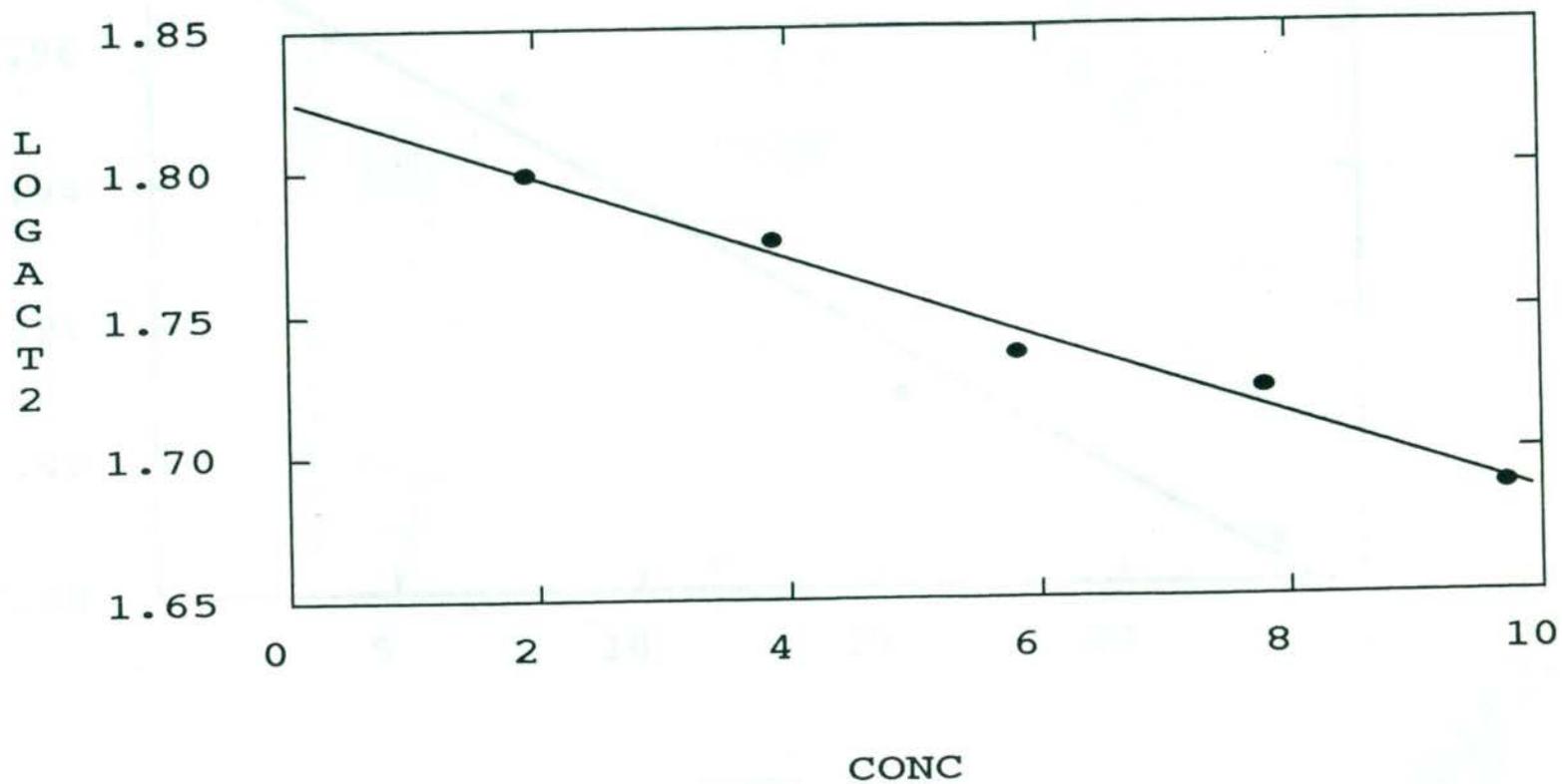


Fig. 33. Curva de Inhibición del compuesto Y_1 sobre la catalasa.

3.2 *Karwinskia johnstonii*

El extracto etéreo no presentó actividad en el ensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina*. El extracto activo del fruto de *K. johnstonii* (extracto clorofórmico) se fraccionó con ayuda de la CC Flash en tres fracciones principales denominadas fracción de Rf mayor, de Rf intermedio y de Rf menor de acuerdo a la CCF de sílica. A partir de la fracción de Rf intermedio se obtuvieron los componentes **O** y **P**.

3.2.1 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE EL BIOENSAYO EN LARVAS DE *Artemia salina*

Rf mayor: no presentó actividad.

Rf intermedio: presentó actividad con una DL_{50} de 37.1 ppm.

Rf menor: no presentó actividad.

3.2.2 ANALISIS DE LA FRACCION DE Rf INTERMEDIO

A partir de esta fracción se obtuvieron 2 componentes a los que se denominó **O** y **P**.

Punto de Fusión del componente **O**: 256 - 258 °C.

Punto de Fusión del componente **P**: 228 - 230 °C.

Espectro UV-Visible del componente **O** en Metanol Merck (fig. 35).

Espectro UV-Visible del componente **P** en Etanol Merck (fig. 36).

Características Cromatográficas.

CCF de Sílica con el solvente **2a**:

Rf componente **O**: 0.46

Rf componente **P**: 0.48

Fluorescencia a 375 nm:

Componente **O**: Amarillo-Naranja.

Componente **P**: Naranja- Oscuro.

CLAR con las condiciones **1d**:

t_R componente **O**: 4 picos a 4.2, 4.4, 4.9 y 5.4 min. (Cromatograma 5).

t_R componente **P**: 7.05 min (Cromatograma 6).

3.2.3 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS (ENSAYO EN LARVAS DE *Artemia salina*)

Componente **O**: Presentó actividad con una DL_{50} de 13.2 ppm.

Componente **P**: Presentó actividad con una DL_{50} de 42.3 ppm.

Fig. 33. Espectro UV-Visible del componente **O**.

Files Table 1.3 + + + + + Method Save/Load Print

Directory: VIEW Autoprint: [No] Method name: A:\DEFAULT
 Wl: 200.0 nm Autosave: [Yes] Autosave name: [B:\N1VER01
 : 800.0 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
 Scans: [No] Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

01002

↑ + → Exit Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

01002 Scan

Functions: Scan

Abs Pick

0.8321	pt
0.1979	pk -
0.2452	pk - -
0.1745	pk - - -
0.0553	pt
0.0489	pt
0.0218	pt
0.0342	pt
0.0518	pk - -
0.0520	pk - - -
0.0382	pt
-0.0003	pt
-0.0003	pk
-0.0015	vy
-0.0006	pt
-0.0009	pt
-0.0013	pt
-0.0018	vy
-0.0015	vy

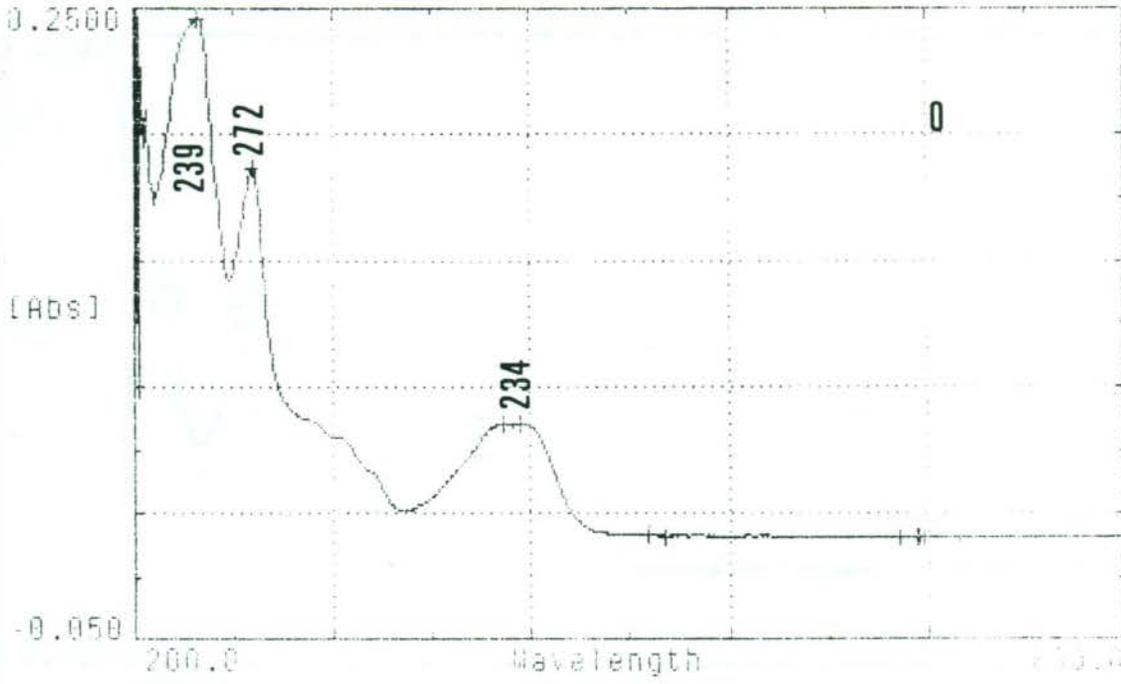


Fig. 35. Espectro UV-Visible del componente O en Metanol.

```

Scan
File Tabulate +-Scans Scatter Method SaveClear Print
Directory: VIEW Autoprint: [No ] Method name: A:\DEF4001
W: 200.0 nm Autosave: [Yes] Autosave name: [B:\304901]
L: 800.0 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
Scans: [No ] Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

```

```

1004
+-+ Exit Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

```

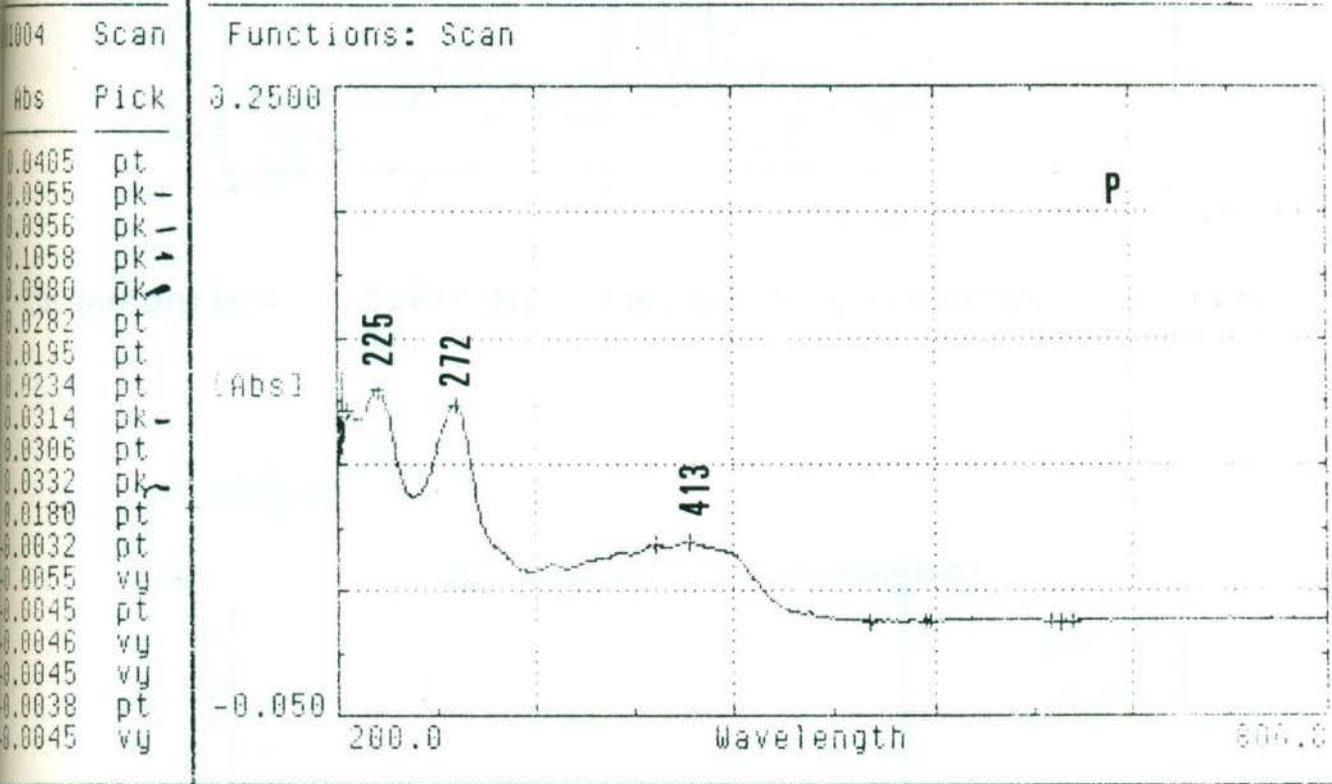
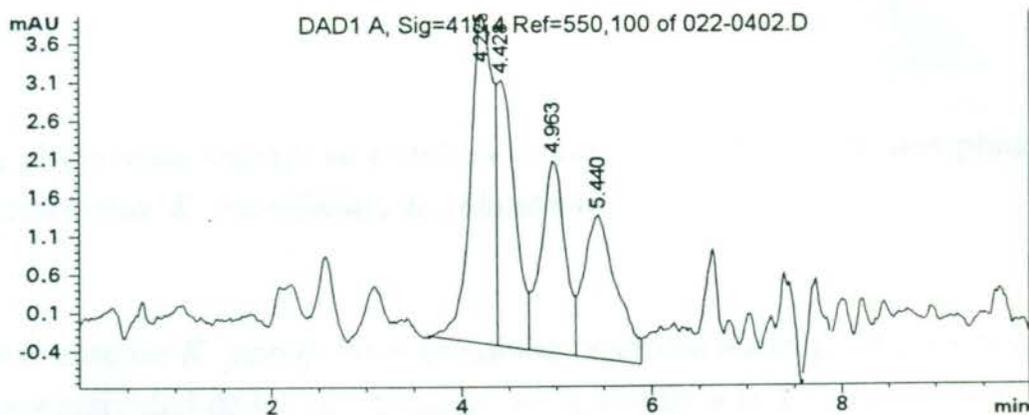
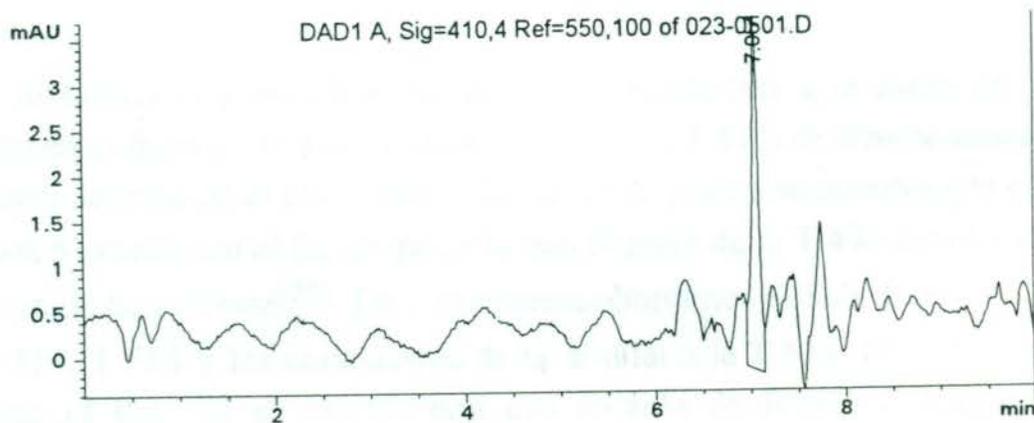


Fig. 36. Espectro UV-Visible del componente P en Etanol.



Cromatograma 5. CLAR del componente O; las condiciones son 1d.



Cromatograma 6. CLAR del componente P; las condiciones son 1d.

CAPITULO 4

DISCUSION

En el presente trabajo se estudian en forma independiente dos plantas del género *Karwinskia*: *K. parvifolia* y *K. johnstonii*.

En el caso de *K. parvifolia* el estudio se centró en aislar, purificar y conocer la estructura y actividad de los componentes de t_R similar a la T 514 encontrados en el extracto semipolar del fruto. En *K. johnstonii* nos abocamos a indicar los compuestos responsables de la elevada toxicidad del fruto, utilizando una purificación biodirigida mediante el bioensayo en larvas de *Artemia salina*.

4.1 *K. parvifolia*

El aislamiento y purificación de los componentes que están en menor proporción en el fruto de *K. parvifolia* (t_R similar a la T 514) se hizo de acuerdo a la metodología descrita en el Diagrama 1. En dicho diagrama se observa que el Ppt. I se lavó con Metanol con el fin de quitar la mayor parte de la T 496 debido a que es insoluble en dicho solvente⁽²⁵⁾. De esta manera obtuvimos el Sob. I enriquecido en Diast. T 514, T 514 y los compuestos de t_R similar a la T 514. Posteriormente se señala que el Ppt. III se extrajo con una mezcla de Benceno-Acetona 10:1 obteniendo así el Ppt. IV (**X** impuro) el cual se lavó con Acetona para obtener al compuesto **X** puro. Esta forma de purificar al compuesto **X** se debe a la insolubilidad del mismo en Acetona.

En la purificación del compuesto **Y**₁ fue necesario hacer dos CC gravitacionales y dos CC de baja presión para poder obtenerlo puro, pero en poca

cantidad debido a la pérdida de material durante los procesos cromatográficos. En la obtención del compuesto **C** se necesitaron tres CC Gravitacionales.

Es importante mencionar que se probaron diferentes formas de purificación para cada compuesto, siendo las descritas las que resultaron más eficientes. Además los tres compuestos se deben trabajar a temperaturas bajas, secarlos bien y quitarles por completo la acidez ya que se descomponen fácil y rápidamente, sobre todo el compuesto **Y₁**.

4.1.1 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS **X**, **Y₁** Y **C**

Para la determinación de la pureza de los compuestos **X** y **Y₁** resultaron muy importantes las características cromatográficas debido a que tienen valores de R_f muy similares en CCF de sílica con el solvente **1a**, de tal manera que a veces resultaba difícil decidir el grado de pureza sobre todo con el compuesto **Y₁**; con el uso de la CCF de fase reversa se pueden distinguir bien ya que el compuesto **X** presenta fluorescencia negra en la misma. Además en CLAR con las condiciones **1d** los tiempos de retención de los dos compuestos son muy cercanos, sin embargo, con las condiciones **2d** si se separan. Esto es importante para seguir el proceso de purificación porque como se ve en los cromatogramas 3 y 4, en las condiciones **1d** el orden de elución es T 514, **X** y **Y₁** y en las condiciones **2d** el orden es **X**, T 514 y **Y₁**.

En la determinación de la pureza del compuesto **C** se utilizó la CCF con las condiciones **2a** resultando el R_f y fluorescencia al igual que el punto de fusión coincidentes con un estándar de T 516. En CLAR con las condiciones **1d**, el compuesto **C** tiene el mismo tiempo de retención que la T 514, pero eso no representa problemas ya que durante el proceso de purificación (Diagrama 1) se separan por medio de CC Flash en sílica quedando el compuesto **C** en la F2 y la T

514 en las Fracciones 3 y 4. Además con las condiciones **2d** en CLAR los tiempos de retención son diferentes (Cromatogramas 3 y 4).

4.1.2 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO X

Debido a los datos de solubilidad del compuesto **X**, se escogió el Etanol como solvente para el espectro UV - Visible (fig. 9); presenta máximos de absorción a 230, 272 y 429 nm. La forma del espectro y los máximos de absorción son muy similares a los encontrados en los compuestos de tipo antracénico anteriormente aislados^(12, 26 y 27). Además en el espectro realizado en medio alcalino se observó un desplazamiento batocrómico lo cual indica la presencia de grupo fenol en la molécula.

El espectro de masas (fig. 10) proporciona un ión molecular de 514 y las pérdidas características de agua en la molécula con los iones 496 y 478. Se observa también el ión 239 correspondiente al monómero producto de la fragmentación del dímero deshidratado. La fórmula molecular propuesta es $C_{30}H_{26}O_8$.

En el espectro de RMN¹³C (fig. 11) encontramos solo 15 señales de carbono y corresponden a la mitad de carbonos en la fórmula molecular propuesta, lo que indica una molécula simétrica. El espectro revela la presencia de un grupo carbonilo a 206 ppm (C **1**), diez carbonos aromáticos entre 105 y 170 ppm y cuatro carbonos alifáticos por debajo de 70 ppm. Los carbonos **8** (153 ppm) y **9** (164 ppm) son los más desplazados de los aromáticos por la unión directa con el oxhidrilo fenólico. El carbono **3** (69.6 ppm) es el más desplazado de los no aromáticos debido a la unión directa con el alcohol terciario. El carbono **2** está más desplazado que el carbono **4** por la influencia del grupo carbonilo. El grupo metilo aparece a 28.9 ppm debido a la cercanía del grupo alcohol. Las asignaciones se hicieron de acuerdo a cálculos basados en tablas⁽³⁹⁾ y por comparación con otros espectros de antracenas

diméricas previamente analizadas^(26 y 27). Por medio del espectro DEPT (fig. 12) asignamos los metilos (1), metilenos (2), metinos (3) y carbonos cuaternarios (9).

En el espectro de RMN¹H (fig. 13) encontramos once señales de hidrógeno correspondientes a la mitad de las señales esperadas de acuerdo al número de hidrógenos en la fórmula molecular propuesta y cada señal integra para doble número de hidrógeno, lo que nos confirma la simetría de la molécula. Los hidrógenos **e1** y **e2** están muy desplazados en éste tipo de moléculas (16 y 10 ppm) a diferencia de los grupos fenólicos normales. El hidrógeno **e1** se encuentra más desplazado que el **e2** debido a que es fuertemente atraído por el oxígeno del grupo carbonilo a través de unión puente de hidrógeno. Los hidrógenos **a**, **b1** y **b2** son aromáticos (fig. 14), pero **b1** y **b2** forman parte del mismo anillo y se acoplan entre sí resultando un doblete para cada uno a 7.2 y 7.5 ppm respectivamente ($J = 8$ Hz). El hidrógeno **a** presenta un singulete a 7.1 ppm. La señal que se observa a 5 ppm es debida al alcohol (hidrógeno **d**). Los hidrógenos **f** a pesar de que están en el mismo carbono, dan un doblete cada uno porque son hidrógenos diastereotópicos ($J = 17$ Hz). Lo mismo sucede con los hidrógenos **g** ($J = 16$ Hz). Las asignaciones de los dobletes de **f** y **g** se hicieron por medio de los acoplamientos de las señales (fig. 15). La señal del metilo aparece a 1.3 ppm como singulete.

Con el espectro HETCOR (Fig. 16, 17 y 18) se lograron corroborar las asignaciones hechas en los espectros anteriores. Es decir, se observan las correlaciones del **Ha-C10**, **Hb1-C5**, **Hb2-C6**, **Hc-CMe**, **Hf-C2** y **Hg-C4**.

Cabe aclarar que ya se había aislado un compuesto con la misma estructura planar que el compuesto **X** a partir de *K. humboldtiana*; sin embargo las características cromatográficas y de solubilidad, hacen pensar que se trata de un par de isómeros y no de moléculas idénticas.

4.1.3 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO Y₁

El espectro UV-Visible (fig. 20) se hizo en Metanol y presenta máximos de absorción a 227, 270, 314 y 433 pmm. Tal y como esperábamos para la estructura fenólica propuesta, se observó también un desplazamiento batocrómico en medio alcalino.

El espectro de Masas (fig. 21) se hizo utilizando varias técnicas como Impacto Electrónico, Ionización Química y FAB con diferentes matrices, pero la que resultó mejor fue la Ionización FAB con matriz de glicerol, dándonos un ión molecular de 514. Se observan también pérdidas de agua y la señal del monómero producto de la fragmentación del dímero deshidratado. La fórmula molecular propuesta es C₃₀H₂₆O₈, al igual que para la T 514 o peroxisomicina A1, Diast. T 514 o peroxisomicina A2 y el compuesto X.

RMN¹H (fig. 22). Se observan cuatro señales muy desplazadas correspondientes a los oxhidrilos fenólicos. Los hidrógenos de los OH de los carbonos **9** y **9'** (16.1 y 16.4 ppm) son los más desplazados por la atracción con el grupo carbonilo, mientras que los OH de los carbonos **8** y **8'** se encuentran a 10.0 y 10.1 ppm respectivamente. Se observan las señales de los hidrógenos aromáticos entre 6.5 y 7.5 ppm. Los hidrógenos **5**, **6'** y **6** se encuentran entre 7.4 y 7.3 ppm, son señales muy confusas y poco distinguibles pero, se pudieron asignar con el espectro HMQC (fig. 23). El hidrógeno **10** aparece como singulete a 7.2 ppm y los hidrógenos **7'** y **5'** se observan como dobletes cada uno a 6.8 y 6.7 ppm (J= 8 Hz). Los hidrógenos alifáticos **2**, **2'**, **4** y **4'** se observan entre 2.5 y 3.5 ppm. Estos hidrógenos son diasterotópicos, por lo que cada hidrógeno aparece como doblete. Los hidrógenos del carbono **4** son los más desapantallados, lo cual hace que aparezcan más desplazados que los otros. En cambio los hidrógenos del carbono **4'** al ser lo más apantallados aparecen menos desplazados. Las señales de los alcoholes se observan a 1.95 y 1.6 ppm. Los metilos **3** y **3'** se observan a 1.5 y 1.3 ppm. Las

asignaciones se hicieron en base a cálculos y por comparación con los espectros de la T 514 y del Diast T 514 los cuales son casi idénticos al del Y_1 (Apéndice).

El espectro HMQC (fig. 23) nos permitió comprobar algunas asignaciones hechas sobre todo en los carbonos $7'$ (107.4 ppm), $5'$ (111.6), 10 (114.6), 5 (115), $6'$ (129.4) y 6 (131.6). Esta modalidad de doble dimensión es una correlación indirecta carbono-hidrógeno, mucho más sensible que el HETCOR, por lo que resultó muy útil ya que el material puro obtenido fue muy escaso y no se pudo hacer el espectro de RMN¹³C.

El compuesto Y_1 resultó otro diasteroisómero de la T 514 que no ha sido descrito en la literatura y podría ser llamado peroxisomicina A3.

4.1.4 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO C

Se observa en el espectro UV-Visible (fig. 25) el mismo tipo de cromóforos observados en los compuestos antracenónicos. Los máximos de absorción, aparecen a 232, 272 y 436 nm.

En el espectro de masas (fig. 26) observamos el ión molecular 516. El espectro se hizo por ionización FAB utilizando como matriz el alcohol 3-Nitrobencílico. Se observa un pico de m/e 501 debido a la pérdida de metilo. La fórmula molecular propuesta es $C_{30}H_{28}O_8$.

El espectro RMN¹H (fig. 27) se hizo en un aparato Varian de 400 MHz y coincide con el espectro de la T 516 publicado por Dreyer en 1975⁽¹²⁾. Las señales más desplazadas son las de los oxhidrilos fenólicos, como la señal del hidrógeno 9 a 15.0 ppm. Los OH fenólicos 8 y $1'$ se encuentran a 9.6 y 10.0 ppm. Estas

posiciones se asignaron así basándonos en los datos obtenidos por Dreyer que colocó el grupo metoxilo en la posición **8'** debido a datos de espectros del éter monometilo de taracrisona. Sin embargo nosotros observamos que el metilo puede estar en la posición **9'** por cálculos, pero aún no encontramos datos que confirmen una u otra posición. Los hidrógenos aromáticos se encuentran entre 6 y 8 ppm. Observamos las señales del hidrógeno **6** y del hidrógeno **5** como dobletes cada uno, a 7.44 y 7.41 ppm y la señal del hidrógeno **10** como singulete a 7.2 ppm. Los hidrógenos **5'** y **7'** se encuentran a 6.3 y 6.5 ppm siendo el hidrógeno **5'** el más apantallado. Las señales observadas a 3.6 y 4.1 ppm como singuletes son debidos a los metoxilos **6'** y **8'** respectivamente. Los metilos unidos a los carbonos **3**, **3'** y carbonilo de **2'** se encuentran a 1.6, 2.1 y 2.7 ppm, siendo el último más desplazado por la unión directa con el carbonilo.

En el espectro de RMN¹³C (fig.28) se observan las señales de los carbonilos a 203 y 207 ppm. Las señales de los 20 carbonos aromáticos se observan entre las 90 y 170 ppm y las señales de los carbonos alifáticos entre los 15 y 75 ppm. Los carbonos unidos a hidrógeno fueron determinados con ayuda del espectro DEPT (fig. 29) y asignados con el espectro HETCOR (fig. 30). Todos los demás carbonos se asignaron por cálculos.

Por todos los datos cromatográficos y espectroscópicos descritos se puede decir que el compuesto **C** es la T 516 aislada previamente de *K. humboldtiana* por Dreyer y cols. en 1975.

4.1.5 BIOENSAYO DE LETALIDAD EN LARVAS DE *Artemia salina*

El ensayo en larvas de *Artemia salina* es un bioensayo preliminar para detectar toxicidad de productos naturales en una forma rápida y simple y así mismo guiar el fraccionamiento de extractos de plantas con cierta actividad (36, 37 y 40). En el caso de sustancias no polares o extractos insolubles en agua es conveniente contar

las larvas sobrevivientes a las 24 horas de exposición con lo que resulta una medida crónica como la DL_{50} , en cambio para sustancias polares se recomienda contar a las 6 horas de exposición obteniendo así la concentración letal media (CL_{50})⁽⁴⁰⁾.

En *K. parvifolia* utilizamos el ensayo para darnos una idea de la actividad de los compuestos aislados y se determinó la DL_{50} por ser no polares. Según los resultados obtenidos, los compuestos **X** y **Y₁** no son activos a las dosis probadas (hasta 200 ppm.) y el compuesto **C** presentó una actividad muy elevada (4.49 ppm.). El ensayo se hizo cuatro veces para cada compuesto. Además se envió una muestra de cada compuesto y de la T 514 al Instituto de Química de la UNAM para que se evaluaran con el mismo ensayo; los resultados obtenidos corroboraron los datos presentados en esta tesis. La T 514 presentó una actividad de 105.6 ppm.

Es importante señalar que en el trabajo realizado por Piñeyro en 1994⁽²⁵⁾, se reportó una citotoxicidad selectiva de la T 514 sobre células de origen neoplásico y células de origen benigno. Así se encontró para el Hepatoma 3B una DL_{50} de 7.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para las células de Chang (benignas) la DL_{50} fue de 113.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Si comparamos esto con el valor obtenido de 105.6 ppm en el ensayo de larvas de *Artemia salina*, podemos concluir que en nuestro caso existe una correlación entre la toxicidad celular y la toxicidad que presenta este ensayo.

4.1.6 GRADO DE INHIBICION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LA CATALASA.

Se hizo la determinación del porcentaje de la actividad de la catalasa, como referencia para calcular posteriormente el grado de inhibición que producen los compuestos a probar y la CI_{50} de cada uno. La actividad de la catalasa inicial se expresa en U/mL y eso corresponde al 100% de actividad. Una vez que se obtiene este dato, se hace la determinación del grado de inhibición producido por efecto de cada compuesto a la concentración en la cual la peroxisomicina A1 o T 514 produce

alrededor del 50% de inhibición en la enzima (3.9 μM). Esto se hace con el fin de tener una idea rápida del grado de inhibición de la enzima producido por cada compuesto y posteriormente decidir las concentraciones a utilizar en la determinación de la CI_{50} .

El intervalo de concentraciones utilizadas en la determinación de la CI_{50} , se escogió, como antes se menciona, en base al resultado obtenido en el ensayo anterior. Cada medición se hizo por triplicado con el fin de obtener un promedio del porcentaje de actividad. Tal y como se menciona en un trabajo anterior⁽³⁵⁾ se transformó matemáticamente porcentaje de actividad en logaritmo para linearizar la función.

En el caso del compuesto **C** se utilizaron sólo cuatro concentraciones debido a que se presentaron problemas de interferencia en las lecturas de las concentraciones elevadas de tal forma que sólo se pudo leer hasta 23.256 μM .

Con el compuesto **X** se analizaron cinco concentraciones, pero no se pudieron obtener buenos datos a concentraciones mayores de 15.564 μM debido también a interferencias en las lecturas. Se hizo un análisis estadístico de regresión con el método de los mínimos cuadrados para obtener la mejor recta y con la ecuación de cada recta se calculó la CI_{50} para cada compuesto.

Con los datos obtenidos para cada compuesto observamos que se cumple tal y como señalamos anteriormente la relación que hay entre estructura y porcentaje de inhibición (Tabla 6). Es decir, en el caso del compuesto **Y₁** el resultado es similar a los resultados obtenidos con la T 514, Diasteroisómero de la T 514 y Flegmacinas 1 y 2, ya que éstos cuatro compuestos son muy parecidos estructuralmente al **Y₁**. El compuesto **X** presenta diferencia en la unión de los monómeros antracénicos (7, 7' en lugar de unión 7, 10) con respecto a los compuestos antes mencionados por lo

Tabla 6. CONCENTRACION DE LOS COMPUESTOS X, Y₁ Y C QUE PRODUCE EL 50% DE INHIBICION EN LA ACTIVIDAD DE CATALASA.

COMPUESTO	CONCENTRACION (μM)
T 514	3.34 ± 0.99
Diast. T 514	3.64 ± 1.10
Flegmacina 1	6.33 ± 2.79
Flegmacina 2	8.54 ± 3.23
Y ₁	9.07 ± 0.54
X	17.59 ± 1.00
T 544	40.08 ± 1.57
C	69.77 ± 1.99
T 496	99.50 ± 19.03
T 510	120.00 ± 10.44
Aminotriazol	10000.00

que observamos una inhibición menor, pero sigue siendo elevada por ser los dos monómeros de tipo antracénónico.

En cambio en el caso del compuesto **C** sólo uno de los monómeros es antracénónico y esto correlaciona bien con la poca inhibición presentada. Sin embargo el resultado no es tan bajo como con la T 496 o la T 510 los cuales tienen un monómero antraquinónico y otro antracénónico. Cabe señalar que dos antraquinonas (Crisofanol y Emodina) utilizadas como referencia no tuvieron prácticamente acción inhibitoria sobre la actividad de la enzima

4.2 *K. johnstonii*

El estudio en *K. johnstonii*, como antes se mencionó, se enfocó en tratar de aislar los compuestos responsables de la toxicidad mediante una separación biodirigida de los mismos con el ensayo en larvas de *Artemia salina*.

Los extractos etéreo y clorofórmico del fruto de esta planta se evaluaron con el ensayo y el único que presentó actividad fue el extracto clorofórmico, de tal forma que solo ese extracto se fraccionó por medio de CC Flash en sílica, obteniéndose así tres fracciones principales denominadas según el Rf en CCF de sílica en el solvente **2a** como fracción de Rf menor, Rf intermedio y Rf mayor. De las tres fracciones únicamente la de Rf intermedio presentó actividad en el ensayo en larvas, por lo que sólo esa fracción se sometió a separación en CC Gravitacional. Las fracciones de Rf menor y mayor, aparte de ser inactivas en el ensayo, se obtienen en muy poca cantidad (160 y 200 mg respectivamente) por lo que no se fraccionaron.

A partir de la fracción de Rf intermedio se obtuvieron los componentes **O** y **P**. Estos componentes mostraron una sola mancha cada uno en CCF de sílica con

diferentes sistemas de eluentes y un solo pico en CLAR en condiciones diferentes a las **1d** y **2d**. En el espectro UV-Visible de ambos componentes se observan máximos en las zonas donde absorben en general los compuestos de tipo antracenónico. El punto de fusión del componente **P** tiene el mismo valor y coincide con el del estándar de la T 496. En cambio, el componente **O** a pesar de tener las mismas características cromatográficas que el estándar de la T 544, tiene un punto de fusión diferente. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que se trataran de distintos compuestos y en buscar nuevas condiciones de análisis cromatográfico para aclarar esta interrogante.

Así se encontró en CLAR que con las condiciones **1d**, el componente **O** muestra cuatro picos entre los 4 y 5.5 minutos (Cromatograma 5). Cabe aclarar que en el análisis por CLAR la T 544 aislada originalmente por Dreyer de *K. humboldtiana* resultó tener cuatro picos con los mismos tiempos de retención, aunque en distinta proporción que el componente **O**. Podemos suponer, por las características cromatográficas y espectroscópicas, que se trata de una mezcla de isómeros. Para un futuro trabajo queda el separar e identificar cada uno de ellos. En estas mismas condiciones (**1d**), tanto el componente **P** como la T 496, muestran un solo pico a los 7.05 minutos (Cromatograma 6).

Una vez analizados los componentes **O** y **P** se evaluaron en el ensayo de letalidad en larvas de camarón y los dos presentaron actividad elevada, sobre todo el componente **O**; podemos deducir entonces que dichos compuestos son los responsables de la toxicidad del fruto de esta planta.

Nota: Durante el desarrollo de esta tesis, tuvimos informes de una intoxicación masiva en Morelia debido a la ingesta del fruto de *K. johnstonii*⁽⁴¹⁾, lo cual corrobora lo aquí expresado.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se aislaron, purificaron y caracterizaron tres compuestos antracénicos a partir del fruto de *K. parvifolia*.

Uno de los compuestos (Y_1) no había sido descrito en la literatura y es un diastereoisómero de la T 514. El compuesto **X** es un isómero de posición de la T 514, del cual ya se había descrito un isómero con la misma estructura planar a partir de la *K. humboldtiana*. El compuesto **C** es la T 516 aislada previamente por Dreyer en 1975 a partir del fruto de *K. humboldtiana*.

Los tres compuestos antracénicos aislados resultaron inhibidores de la catalasa. Con los resultados obtenidos se observó que se cumple la relación propuesta entre estructura antracénica y porcentaje de inhibición de la enzima.

La T 544 resultó ser una mezcla de probables isómeros. Tanto ellos como la T 496 son responsables de la toxicidad encontrada en el fruto de *K. johnstonii*.

El bioensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina* resultó una herramienta útil en el fraccionamiento biodirigido en *K. johnstonii*. En *K. parvifolia* se observó cierta correlación entre los resultados del ensayo y la actividad biológica de los compuestos aislados.

RECOMENDACIONES

APENDICE

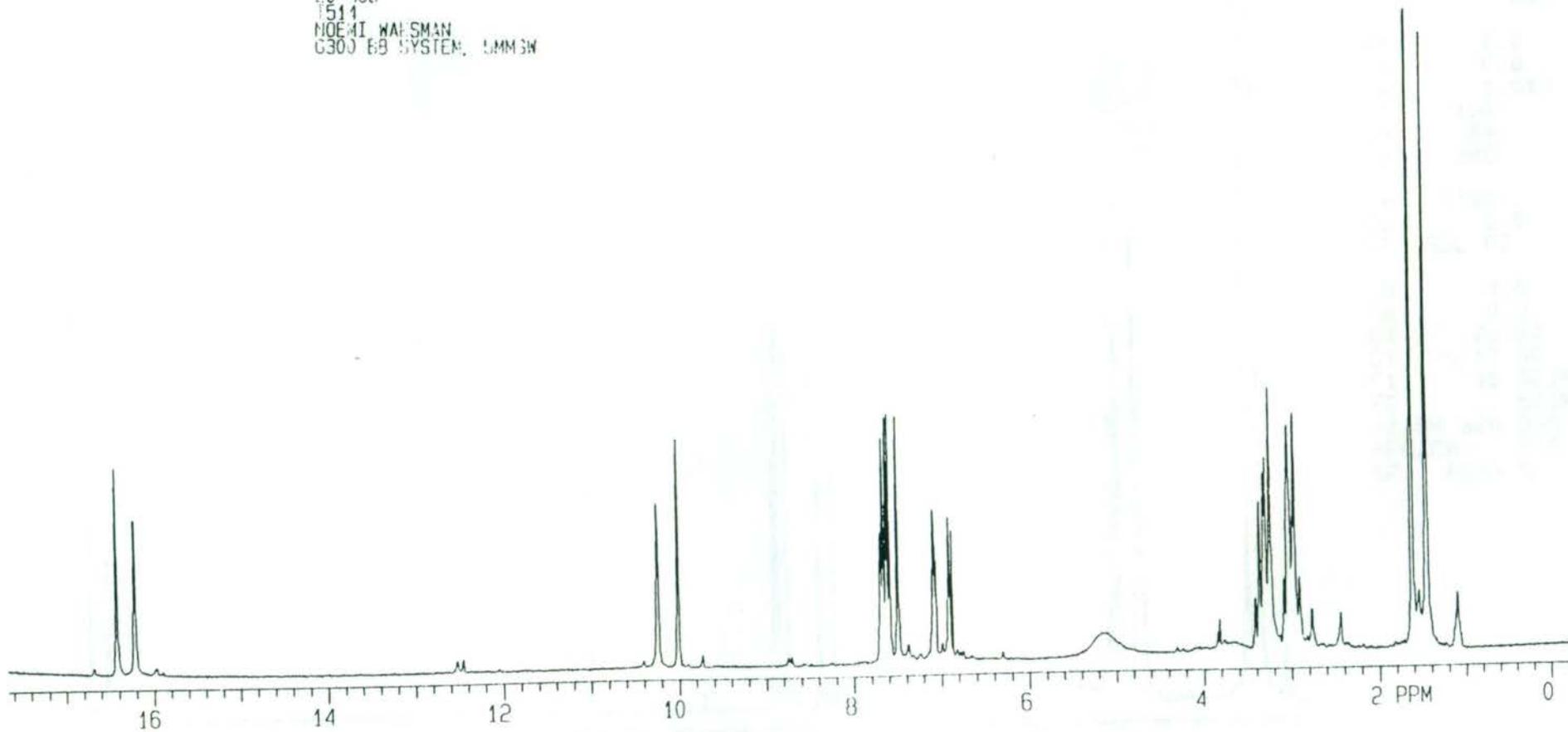
En un futuro resultará importante e interesante separar los isómeros de la T 544, así como elucidar las estructuras de los mismos.

Por otra parte será interesante también hacer más pruebas con el bioensayo en larvas de *Artemia salina* usando este tipo de compuestos para posteriormente decidir el grado de correlación entre el bioensayo y el cultivo celular.

APENDICE

20 MGS
1514
NOEMI WAFSMAN
G300 EB SYSTEM, UMMSW

88



Espectro de RMN¹H de la T 514.

DISAT T514 EN DMSO-D6



DV1H1205.001
DATE 5-12-89

HERTZ
6466.39
6383.20

3991.49
3898.59

2970.28
2962.10
2954.17
2946.15
2943.56
2937.36
2928.72
2891.71
2730.35
2722.61
2658.70
2650.38

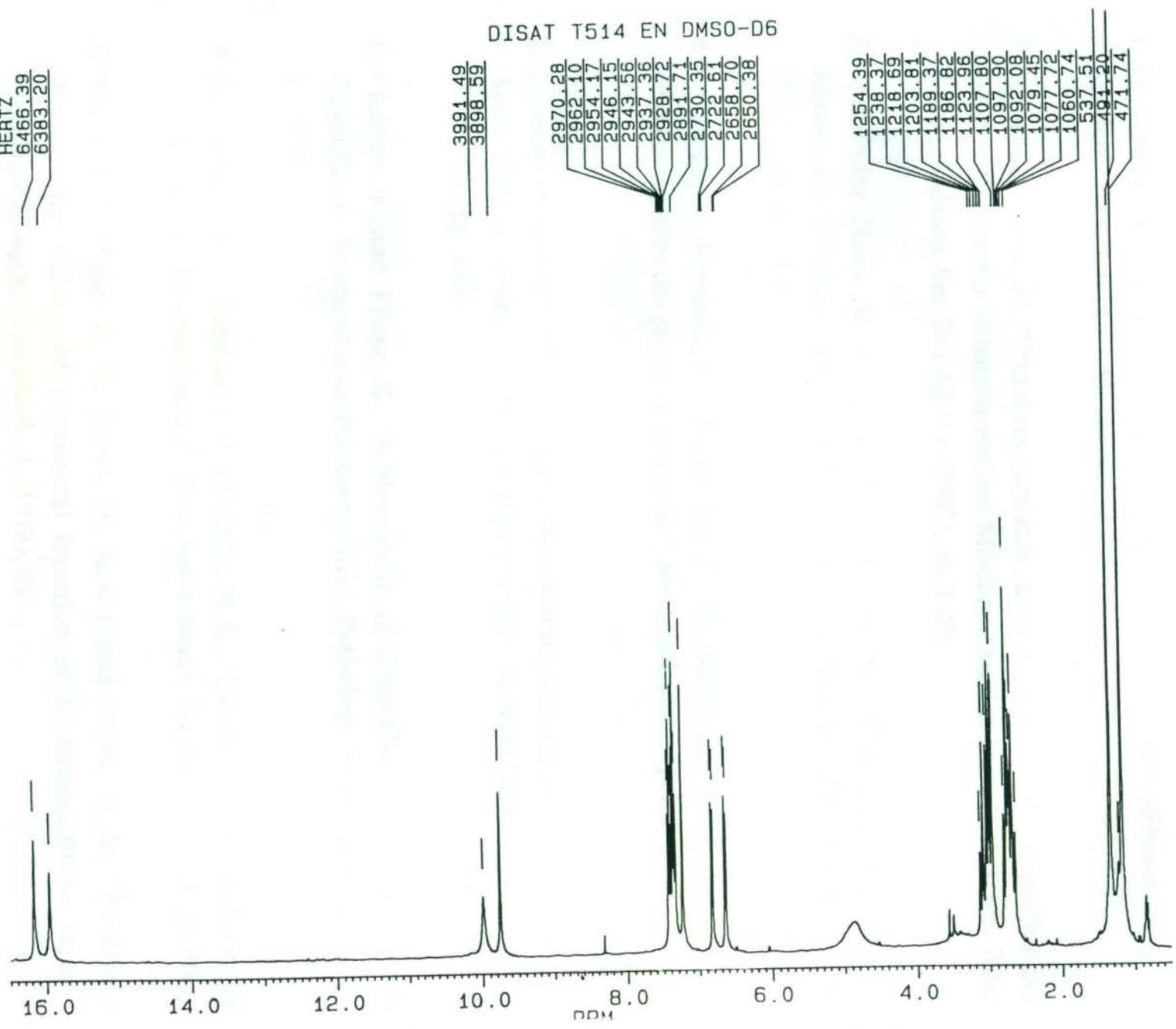
1254.39
1238.37
1218.69
1203.81
1189.37
1186.82
1123.96
1107.80
1097.90
1092.08
1079.45
1077.72
1060.74
537.51
491.20
471.74

SF 400.136
SY 133.0
O1 9438.582
SI 16384
TD 16384
SW 8064.516
HZ/PT .984

PW 8.0
RD 0.0
AQ 1.016
RG 100
NS 64
TE 298

FW 10100
O2 0.0
DP 63L P0

LB 0.0
GB 0.0
CX 20.00
CY 17.00
F1 16.501P
F2 .501P
HZ/CM 320.090
PPM/CM .800
SR 6289.53



Espectro de RMN¹H del Diast. T 514.

REFERENCIAS

1. Fernández, Nava R., "Tres especies nuevas de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México". **Acta botánica Mexicana**, 2, (1988), pp. 11-20.
2. Fernández Nava, R., "Nombres comunes, usos y distribución Geográfica del Género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México". **Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México**, Ser. Bot. 63 (1), (1992), pp. 1-23.
3. Fernández Nava, R. y Waksman de Torres, N., "Una especie nueva de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de Tehuacan Puebla, México". **Phytologia**, 73 (6) (1992), pp. 435-438.
4. Waksman, N., Martínez, L. y Fernández, R., "Screening químico y toxicológico de otras especies del género *Karwinskia*". **Rev. Latinoam. Quim.**, 20, (1989), pp. 27.
5. Escobar, A. y Nieto, D., "Aspectos Neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental". **Gaceta Médica, México**, 95 (2), (1965), pp. 163.
6. Charlton, K. and Pierce, K., "A Neuropathy in Goats Caused by Experimental Coyotillo (*K. humboldtiana*) Poisoning (III)". **Pathology Veterinary**, 7, (1970), pp. 408.
7. Domínguez, X. A., Temblador, S. y Cedillo, M. E., "Estudio químico de la raíz de la Tullidora (*K. humboldtiana*)". **Rev. Latinoamer. Quím.**, 7, (1976), pp. 46.
8. Mitchell, J., Weller, R. O., Evans, H., Arai I. and Daves, D. Jr., "Buckthorn Neuropathy: Effects of Intraneural Injection of *K. humboldtiana* toxins". **Neuropath. Appl. Neurobiol.**, 4, (1978), 85.

9. Weller, R., Mitchell, J. and Daves, D. Jr., "Buckthorn (*K. humboldtiana*) toxins". In: **Experimental and Clinical Neurotoxicology**, Baltimore (Williams and Wilkins, Eds.)(1980), pp. 336.
10. Puertolas, M., Nava, O., Medina, H., López, F. y Oyervides, J., "Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*, informe de seis casos". **Rev. Méd. IMSS**. (México), 22, (1984), pp. 25.
11. Mitscher, L., Gollapudi, S., Oburn, D. and Drake, S., "Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethyl benzisocromans from *K. humboldtiana*". **Phytochemistry**, 24 (8), (1985), pp. 1681.
12. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D., "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". **J. Am. Chem. Soc.** 97, (1975), pp. 4985.
13. Domínguez, X. A. y Garza, L., "Chrisophanol and B-Amyrin in the fruits of *Karwinskia humboldtiana*". **Phytochemistry**, 11, (1972), pp. 1186.
14. Padrón, Puyou, "Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) en niños". **Gaceta Médica de México**, Tomo LXXXI, (1951), pp. 299 - 310.
15. Kim, H. L. and Camp, B. J., "Isolation of a neurotoxic substance from *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Rhamnaceae)". **Toxicon**, 10, (1972), p. 83 - 84.
16. Arai, I., Dreyer, D. L., Anderson, W. R. and Daves, D. Jr., "Neurotoxins of *Karwinskia humboldtiana*. Atropisomerism and Diastereomeric Oxidation Products". **J. Org. Chem.** 43, (1978), pp. 6.
17. Muñoz, E. J., Cueva, J. y Joseph Nathan, P., "Denervation caused by Tullidora (*K. humboldtiana*)". **Neuropathology and Applied Neurobiology**. 2, (1983), pp. 121 - 134.

18. Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N., "Extraction and Quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora)". **Toxicon** 25, (1987), pp. 565.
19. Bermúdez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. y Piñeyro, A., "Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog". **Toxicon** 30, (1992), pp. 1493.
20. Bermúdez, M. V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A., "Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)". **Toxicon**, 24, (1986), pp. 1091.
21. Bermúdez, María Victoria, Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UANL, Monterrey N. L., (1989).
22. Piñeyro López, Alfredo, Toxicidad selectiva "in vitro" de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UANL, Monterrey N. L., (1990).
23. Piñeyro, A., Mtz. de Villarreal, L. and González, R., "In vitro selective toxicity of toxin T 514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines". **Toxicology**, 92, (1994), pp. 217 - 227.
24. Pharm., **Chem. Abst.**, 116, 241923x, (1992).
25. Waksman, N., Torres, R., Salazar, M.L., Cenicerros, L. y Piñeyro, A., "Peroxisomicina: un producto de interés farmacológico. Avances en los métodos de producción". **XIX Simposium de Química de Productos Naturales**, ITESM, Abril, (1992).
26. Waksman, N. y Ramírez, R., "Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*". **Rev. Latinoamer. Quím.** 23/1 and 22/4, (1992), pp. 25 - 27.

27. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N., "Dymeric anthracenones from *Karwinskia* species". **Planta Médica**, 56, (1990), pp. 562.
28. Takahashi, S., Kitanaka, S., Takido, M., Sankawa, U. and Shibata, S., "Phlegmacins and anhydrophlegmacinquinones: Dymeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia torosa*". **Phytochemistry**, 16, (1977), pp. 999 - 1002.
29. Pharm., **Chem. Abst.**, 110, 82476, (1989).
30. Endo, M. y Naoki, H., "Antimicrobial and antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*". **Tetrahedron**, 36, (1980), pp.2449 - 2452.
31. Kitanaka, S. and Takido, M., "Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis*". **Chem. Pharm. Bull.**, 37 (2), (1989), pp. 511 - 512.
32. Kitanaka, S. and Takido, M., "Studies on the constituents of the roots of *Cassia torosa*. II. The structures of two dymeric tetrahydroanthracenes". **Chem. Pharm. Bull.**, 38 (5), (1990), pp. 1292 - 1294.
33. Garza, L., Hiseh, G., Acosta, D., Torres, O. and Piñeyro, A., "Toxicity assesment of toxins T 514 and T 544 of buckthorn (*K. humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures". **Toxicology**, 73, (1992), pp. 191 - 201.
34. Sepúlveda, J., Van Der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W. y Veenhuis, M., FEMS. "Estudios en peroxisomas de levaduras". **Microbiology Letters**, 91, (1992), pp. 207 - 212.
35. Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N., Piñeyro, L., "Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity". **Planta Médica**, (1995), en prensa.
36. Anderson, J. E., Goetz, C. M., Mc Laughlin, J. and Suffness, M., " A blind comparasion of simple bench - top bioassays and humor tumor cell cytotoxicities

- as tumor prescreens". **Phytochemical Analysis**. 2, (1991), pp. 107 - 111.
37. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnana, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D.E. and Mc Laughlin, J., "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". **Planta Médica**. 45, (1982), pp. 31 - 34.
38. Fernández Nava, R., El Género *karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) en México. Tesis de Maestría. I.P.N. Esc. Nac. de Ciencias Biológicas. México, (1988).
39. Eberhard, B. and Wolfgang, V., Carbon - 13 NMR Spectroscopy. 3a Edición. Republica Federal de Alemania; Editorial VCH, (1987).
40. Teng Wah Sam, "Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia Salina*" in **Bioactive Natural Products**. London: CRC Press, (1993), pp. 441 - 456.
41. Arellano, E., Mendoza, J. F. y Domínguez, F., "Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández: estudio de 12 pacientes". **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, 51 (2), (1994), pp. 105 - 112.