

# ESTUDIO FITOFARMACOLOGICO DE LA FRACCION LIPOSOLUBLE DE LAS FLORES DE LA SPILANTHES AMERICANA (MUTIS) PARTE I: ESTUDIO FITOQUIMICO

Luz Stella Ospina de Nigrinis \*  
Jorge Olarte Caro \*\*  
Enrique Nuñez Olarte \*\*\*

## Resumen:

Del extracto en éter de petróleo obtenido de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, utilizado en medicina popular para el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes, se aislaron e identificaron dos sustancias. Una de estas fue una isobutilamida, la cual presentó actividad anestésica local; para el compuesto aislado se propuso la estructura correspondiente a la N-isobutil-5-ino-8-eno-trans-amida; también se aisló un triterpeno pentacíclico, el acetato de taraxasterol. Para el estudio se utilizó la cromatografía en columna, en capa fina, espectroscopia al UV, IR, RMN y de masas.

## Summary

From the petroleum ether extract of the flowers of *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, a plant used in folk medicine for the treatment of mouth infections and some variety of herpes, N-isobutyl-5-ino-8-eno-trans amide, which showed local anesthetic activity, was isolated. In addition to the active substance, taraxasterol acetate, a pentacyclic triterpene was also isolated.

The isolation and identification of these compounds were made by means of column and thin layer chromatography, UV, IR, NMR and mass spectroscopy.

## I. INTRODUCCION.

Dentro de la rica y variada flora del trópico, en Colombia existen numerosas plantas, las cuales han sido usadas durante siglos con fines medicinales y lo son actualmente en la medicina popular. La familia de las compuestas es una de las más numerosas en cuanto a especies se refiere y su distribución climatológica es tan variada, que se pueden encontrar fácilmente a nivel del mar como también en las nieves de los páramos y entre la población campesina e indígena son muy apreciadas por su valor medicinal.

A la familia de las compuestas pertenece el género *Spilanthes*, y dentro de este género se encuentran numerosas especies como *Spilanthes americana* (Mutis); *S. ocymifolia*, *S. acmella*, *S. ciliata*, *S. uliginosa*, *S. urens*, *S. oleracea* y otras. En Colombia han sido identificadas varias de estas especies, dentro de una distribución geográfica bastante amplia.

En la obra "Flora Medicinal Colombiana" de García Barriga (1) se anotan las características, los sinónimos, las distribución y los usos de varias especies de *Spilanthes*. La especie objeto de este estudio la designa así: *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron Engl. Bot. Jahrb. 29: 42 1.900. Se conoce también como *Anthemis americana* Mut. ex L. y *Spilanthes mutisii* H K B.

Nombres comunes: "Chisacá" (Cundinamarca, Boyacá); "Yuyo quemado" o "Yuyo" (Caldas, Antioquia); "Botón de oro" (Valle del Cauca); "Quemadera" (Pamplona). Es una planta muy común, de amplia distribución en todos los climas del país y se desarrolla muy bien en los lugares húmedos.

De las diferentes especies de *Spilanthes* reconocidas en las distintas regiones de Colombia no se conoce ningún dato en relación a su composición química. Sin embargo, de algunas especies *Spilanthes* foráneas si se tiene conoci-

\* M.Sc. Profesora Asociada, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Dr. Farm. Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

\*\*\* M.D.; Q.F.; Profesor titular de Farmacología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Artículo tomado de: "Contribución al estudio fitofarmacológico de la *Spilanthes americana* (Mutis)" Tesis de Grado presentada por Luz Stella Ospina de Nigrinis para optar al título de M.Sc., Universidad Nacional de Colombia. La investigación fue subvencionada por el Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CINDEC) de la Universidad Nacional de Colombia.

miento y existen varias publicaciones acerca del posible principio activo más conocido de este género.

Martín Jacobson (2) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos presenta un estudio sobre las cabezuelas de las flores de varias especies de *Spilanthus*, y define el principio activo como una sustancia ardiente de uso medicinal. Parece ser que se obtuvo por primera vez a partir de *Spilanthus oleracea* Jacq. por E. Gerber, quién lo denominó Spilantol.

En los trabajos realizados hasta el momento por varios investigadores ha habido mucha discrepancia en los resultados obtenidos en cuanto a la estructura, configuración y propiedades físicas del Spilantol.

Asano y Kamatsu aislaron Spilantol puro de las cabezuelas de las flores de *Spilanthus acmella* Y lo describieron como un líquido ardiente amarillo de punto de ebullición 165°C. (1 mm) el cual corresponde a la fórmula  $C_{14}H_{25}NO$  y postularon la siguiente estructura alénica para el compuesto:



Los resultados de estudios posteriores de estos mismos investigadores los llevaron a proponer una nueva estructura para el Spilantol correspondiente a la N - isobutil - 4,6 - diecadienamida:



M. Jacobson (3) se refiere al Spilantol como a un isómero de la Pellitorina, amida aislada de las raíces de Pellitory y presentan un estudio sobre la síntesis y la estereoquímica de tres compuestos obtenidos.

L. Crombie en 1955, reexaminó el tema sobre la Pellitorina en cuanto a sus propiedades físicas y a su síntesis, e hizo un amplio estudio sobre la estereoquímica del compuesto. Concluyó respecto a los isómeros obtenidos que todos son líquidos a excepción de los que tienen la configuración trans (4).

Posteriormente M. Jacobson, propuso una nueva estructura para el compuesto aislado por Asano y Kamatsu; según Jacobson la estructura correcta es:



El grupo conjugado tiene configuración cis, trans o trans, cis y concluyó que la afinina, una isobutil amida aislada de las raíces de *Heliopsis longipes* es idéntica al Spilantol (5).

Otros investigadores como Torakichi Yoskioku (6), Crombie, Krasinski y Manzoor - i - Khuda (7) revisaron y ampliaron la información sobre las propiedades, síntesis y estereoquímica de la afinina y llegaron a la conclusión de que es idéntica al Spilantol aislado de varias especies de *Spilanthus*, para el cual propusieron varias estructuras.

M. Jacobson en 1956 presentó un estudio sobre las flores de diferentes especies de *Spilanthus*, incluyendo la *Spilanthus americana*, variedad Repens recolectada en Texas. Por fraccionamiento del extracto de estas flores obtuvo un aceite amarillo el cual no pudo ser cristalizado ni identificado como Spilantol (8).

Respecto a otros componentes de las flores del género *Spilanthus*, T. R. Seshadri y T.N.C. Vedantham (9), encontraron e identificaron en *Spilanthus acmella* acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina;  $\alpha$  y  $\beta$  amirina y sitosterol - $\alpha$ - $\beta$ -D-glucósido.

En la búsqueda de sustancias insecticidas de origen natural, el género *Spilanthus* ha sido investigado especialmente las flores de *Spilanthus acmella* y *Spilanthus oleracea*. Los resultados obtenidos demostraron que la isobutil amida denominada Spilantol presentó actividad larvica contra las moscas caseras (10). M. Jacobson comprobó la actividad de este principio activo contra la larva del *Anopheles* y el mosquito *Culex pipiens*. (11)

La estereoquímica de este compuesto es fundamental para la actividad insecticida de la amida. Al respecto, hay varias informaciones de diferentes investigadores sobre la relación entre la isomería cis-trans; trans-trans y cis-cis del Spilantol y su actividad insecticida (12) (13) (14).

La sustancia obtenida del fraccionamiento del extracto de las flores de la *Spilanthus americana*, variedad Repens, la cual no pudo ser identificada como Spilantol (15) presentó una actividad insecticida muy débil y no causó mortalidad en las moscas caseras. Además de la propiedad insecticida del Spilantol, también es reconocida su actividad sialagoga, y en casi todas las investigaciones se informa sobre la propiedad de adormecer la lengua y las mucosas bucales (16).

Por su acción insecticida y su toxicidad relativamente baja para animales de sangre caliente, se han sintetizado varias isobutilamidas de ácidos grasos insaturados (17) (18) (19).

En el caso particular del Spilantol, además de ser empleado como insecticida hay información sobre su uso en la elaboración de dentífricos en una proporción del 0.001% (20) por sus propiedades, respecto a la mucosa bucal.

En cuanto a los usos dados al extracto completo o a las infusiones obtenidas de las flores de las diferentes especies de *Spilanthes*, en nuestro medio, estos son muy variados dentro de la medicina popular, y datan de muchos años atrás. (21) (22).

García Barriga en su obra "Flora Medicinal de Colombia" se refiere al uso de la decocción o zumo de la planta para el tratamiento de enfermedades hepáticas, especialmente en la hipertrofia y algunos estados biliares, igualmente anota acerca del uso de la decocción de la planta para corregir manchas en la piel.

Las flores tienen propiedades "odontálgicas", indicando que al colocar un pedacito de la inflorescencia en la cavidad de la pieza afectada, desaparece el dolor. Los enjuagues bucales con la decocción de las inflorescencias, o el masticarlas directamente, cura las afecciones de la boca especialmente las aftas que con cierta regularidad, afectan la mucosa bucal (23).

El extracto obtenido a partir de las flores de *Spilanthes americana*, ha presentado resultados favorables en el tratamiento de algunas micosis (pié de atleta) y de virus como en el caso del *Herpes simplex* y del *Herpes zoster* (comunicaciones personales).

Una información preliminar sobre el estudio clínico del extracto de *Spilanthes americana* en el tratamiento de aftas y del *Herpes simplex* fué publicado por M. Calle y J. Prada Caballero (24). Dice el informe que en el caso del *Herpes simplex* se nota una disminución marcada y en corto tiempo (una hora aproximadamente) del dolor, prurito y ardor. Desaparece el halo eritematoso dentro de las cuarenta y ocho horas del tratamiento, la piel recupera su temperatura normal y las vesículas cesan de crecer; se tornan flácidas y toman un color marrón propio de la escara, lo cual empieza a notarse a las 12 horas y es muy nítido a las 24. A los tres días cae la escara y aparece en epitelio nuevo de color rosado. La frecuencia de la aparición de las lesiones en la mayoría de los casos disminuye, según las observaciones realizadas por los autores del trabajo.

En el caso del tratamiento de las aftas bucales, se nota una disminución marcada del dolor, el cual una vez desaparecida la acción del extracto, no recupera su nivel inicial; el eritema disminuye en las primeras 24 horas, a las 36 horas la úlcera

pierde su zona necrótica y la tolerancia a estímulos mecánicos aumenta. Se observa que el período evolutivo se reduce aproximadamente al 50% .

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Material Botánico

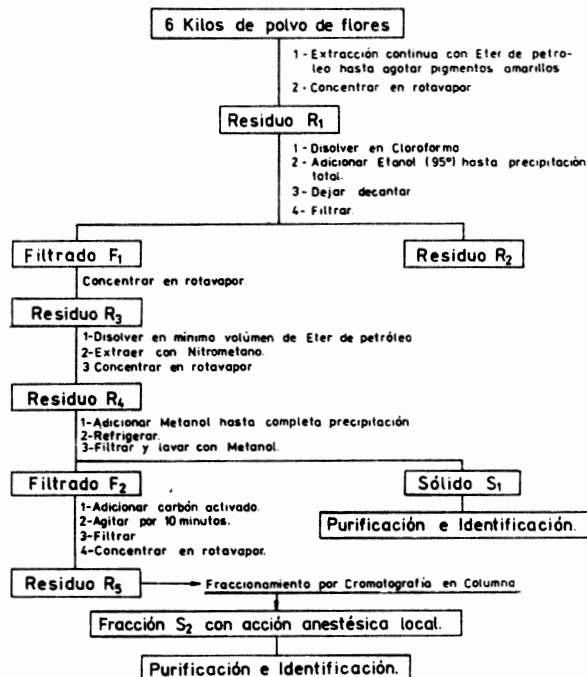
Para la investigación fitoquímica se emplearon las flores de las plantas; debido a que tanto las informaciones sobre las propiedades biológicas, como los estudios clínicos realizados por Calle A, y Prada C. hacen referencia, al extracto obtenido a partir de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) hieron. La recolección del material se llevó a cabo durante los meses de Mayo y Junio en los alrededores de la sabana de Bogotá, Departamento de Cundinamarca. Un ejemplar de la planta se encuentra en el Herbario Nacional Colombiano, del Instituto de Ciencias Naturales bajo el número 202580.

### Preparación del Material Botánico

El material botánico recolectado (flores) fué depositado en recipientes abiertos, con buena aireación, hasta el momento del secado, el cual se efectuó a temperatura ambiente. Después del secado, se molió, se tamizó para obtener un tamaño de partícula uniforme (No. 30) y se guardó en recipientes oscuros bien tapados hasta su utilización.

FIG. 1

#### EXTRACCION AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE SUSTANCIAS LIPOSOLUBLES.



## 2. *Extracción, aislamiento y purificación de sustancias liposolubles.*

2.a. *Extracción:* Para obtener la fracción liposoluble a la cual se le atribuyen efectos biológicos se empleó el método de extracción continua en Soxhlet a una temperatura de 40°C. (Fig. 1). Se utilizaron 6 kilos de flores pulverizadas y como solvente se empleó éter de petróleo (40-60°). Se consideró finalizada la extracción cuando el solvente ya no extrajo más pigmentos amarillos. La duración del proceso fué de aproximadamente 72 horas. El extracto etéreo así obtenido, se concentró a presión reducida hasta agotamiento total del solvente obteniéndose el residuo R<sub>1</sub> el cual se guardó en recipientes oscuros, bien tapados y a baja temperatura, hasta su utilización para el fraccionamiento. Rendimiento obtenido: 7.3%.

### 2.b. *Fraccionamiento del Residuo R<sub>1</sub>*

#### *Extracción con solventes:*

220 gr del Residuo R<sub>1</sub> se disolvieron en 100 ml. de cloroformo, y luego se adicionó etanol de 95° hasta finalizar la precipitación de sustancias poco solubles (pigmentos, ceras, esteroides); se dejó decantar durante una noche y se filtró obteniéndose un Residuo R<sub>2</sub> (60 gr.) y un Filtrado F<sub>1</sub>. Este filtrado se concentró a presión reducida hasta agotamiento total del solvente; se obtuvo el residuo R<sub>3</sub> (175 g). El residuo R<sub>3</sub> se disolvió en el mínimo volumen de éter de petróleo y se procedió a extraer con nitrometano. El proceso de extracción se repitió hasta cuando la capa de nitrometano presentó turbidez; se consideró esta indicación como el punto final de la extracción. Los extractos en nitrometano se reunieron y se concentraron a presión reducida hasta agotar completamente el solvente; se obtuvo el residuo R<sub>4</sub> (40 g).

El residuo R<sub>4</sub> se disolvió en metanol; al seguir adicionando metanol empezó a formarse un precipitado, se adicionó más metanol hasta finalizar la precipitación. El recipiente se guardó en el refrigerador durante cuatro días al cabo de los cuales, se pudo apreciar la presencia de un sólido cristalino blanco. Se filtró a presión reducida, obteniéndose el sólido cristalino S<sub>1</sub> y el filtrado F<sub>2</sub>; el sólido S<sub>1</sub> se lavó con metanol frío, se secó sobre CaCl<sub>2</sub>, obteniéndose 335 mg. del compuesto. Al filtrado F<sub>2</sub> se le adicionó carbón activado en una proporción del 1%, se agitó durante diez minutos, se filtró y se concentró a presión reducida. Se obtuvo el residuo R<sub>5</sub> (30 gr). Cuando fué necesario interrumpir el proceso en alguna de sus partes, el residuo o el filtrado correspondiente fué guardado en recipiente bien tapado y a baja temperatura. El proceso descrito anteriormente puede observarse en la figura 1.

A las fracciones obtenidas, las cuales se denominaron residuos R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, Sólido cristalino S<sub>1</sub> y residuo R<sub>5</sub>, como al extracto completo E, se les hicieron tres clases de ensayos preliminares con el objeto de ubicar la fracción en la cual se encontrara el principio con acción anestésica local. Las pruebas escogidas fueron: acción anestésica local en mucosa; presencia de nitrógeno por el método de la fusión con sodio (25) y cromatografía en capa fina para detectar la presencia de sustancias nitrogenadas. El sistema utilizado en el ensayo cromatográfico fué: adsorbente: sílica Gel HF 254 (espesor 0.250 mm); eluente: cloroformo; reveladores: luz ultravioleta 254 nm; y R. de Dragendorff (26).

### 2.c. *Purificación e identificación del sólido cristalino S<sub>1</sub>*

Aunque la sustancia sólida cristalina denominada S<sub>1</sub> no respondió a ninguna de las tres pruebas escogidas con el objeto de ubicar la posible sustancia con acción anestésica local, se procedió a purificarla y a identificarla. La sustancia fué purificada por cristalización y recristalización para lo cual el sólido S<sub>1</sub> se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo; se trató con carbón activado y se filtró; a la solución clorofórmica se le aumentó la polaridad por adición de etanol, hasta cuando se dejó de observar la formación de precipitado. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante doce horas, al cabo de las cuales los cristales formados fueron filtrados y lavados con etanol frío. Se dejaron secar y se repitió el proceso dos veces para obtener finalmente los cristales en forma de escamas brillantes (250 mg).

Para verificar la pureza del compuesto se utilizó la cromatografía en capa fina, empleando el sistema: adsorbente: Sílica Gel G (espesor 0.250 mm); solventes: cloroformo (A); hexano: benceno 2:1 (B) y hexano: benceno 4:1 (C); reveladores: vapores de yodo (a), vainillina al 3% en etanol (b), y ácido acético-ácido sulfúrico-agua 80:4:16 (c). Las placas reveladas con (b) y con (c) fueron calentadas a 110°C hasta aparición de color.

Se observó la presencia de una sola mancha cuyo color varió de acuerdo al revelador empleado: Con (a) se observó una mancha amarilla, con (b) se observó una mancha rosada fuerte que pasó a morado, con (c) inicialmente se observó una tonalidad naranja fuerte la cual después de dos horas pasó a morado.

#### *Identificación del compuesto S<sub>1</sub>*

En vista de los resultados obtenidos con el sistema cromatográfico descrito, se hizo una variación en cuanto al adsorbente, por lo cual se repitió el proceso empleando Sílica Gel G

impregnada con  $\text{AgNO}_3$  al 10%. También se utilizaron dos reveladores más: tricloruro de antimonio al 20% en cloroformo (d) y pentacloruro de antimonio en cloroformo (20%) (e). Las demás condiciones fueron iguales.

Una vez comprobada la pureza cromatográfica del compuesto  $S_1$ , se le determinaron las siguientes propiedades físicas: solubilidad en éter, cloroformo, n-hexano, etanol y metanol; punto de fusión: se utilizó el fusiómetro Buchi SMP-20; rotación específica: se empleó una solución al 2% en cloroformo y se determinó en el polarímetro Carl Zeiss tipo 32-G580.

#### *Estudio espectroscópico:*

**Espectro ultravioleta:** se determinó en  $\text{CHCl}_3$  en un espectrofotómetro Beckman modelo 25; **espectro al infrarrojo:** se determinó en pastilla de bromuro de potasio (concentración 1%) en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 700; **espectro de resonancia magnética nuclear:** se determinó en  $\text{CDCl}_3$  en un espectrofotómetro para resonancia magnética nuclear Perkin Elmer modelo R<sub>12</sub>; **espectro de masas:** se determinó a 24 ev, en un espectrómetro de masas JMS-01SG-2; al compuesto  $S_1$  también se le hizo microanálisis para conocer su composición elemental.

#### *Saponificación del compuesto*

Con base en la información preliminar obtenida del análisis espectroscópico, se procedió a saponificar el compuesto  $S_1$ . Se pensaron 100 mg. del compuesto  $S_1$  y se se saponificaron con KOH al 50% en metanol, durante 1 hora. El alcohol libre se extrajo con cloroformo; los extractos clorofórmicos se lavaron hasta fin de alcalinidad, se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida hasta eliminar completamente el solvente. Al sólido obtenido se le hizo análisis cromatográfico en capa fina utilizando las mismas condiciones empleadas para el compuesto sin saponificar. Una vez verificada su pureza cromatográfica, se le determinó: Punto de fusión; rotación específica: se empleó una solución al 2% en cloroformo; **espectro al infrarrojo:** se utilizó pastilla en bromuro de potasio (concentración al 1%); **espectro de resonancia magnética nuclear:** se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como solvente; **espectro de masas:** se determinó a 24 ev.

#### *2.d. Fraccionamiento del Residuo R<sub>5</sub>*

El residuo  $R_5$  respondió positivamente a las pruebas establecidas para el seguimiento inicial de la sustancia o sustancias con acción anestésica local: acción anestésica en mucosa, presencia de

nitrógeno por el método de la fusión con sodio y cromatografía en capa fina para detectar la presencia de sustancias nitrogenadas.

Para el fraccionamiento del residuo  $R_5$  se utilizó la cromatografía en columna. Se empleó una columna de 140 cm de largo por 6 cm de diámetro. Se llenó con un kilo de Sílica Gel para cromatografía en columna, previamente suspendida en cloroformo. Una vez que la columna estuvo lista, se colocaron cuidadosamente 28 gr del residuo  $R_5$ , disueltos en un volumen apropiado de cloroformo. La elución se llevó a cabo con cloroformo, recogiendo 260 fracciones de 20 ml cada una. Luego se empleó una mezcla de cloroformo metanol 80:20 hasta finalizar la elución; se utilizó un flujo de 45 gotas minuto.

A cada una de las fracciones se le hizo un seguimiento cromatográfico y espectroscópico (IR). El sistema cromatográfico en capa fina fué: adsorbente: Sílica Gel HF 254 (capas de 0.250 mm); solventes: cloroformo (A), cloroformo-metanol 90:10 (B); reveladores: Luz U.V. de 254 nm (a); ácido acético; ácido sulfúrico-agua 80:4:16 (b) y reactivo de Dragendorff (c). Una vez observadas las fracciones de acuerdo a su comportamiento cromatográfico y espectroscópico, se reunieron aquellas que resultaron ser iguales, se concentraron y nuevamente se sometieron al ensayo cromatográfico y espectroscópico indicado. Las fracciones 170 a 176, reunidas y concentradas dejaron como residuo un líquido viscoso, amarillo claro, el cual respondió positivamente a los tres ensayos propuestos, para el seguimiento del posible anestésico local. A este compuesto se le denominó  $S_2$ . Rendimiento obtenido 0.013%. El compuesto activo aislado fué guardado en ampollas ámbar las cuales se sellaron en atmósfera de nitrógeno y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

#### *2.e. Purificación e Identificación del Compuesto S<sub>2</sub>*

Después de la información preliminar obtenida para el compuesto  $S_2$ , se procedió a verificar su pureza para lo cual se utilizó la cromatografía en capa fina. Para el ensayo se emplearon las siguientes condiciones: adsorbente: Sílica Gel HF 254 (capas de 0.250 mm activadas a 110°C); solventes: cloroformo (A); cloroformo-metanol 95:5 (B) benceno-cloroformo 10:1 (C); cloroformo-n-hexano 3:1 (D); éter de petróleo-benceno 1:1 (E); cloroformo-nitrometano 95:5 (F); reveladores: luz ultravioleta de 254 nm (a); reactivo de Dragendorff (b); vapores de yodo (c) reactivo de ácido acético-ácido sulfúrico-agua 80:4:16 (d); permanganato de potasio al 1% en bicarbonato de sodio al 2% (e); isatina en ácido sulfúrico (f) (27).

La sustancia  $S_2$  se aplicó disuelta en cloroformo. Se hizo cromatografía mono y bidimensional. Para la bidimensional se usaron los solventes A y B. Los resultados observados mostraron la presencia de una sola mancha, cuya posición fué la misma con cada uno de los reveladores usados.

Cromatografía preparativa en capa delgada. Para tener una mayor certeza sobre la pureza de la sustancia se utilizó cromatografía preparativa en capa delgada en las siguientes condiciones: adsorbente: Sílica Gel HF 254 (placas de 0,5 mm activadas a 110°C); solvente: cloroformo; revelador: luz ultravioleta de : 254 nm. Como prueba biológica se ensayó la acción anestésica local en mucosa.

La sustancia  $S_2$  se solubilizó en cloroformo, para su aplicación. Una vez localizada la zona, se raspó, y el adsorbente se sometió a extracción con cloroformo, hasta agotar el principio activo. Los extractos clorofórmicos, fueron concentrados a presión reducida, hasta eliminación completa del solvente.

Se obtuvo como residuo un líquido de aspecto oleoso, amarillo claro, el cual fué guardado en ampollas ámbar, selladas en atmósfera de nitrógeno y se mantuvo refrigerado hasta su utilización. El residuo obtenido fué sometido nuevamente a un ensayo cromatográfico en capa fina. Dadas las características observadas para el compuesto en cuanto a su naturaleza insaturada se utilizó como adsorbente Sílica Gel HF 254 impregnada con  $AgNO_3$  (10%); las demás condiciones fueron las dadas para el compuesto antes de ser tratado por cromatografía preparativa.

#### Identificación del Compuesto $S_2$

Con el objeto de identificar o de llegar a proponer una estructura para el compuesto  $S_2$  aislado y purificado, por los métodos indicados, se le hicieron las siguientes pruebas; Solubilidad: éter de petróleo, éter etílico, cloroformo, etanol, metanol; punto de ebullición; índice de refracción y análisis elemental para C, H y N.

#### Estudio espectroscópico

Espectro al ultravioleta: se determinó en cloroformo. Se usó un espectrofotómetro Beckman, modelo 25; espectro al infrarrojo: se tomó en forma de película, se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 467; espectro de resonancia magnética nuclear: se usó como solvente  $CDCl_3$  se obtuvo a 60 MHz en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo R<sub>12</sub>; espectro de masas: se obtuvo a 24 ev en un espectrómetro JMS-01SG-2.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 1. Identificación del compuesto $S_1$

*Cromatografía en capa fina:* El comportamiento del compuesto  $S_1$  en las condiciones descritas en la parte experimental (2c) fue el siguiente: Con el solvente "A" y el revelador "a" se observó una mancha de color rosado naranja y un Rf de 0.90; con el solvente "B" y el revelador "b" una mancha naranja morado y un Rf 0.62 con el solvente "C" y el revelador "c" una mancha color morado y con los reveladores "d" y "e" una mancha violeta grisácea y un Rf de 0.62.

#### Constantes físicas

Solubilidad: El compuesto  $S_1$  es muy soluble en cloroformo y en éter etílico, poco soluble en etanol e insoluble en metanol; punto de fusión: 240-242°C (etanol); rotación específica:  $[\alpha]_D^{20} = +99.5$  (C: 2%  $CHCl_3$ ).

*Análisis elemental:* Encontrado: C : 82,18%, H: 11,22%, O: 6,60%. Calculado: C: 82,05%, H: 11,11%, O: 6,83%

#### Estudio espectroscópico:

Espectro U.V. ( $CHCl_3$ )  $\lambda$  máx: 222 nm  
Espectro I.R. (KBr) (C:1%)  $\nu$  máx: 3.080, 1640, 890 ( $-C=CH_2$ ); 2,950, 2.850 (tensión  $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ); 1.460 (flexión asimétrica del  $-CH_3$ ); 1.395, 1.380 (gem-dimetilo); 1.730 (tensión del C = O); 1.250 (tensión del C-O en acetatos); 1.160, 1.150  $cm^{-1}$  (bandas de esqueleto del gem-dimetilo).

Espectro RMN:  $^1H$  (90 MHz) ( $CDCl_3$ ), T.M.S. patrón interno;  $\delta$  0,8 -1,5 (21H, varios picos,  $7-CH_3$ ); 2,05 (3H, s,  $W_{1/2} = 14$  Hz,  $C_3$   $\beta$ -OAc); 4,50 (1H, m,  $W_{1/2} = 16$  Hz,  $C_3$ ); 4,62 (2H, s,  $>C=CH_2$ ).

Espectro de Masas EM: (24 ev) iones a m/e (%); 468  $M^+$  (10); 408 (17,5); 249 (10); 219 (7,5); 218 (17,5); 205 (15); 204 (25); 203 (25); 191 (25); 189 (100); 175 (27,5); 161 (30); 135(42,5); 108 (57,5); 95 (77,5).

El producto obtenido del insaponificable del compuesto  $S_1$  una vez analizado por los métodos ya indicados presentó los siguientes resultados:

#### Constantes físicas:

Solubilidad: Muy soluble en cloroformo, soluble en etanol insoluble en metanol; punto de fusión 220°C (metanol); rotación específica:  $[\alpha]_D^{20} : +97$  (C: 2%;  $CHCl_3$ ).

## Estudio espectroscópico

Espectro I.R. (K Br) (C: 1%)  $\nu$  máx: 3.350 (OH) 2.950, 2.920 (tensión  $-\text{CH}_2$  -,  $-\text{CH}_3$ ); 3.060, 1.640, 880 ( $>\text{C}=\text{CH}_2$ ); 1.450 (flexión asimétrica del  $-\text{CH}_3$ ); 1.390, 1.380 (gem-dimetilo);  $1.040\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_3$   $\beta$ -OH).

Espectro RMN:  $^1\text{H}$  (60MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ); T.M.S. patrón interno;  $\delta$ : 0,8 -1,2 (21H, varios picos 7- $\text{CH}_3$ ); 3,2(2H, m;  $W_{1/2} = 20\text{ Hz}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C}_3$ );  $\text{OH}$   $\text{C}_3$ ); 4,62(2H, S,  $>\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).

Espectro de Masas EM: (24 ev) iones a m/e (%); 426  $\text{M}^+$  (33,1); 408 (22,4); 393 (9,5); 366 (5,6); 339 (10,4); 315 (7,0); 207 (69,9); 205 (22,9); 204 (30,6); 203 (29,8); 191 (29,5); 190(39,3); 189(100%); 175 (25,4); 161 (26,3); 135 (47,6); 108 (30,3); 95 (40,1).

## 2. Identificación del compuesto $\text{S}_2$

Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina pueden apreciarse en la tabla I.

### Identificación de Nitrógeno en la sustancia $\text{S}_2$

La sustancia  $\text{S}_2$  respondió positivamente a la prueba de fusión con sodio comprobándose así la naturaleza nitrogenada del compuesto.

**Análisis elemental:** Los valores encontrados para C, H, O y N fueron: C: 76.11%; H: 10,21%; O: 7,26%; N: 6,42%.

Los valores calculados son: C: 76,0%; H: 10,40%; O: 7,24%; N: 6,33%.

### Constantes físicas:

**Solubilidad:** El compuesto  $\text{S}_2$  es muy soluble en éter de petróleo, cloroformo y éter etílico, poco

soluble en etanol e insoluble en metanol; punto de ebullición:  $185^\circ\text{C}$  (10 mm); índice de refracción: 1.5513 a  $20^\circ\text{C}$ .

### Estudio espectroscópico:

Espectro U.V. ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda$  máx 242 nm.

Espectro I.R. (película)  $\nu$  máx: 3280, 3086, 3020, 1.631. 1.550 (amida monosustituída); 2.220 ( $\text{C}\equiv\text{C}$ ); 1.660, 979 ( $\text{C}=\text{C}$  trans); 1.385, 1.365 (gem-dimetilo)  $815\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$  disustituído).

Espectro RMN:  $^1\text{H}$  (60 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ); TMS patrón interno;  $\delta$ : 0,92 (6H, d,  $J = 6\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ); 1,75 (3H, d,  $J = 7\text{ Hz}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3 - \text{CH} = \text{CH}$ ); 2,30 (4H, m,  $W_{1/2} = 12\text{ Hz}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2 - \text{C}\equiv\text{C} - \text{CH}_2$ ); 3,13 (2H, t,  $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 5,86(2H, dd,  $J = 15\text{ Hz}$ ,  $\text{CH} = \underline{\text{C}}\text{H}$ ); 6.1 (1H, S,  $W_{1/2} = 5\text{ Hz}$ ,  $-\text{NH}-$ ).

Espectro de Masas EM: (24ev) iones a m/e (%); 221  $\text{M}^+$  (82,5); 220 (100); 206 (5); 205 (17,5); 192 (40); 178 (15); 165 (21,2); 142 (12,5); 141 (47,5); 140 (100); 128 (50); 126 (35); 115 (66,2); 104 (37,5); 100 (8); 98 (12,5); 81 (117,5); 80 (6,2); 74 (11,2); 59 (10); 58 (2,5); 56 (12,5); 43 (3); 41 (5); 30 (7,5).

### Estabilidad del compuesto:

El compuesto conservó sus propiedades físicas (color, índice de refracción, solubilidad) cuando se mantuvo en atmósfera inerte, protegido de la luz y a baja temperatura ( $-5^\circ\text{C}$ ). Las muestras que se dejaron expuestas al aire, a la luz directa y a la temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) tomaron un color pardo rojizo, y en pocos días se polimerizó formando una resina.

## 3. Discusión de Resultados.

La metodología empleada para extraer y fraccionar los principios liposolubles de las flores de la *Spilanthes americana* fue diseñada con el objeto de obtener una fracción lo menos compleja posible, con actividad biológica. Para lograrlo se utilizaron solventes de diferente polaridad y luego se separaron los componentes de esta fracción por cromatografía en columna (Figura 1). En la etapa anterior al proceso de separación cromatográfica se obtuvo por cristalización, un compuesto el cual fue denominado  $\text{S}_1$ ; su pureza se comprobó por cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon 3 sistemas de solventes y 4 reveladores, uno de ellos de tipo universal; en todos los casos se observó la presencia de una sola mancha. Como el adsorbente empleado fue Sílica Gel impregnada con nitrato de plata, la posibilidad de mezclas de isómeros de doble enlace quedó descartada.

TABLA I

Cromatografía en capa fina para el compuesto  $\text{S}_2$ .  
Absorbente: Sílica Gel HF 254

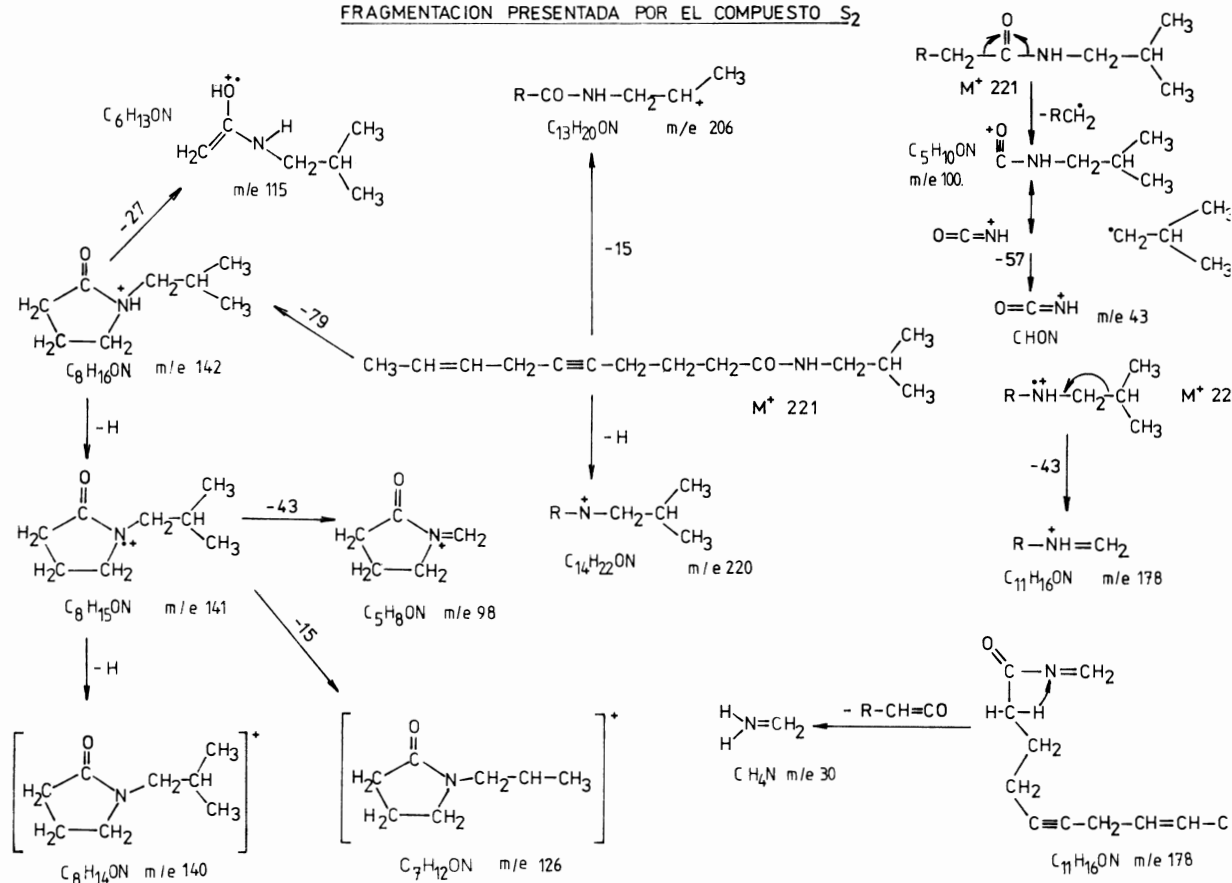
Solvente	Rf	Revelador	Color
*** Cloroformo	0,39	Vapores de yodo	amarillo
Benceno-cloroformo 10:1	0,50	Luz ultravioleta	Azul turquesa
Cloroformo-n Hexano 3,1	0,65	Ac. Acético-Ac. Sulfúrico - agua 80 : 4 : 16	Pardo*
Eter de petróleo-benceno 1:1	0,58	* $\text{KMnO}_4$ 1% en $\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 2%	amarillo
Cloroformo-Nitrometano 95:5	0,62	leatina en ácido sulfúrico	pardo rojizo**

\* Las placas deben calentarse a  $110^\circ\text{C}$

\*\* Aunque la técnica indica calentar, la reacción ocurre inmediatamente en frío.

\*\*\* Sistemas utilizados con Sílica Gel Impregnada con  $\text{AgNO}_3$  al 10%.

FIG. 2

FRAGMENTACION PRESENTADA POR EL COMPUESTO S<sub>2</sub>

El espectro IR de la sustancia S<sub>1</sub> presentó bandas a 3.080, 1.640 y 890  $cm^{-1}$ , típicas de un doble enlace terminal lo cual se comprueba mediante el espectro RMN el cual muestra un singlete con intensidad para dos protones a 4,62  $\delta$ . Las bandas en el IR a 1.460, 1.395 y 1.380  $cm^{-1}$  indican la presencia de grupos metilo, siendo las dos últimas típicas de un grupo gem - dimetilo. Lo anterior se confirma mediante el espectro RMN en el cual se observan varias señales en la región de 0,8 a 1,5  $\delta$ , las cuales integran para 21 protones, sugiriendo la presencia de 7 grupos metilo.

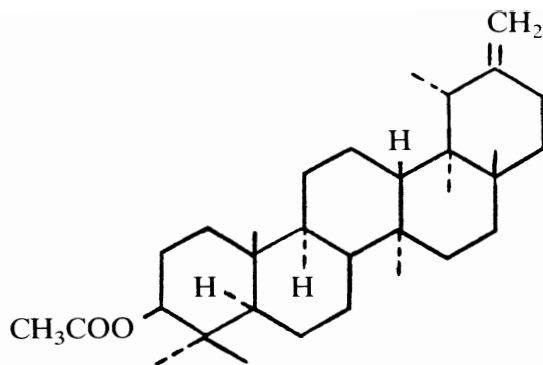
Así mismo las bandas en 1.730 y 1.250  $cm^{-1}$  indican la presencia de un grupo acetato, lo cual se comprueba con el espectro de resonancia magnética nuclear, en el que se observa una señal singlete a 2,05  $\delta$  que integra para tres protones y es típica de los acetatos. El espectro de masas muestra un pico a m/e 408 el cual corresponde al ión molecular menos 60 unidades debido a la pérdida de ácido acético.

El ión molecular a m/e 468 indica que se trata de una molécula grande y por su patrón de fragmentación se observa que puede tratarse de un triterpeno, lo cual está de acuerdo con el espectro infrarrojo, pues en éste se ven grupos

gem - dimetilo típicos de estos compuestos; y con el espectro de resonancia magnética nuclear en el cual se observan metilos angulares, varios grupos  $-CH_2-$ , un metilo hexocíclico y un acetato. También se observan en el espectro de masas el pico base a m/e 189 y otros picos a m/e 218,203,204 y 205, sugiriendo un patrón de fragmentación típico para triterpenos pentacíclicos. Por lo expuesto anteriormente se puede concluir que la sustancia S<sub>1</sub> corresponde a una acetato de un triterpeno pentacíclico. De acuerdo a la literatura (28), (29), (30) se asignó a la sustancia S<sub>1</sub> la estructura correspondiente al acetato de taraxasterol pues el punto de fusión, la rotación específica y las señales espectroscópicas concuerdan con los datos reportados.

Para comprobar la estructura del compuesto S<sub>1</sub> se saponificó con KOH en metanol y el insaponificable se extrajo de la manera indicada en la parte experimental. Se cristalizó en metanol y su punto de fusión tuvo un valor 20°C menor que el del compuesto S<sub>1</sub>. Al comparar el espectro infrarrojo de éste con el espectro del compuesto S<sub>1</sub> se observa la presencia de una banda a 3.350  $cm^{-1}$  característica del grupo hidroxilo, comprobada en la región de 1.040  $cm^{-1}$ , banda característica de un 3 $\beta$ -OH. Se observa además la desaparición de las bandas típicas del acetato.





Por otra parte el espectro RMN de este compuesto no muestra la señal singlete a 2,05 típica del acetato. A 3,20  $\delta$  se observa un multiplete de anchura media 20 Hz con intensidad de dos protones, lo cual sugiere que allí están sobrepuestos el protón del OH del C<sub>3</sub> y el protón geminal a este grupo hidroxilo. La señal a 4,62  $\delta$  la cual integró para dos protones corresponde al metileno hexocíclico ( $>C = CH_2$ ) observada también en el espectro del compuesto S<sub>1</sub>. (31)

El espectro de masas muestra un ión molecular a m/e 426 propio del producto obtenido de la saponificación del compuesto S<sub>1</sub>. Además se observa un pico a m/e 408, indicando una pérdida de 18 correspondiente a agua. Otros picos del espectro aparecen a m/e 207, 205, 204 y 203, indicando un patrón de fragmentación igual al del compuesto S<sub>1</sub> (32). Comparadas las constantes físicas y los espectros IR, RMN, y MS con los reportados en la literatura (33) (34) resultaron ser iguales.

La metodología empleada para la búsqueda del posible principio activo con acción anestésica local permitió obtenerlo a partir de la fracción sometida al proceso de separación por cromatografía en columna (Figura 1). A la fracción eluida de la columna que respondió a los ensayos propuestos para la búsqueda de la sustancia con la actividad indicada se le denominó compuesto S<sub>2</sub>.

La pureza del compuesto se verificó por cromatografía en capa fina. Se emplearon seis sistemas de solventes, cuatro clases de reveladores (dos de ellos universales), Sílica Gel HF 254 y Sílica Gel corriente impregnada de nitrato de plata. El compuesto S<sub>2</sub> se describió como un líquido viscoso, de color amarillo claro con acción anestésica local sobre la mucosa bucal, estable en atmósfera inerte y a baja temperatura. Su análisis elemental correspondió a C: 76,11%; H: 10,21%; O: 7,26% y N: 6,42% valores que indican una fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>ON, la que está de acuerdo con el espectro de masas, el cual muestra un ión molecular a m/e 221. El espectro infrarrojo del compuesto S<sub>2</sub> presenta bandas a 3.280, 3.086, 3.020, 1.631 y 1.550 cm<sup>-1</sup>, típicas de amidas secundarias, lo cual concuerda con el espectro de

resonancia magnética nuclear, en el que se aprecia un pico singlete ancho con  $W_{1/2} = 5\text{Hz}$  a 6,10  $\delta$  el cual puede ser asignado al protón sobre el átomo de nitrógeno. (35). Además en el espectro de masas se observa un pico a m/e 220 el cual correspondería a la pérdida de una unidad del ión molecular y ésta no puede ser otra que la pérdida del protón de la amida.

En el espectro de resonancia magnética nuclear se observa una señal doble a 0,92  $\delta$  con una constante de acoplamiento de 6 Hz para seis protones, típica para un gem-dimetilo, acoplado a un protón en el mismo carbono. Esta señal se comprueba con el espectro infrarrojo en el que se observan dos bandas a 1.385 y 1.365 cm<sup>-1</sup>.

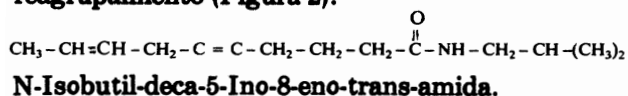
En el espectro de masas se encuentra un pico a m/e 178 el cual corresponde a M<sup>+</sup>-43, siendo muy factible que la molécula posea un grupo isopropilo. Sin embargo, una señal triplete con intensidad para dos protones a 3.13  $\delta$  sugiere la presencia de dos hidrógenos acoplados con un hidrógeno y cuyo desplazamiento químico indica que el C que tiene los dos hidrógenos debe estar unido a un átomo electronegativo. Esto sugiere un -CH<sub>2</sub> - unido al N y al isopropilo (36).

En el espectro al infrarrojo en la región comprendida entre 3.100 y 2.200 cm<sup>-1</sup> se observan bandas características para dobles y triples enlaces. En cuanto al doble enlace es disustituido (815 cm<sup>-1</sup>) y trans (979 cm<sup>-1</sup>) y el triple enlace a 2.200 cm<sup>-1</sup> no puede ser terminal. El que el doble enlace sea trans lo comprueba una señal dd a 5,86  $\delta$  con intensidad para dos protones, cuya constante de acoplamiento de 15 Hz es típica para protones en posición trans.

El triple enlace no debe estar conjugado con el carbonilo porque cuando ocurre esto, al infrarrojo (2220 cm<sup>-1</sup>) se observa una banda fuerte (37); en el caso de la sustancia S<sub>2</sub> esta banda es pequeña. Tampoco está conjugado con el doble enlace, puesto que la posición de la banda correspondiente a este en el infrarrojo (1.660 cm<sup>-1</sup>) comprueba esta aseveración, ya que si existiera conjugación, esta banda debería aparecer en regiones más bajas hacia 1.600 cm<sup>-1</sup> (38). Además, en el espectro de resonancia se observa una señal a 2,30  $\delta$  la cual integra para cuatro protones cuya forma es típica para la señal que generan los protones de los grupos metilenos  $\propto$  a un triple enlace.

Como se anotó, el doble y el triple enlace no están conjugados y en el infrarrojo, se observa la presencia de un doble enlace disustituido. una de las sustituciones debe corresponder a un grupo metilo pues en el espectro de resonancia magnética nuclear una señal doblete a 1,75  $\delta$  la cual integra para tres protones, con una constante de acoplamiento de 7 Hz es típica de un grupo metilo

sobre un doble enlace disustituido. Todo lo anteriormente expuesto permite concluir que el compuesto denominado S<sub>2</sub> es muy probablemente una amida secundaria con doble y un triple enlace, siendo la sustitución en la amida un grupo isobutilo. Con estos datos se puede establecer la siguiente estructura como la más adecuada entre las probables para el compuesto S<sub>2</sub>. Esta estructura además de estar de acuerdo con el espectro infrarrojo y el espectro de resonancia, también está en concordancia con el espectro de masas, puesto que su pico a m/e 115 es típico de amidas secundarias que posean un propileno unido al grupo carbonilo y un radical generalmente isobutilo unido al nitrógeno (39) (40). Por otra parte, el pico base a m/e 140 resulta de la misma fragmentación anterior y posterior reagrupamiento (Figura 2).

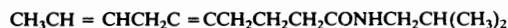


Otras fragmentaciones sencillas e importantes en las amidas son las resultantes de rupturas por ambos lados del grupo carbonilo, lo cual en el caso del compuesto S<sub>2</sub>, si la fragmentación ocurre en el carbono α al carbonilo origina un fragmento a m/e 100. A partir este fragmento y como una reacción secundaria se forma un pico a m/e 30(NH<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>) (Figura 2).

#### 4. CONCLUSIONES.

1. La metodología empleada para la extracción y la separación de los principios liposolubles de las flores de *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, permitió obtener compuestos muy puros, uno de ellos biológicamente activo.

2. La sustancia aislada que presentó actividad anestésica local, es una isobutil amida insaturada, para la cual se propuso la estructura siguiente:



No hay informaciones en la literatura sobre la existencia de una amida monoacetilénica en las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, pues según Bohlman (41) se han aislado amidas poliacetilénicas pero a partir de las raíces de plantas de este género.

3. El compuesto triterpénico pentacíclico aislado de la fracción liposoluble de las flores de la planta en estudio fué plenamente identificado como Acetato de Taraxasterol.

4. De las flores de *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron. Se aisló un compuesto para el que se propuso una estructura correspondiente a la N-Isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida.

5. El estudio farmacológico relacionado con la acción anestésica local y cicatrizante de la amida, será objeto de una próxima publicación.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo agradecen la colaboración de los Doctores Edgar Moreno de la Federación Nacional de Cafeteros, Augusto Rivera del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional y Jairo Calle del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional.

#### BIBLIOGRAFIA

- GARCIA BARRIGA H., Flora Medicinal de Colombia, Tomo III, Imprenta Nacional de Colombia p. 414, (1975).
- JACOBSON M., J. Am. Chem. Soc., 78, 19, p. 5084 (1956).
- JACOBSON M., J. Am. Chem. Soc. 75, 11, p. 2584 (1953).
- CROMBIE L., J. Chem. Soc., Parte I, 999, (1955).
- JACOBSON, M., Chem. Abs., 51, 9480h, (1957).
- YOSKIOKA T., Chem. Abs. 52, 11740f, (1958).
- CROMBIE, L., KRASINSKI, A., J. Chem. Soc., p. 4970 (1963).
- JACOBSON M., J. Am. Chem. Soc., 78, 19, p. 5084 (1956).
- SESHADRI T.R. and T.N.C. VEDANTHAM, Phytochemistry, 14, p. 1666 (1975).
- AIHARA, T., SUSUKI T., Chem. Abs., 46, 6 2745e, (1952).
- JACOBSON M., J. Am. Chem. Soc. 78, 19, p 5084 (1956).
- JACOBSON M., Chem. Abs., 51, 13, 9480h, (1957).

13. JACOBSON M., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 18, p. 4606 (1954).
14. JACOBSON M., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 11, p. 2584, (1953).
15. JACOBSON M., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 19, p. 5085, (1956).
16. JACOBSON, M., *ibid.*
17. MEISTERS A. and WAILLES, P.C., *Austr. J. Chem.* **13**, p. 347, (1960).
18. DOMINGUEZ J.A y DIAZ LEAL G., *Ciencia*, **17**, p. 213, (1957).
19. BURDEN R.S., CROMBIE L., *J. Chem. Soc. C.*, **18**, p. 2480, (1969).
20. SHIGEO T., SHIGEYOSHI, H., ISAO H., *Chem. Abs.* **85**, 20, p. 148994c, (1976).
21. MCKENNA, G. F., TAYLOR A., *Texas Rept. Biol. Med.* **17** p. 123 (1959).
22. POSADA M., *Boletín del Instituto de Antropología, Universidad de Antioquia*, vol. III, 10, p. 135 (1967)
23. GARCIA BARRIGA H., *Flora Medicinal de Colombia*, Tomo III, Imprenta Nacional de Colombia, p. 415, (1975).
24. CALLE M., PRADA J., *Revista de la Federación Odontológica Colombiana*, XXIV, p. 3, (1977).
25. CHERONIS N.D., ENTRIKIN, J.B., *Semi-micro Qualitative Organic Analysis* 2a. edición, Interscience Publishers, New York, p. 172,, (1957).
26. CALDERON E., *Guía para el análisis de plantas y notas prácticas sobre Fitoquímica*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p. 23, (1963).
27. HARBORNE J. E., *Phytochemical Methods*, 1a. ed. Chapman and Hall Ltda., London, p. 154, (1973).
28. BUDZIKIEWICZ H., WILSON, and DEJERASSI C., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 22, 3688, (1963).
29. CHANDHURY, N.A, and GHOSH D., *Phytochemistry*, **9**, 8, p. 1885, (1970).
30. KASPRZYK Z., and PYREK J., *Phytochemistry*, **7**, 1, p. 1633, (1968).
31. SHAMMA M., GLICK R.E., and MUMMA R., *J. Org. Chem.*, **27**, 12, p. 4512, (1962).
32. BUDSIKIEWICZ H., WILSON, and DEJERASSI C., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 22, 3688, (1963).
33. DUTTA C.P., and RAY L.P., *Phytochemistry*, **11**, 7, p. 2267 (1972).
34. KASPRZYK Z., and PYREK J., *Phytochemistry*, **7**, 9, p. 1631 (1968).
35. BURDEN R.S., CROMBIE L., *J. Chem. Soc. C.* **18**, p. 2477 (1969).
36. MENSAH I.A., TARRO F.G., et al., *Phytochemistry*, **16**, 4, p. 483 (1977).
37. BOHLMANN F., BURKHARDT T., C. ZEDERO, *Naturally Occurring Acetylenes*, Academic Press, London, p. 22, (1973).
38. MORCILLO J., MADROÑERO R., *Aplicaciones prácticas de la espectroscopía infrarroja*, Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid, p. 21, 1962.
39. BUDZIKIEWICK H., DJERASSI, WILLIAMS, D.H., *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, Inc., San Francisco, p. 336, (1967).
40. GILPIN, J.A., *Anal. Chem.*, **31**, 5, p. 935 (1959).
41. BOHLMAN F., BURHARDT T. and ZEDERO C., *Naturally Occurring Acetylenes*, Academic Press, London, 364, (1973).