

EFECTO ABORTIVO , AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Alnus acuminata*

Ahmed Salama *

Javier Rincón Velandia

Miguel Angel Torres Wilches

Carlos Iregui **

RESUMEN

Se aislaron tres sustancias puras de la fracción clorofórmica del extracto alcohólico de las hojas de *Alnus acuminata*, que fueron identificados por métodos espectroscópicos como Olean-13(18)-en-3-ona ; 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona y un alcohol alifático cuya estructura química esta en estudio. El estudio farmacológico mostró un efecto abortivo alto (80-100%) en ratones hembras preñadas. El estudio histopatológico mostró cambios significativos en las células del útero tanto a nivel del trofoblasto como del endotelio vascular.

SUMMARY

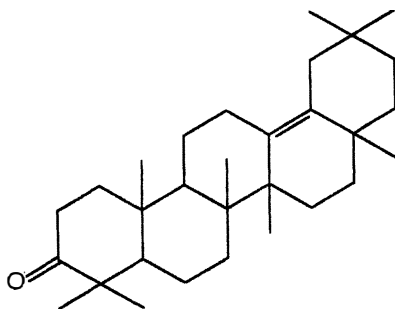
Three compounds were isolated from the chloroformic fraction of the alcoholic extract of *Alnus acuminata* leaves, and were identified by spectroscopic methods as :Olean-13(18)-en-3-one ; 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone and an unidentified aliphatic alcohol. The pharmacological study showed a high abortive effect (80-100%) in female mice. The histopathologic study showed significant changes in the uterus cells specially at the level of trophoblast and the vascular endothelium.

INTRODUCCION

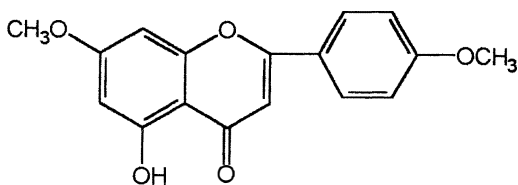
En investigación previa hemos detectado la presencia de esteroides , triterpenos , flavonoides , taninos y compuestos fenólicos en el extracto alcohólico de las hojas de *A. acuminata* , además las hojas verdes y sus extractos alcohólico y acuoso mostraron un efecto abortivo alto en cobayos (1). El estudio farmacológico demostró que la fracción clorofórmica del extracto alcohólico es la responsable del efecto abortivo (92%) en ratones albinos hembra después del día 12 de la gestación (2) .

* Departamento de Farmacia ,
Universidad Nacional de Colombia ,
Santafé de Bogotá , Colombia , A.A. 14490.

** Sección de Histopatología ,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ,
Universidad Nacional de Colombia ,
Santafé de Bogotá.



I



III

PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión sin corregir fueron tomados en el fusiómetro Reichert Thermovar, binocular. Los espectros ultravioleta se realizaron en el espectrofotómetro Perkin Elmer 552 en celdas de cuarzo de 1 cm y usando etanol y cloroformo de grado espectroscópico como solventes. Los espectros de IR fueron tomados en pastillas de KBr en un espectrofotómetro Perkin Elmer 467, Los espectros de RMN- H^1 y RMN- C^{13} fueron tomados en un espectrómetro Jeol de transformada de Fourier. Los espectros de MS fueron registrados en un espectrometro 6C-MS Shimadzu 9020 DF.

Material vegetal

Las hojas de la planta fueron recolectadas el 23 de febrero de 1990 en la finca El Manantial localizada en el Km 13 autopista a Medellín cruce a Subachoque a 2600 m sobre el nivel del mar y 13°C. El material fue secado a 50°C por 48 horas en una estufa con aire circulante marca ESSE. Las hojas secas se molieron y

almacenaron en un lugar fresco para su posterior estudio.

La planta fue clasificada en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. Un ejemplar se encuentra registrado en el Herbario Nacional bajo el N° Col 264848.

Extracción y fraccionamiento

Con base en los resultados de nuestros trabajos anteriores (1,2) realizados con esta planta, 2636 g de las hojas secas fueron extraídos con etanol del 96 % en un Soxhlet hasta agotamiento. El disolvente fue evaporado en un evaporador rotatorio obteniendo 796 g de residuo seco de los cuales 403 g se extrajeron con cloroformo obteniéndose una fracción clorofórmica y un residuo insoluble de color café, 267 g (fracción A).

La fracción clorofórmica se extrajo con una solución de NaOH al 3% hasta reacción negativa con $FeCl_3$ para compuestos fenólicos. La fracción clorofórmica se lavó primero con HCl 5% y posteriormente con agua destilada hasta neutralidad, luego se evaporó el cloroformo obteniendo un residuo seco de 54 g (fracción B). La fracción soluble en NaOH al 3% se neutralizó con HCl al 10% y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se disolvió en etanol 96% caliente y se dejó en reposo durante 48 horas, al filtrar se obtuvo un precipitado blanco de NaCl y un filtrado alcohólico que fue concentrado hasta sequedad dando un residuo de 52 g (fracción C).

Los ensayos farmacológicos del extracto alcohólico y las fracciones A, B y C mostraron actividad abortiva para el extracto alcohólico y la fracción clorofórmica B.

Aislamiento de compuestos puros por cromatografía en columna

50 g del residuo de la fracción soluble en cloroformo (fracción B) del extracto alcohólico de las hojas de *A. acuminata* se fraccionó por cromatografía en columna de sílica gel (895 g). Inicialmente se eluyó con benceno seguido de tolueno con cantidades crecientes

de acetato de etilo y finalmente con metanol . Se recolectaron 326 fracciones de 100ml cada una, las cuales fueron reunidas en 9 grupos de fracciones de acuerdo con los resultados del control por cromatografía en capa delgada, Los residuos de los grupos de fracciones obtenidos dieron un total de 49.4 g que muestran un rendimiento de 98.8 % , fueron ensayados para estudiar su efecto abortivo e histopatológico e intentar aislar compuestos puros .

Compuesto I : (8-amirina (Olean-13(18)-en-3-ona) . Las fracciones 35 a 73 (grupo N° 3) dieron un residuo blanco seroso (6.27 g) , de los cuales 1.5 g fueron utilizados para los ensayos farmacológicos y los 4.77 g restantes se sometieron a cristalización con benceno y recristalización en una mezcla de cloroformo-acetato de etilo (50:50) dando una sustancia cristalina en forma de agujas blancas de 270 mg (0.028%) .

La pureza del compuesto fue comprobada mediante CCD en tetracloruro de carbono : acetato de etilo (100:0.2) , ciclohexano : acetato de etilo (100:1.2) revelando con vainillina - ácido ortofosfórico seguido por calentamiento del cromatograma . El compuesto es soluble en cloroformo , eter de petróleo , benceno , tolueno, ligeramente soluble en acetato de etilo , dió prueba positiva para triterpenos con Liebermann-Burchard y precipitó con el reactivo de 2,4-dinitro fenilhidrazina ; pf. 192-4°C ; UV : λ max (etanol) 215 nm ; IR ν max cm^{-1} (KBr) 2931 , 2864 (CH₂-CH₃ estiramiento) , 1715 (C=O estiramiento) , 1448 , 1383 y 1362 (grupos metilos gemelos); RMN-H¹ (CDCl₃, 90MHz) : δ 0.93 (3H,s) , 1.11 (3H,s) , 1.16 (6H,s) , 1.24 (6H,s) , 1.31 (3H,s) , 1.39 (3H,s) , 2.62 (1H,m) , 2.68 (1H,m) ; RMN-C¹³ (CDCl₃ , 22.4 MHz) : δ 16.29 , 17.66 , 19.84 , 21.06 , 21.27 , 22.25 , 23.77 , 24.07 , 25.05 , 26.49 , 26.94 , 32.34 , 33.32 , 34.10 , 34.58 , 35.41 , 36.57 , 36.93 , 38.69 , 39.38 , 39.65 , 40.93 , 44.72 , 47.25 , 49.99 , 54.83 ; EM : m/z (%) , 424 (M⁺, 31) , 409 (M⁺- CH₃ , 17) , 218 (12) , 205 (100) , 189 (23) , 163 (14) , 149 (11) , 109 (57) , 95 (47) , 81 (28) , 69 (41) , 60 (22) , 57 (27) , 55 (37) .

Compuesto II : Del grupo N°5 de las fracciones 145 a 163 se obtuvo un residuo seco de color verde malva

de 5.3 g . Una parte del residuo fue sometida para el estudio farmacológico mientras que 3.8 g fueron objeto de una cristalización repetida en tolueno obteniendo 486 mg (0.052%) de una sustancia en forma de cristales blancos serosos . La pureza del compuesto fue comprobada por CCD , en tetracloruro de carbono: acetato de etilo (10:0.5) , ciclohexano: acetato de etilo (100:0.1) revelando con vainillina : ácido ortofosfórico seguido por calentamiento del cromatograma . El compuesto es soluble en tolueno , benceno , ciclohexano , cloroformo , insoluble en acetato de etilo , etanol , metanol y agua . El compuesto dió negativa las pruebas de Liebermann - Burchard y de cloruro férrico ; pf. 71-2°C ; UV : (etanol) λ max , 203 nm ; IR : (KBr) max cm^{-1} 3450 (-OH , estiramiento) , 2950 , 2880 , 1478 , 1075 (-OH, deformación) , 745 ; RMN-H¹ (CDCl₃ , 90 MHz) δ 0.87 (t) , 1.25 (s) , 1.4 (m) , 1.55 (d) , 3.63 (t) ; RMN-C¹³ (CDCl₃ , 22.4 MHz) δ : 14.07 , 22.67 , 25.71 , 29.41 , 29.68 , 31.91 , 32.81 , 63.07 ; EM : m/z (%) : 426 (2) , 393 (10) , 365 (10) , 337 (7) , 167 (12) , 153 (16) , 139 (23) , 125 (43) , 111 (64) , 97 (100) , 83 (80) .

Compuesto III : 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona. El grupo N°6 de las fracciones 164 a 213 de la columna de cromatografía de la misma fracción clorofórmica dió un residuo de 3.34 g con color verde oscuro . De dicho residuo 1.84 g se sometió a recristalización en una mezcla de cloroformo:acetato de etilo (20:80) dando varios lotes de un total de 54 mg (0.0075%) de una sustancia en forma de agujas pequeñas amarillas , su pureza fue comprobada mediante CCD en cloroformo:acetato de etilo (100:0.6) , ciclohexano: acetato de etilo (100:35) y revelando con vainilla: ácido ortofosfórico seguido por calentamiento del cromatograma . El compuesto es soluble en cloroformo, acetato de etilo, etanol, metanol en caliente y es insoluble en agua . Dio positiva la prueba de Shinoda y oscureció una solución de cloruro férrico , dió negativa a la prueba de Liebermann-Burchard y presentó fluorescencia al agregar ácido sulfúrico a una solución alcohólica de la sustancia ; pf. 165-7°C: UV (metanol) λ max 330 , 270 , 212 nm ; (Metanol + NaOH 10%) λ max 375 , 294 nm alterados por adición de HCl ;

(Metanol + cloruro de aluminio + HCl) λ_{\max} 343, 300, 267, 230 nm inalterado por la adición de acetato de sodio; IR : (KBr) ν_{\max} 3450 (OH estiramiento) , 1660 (C=O estiramiento) , 1640 , 1350 , 1180 (OH fenólico); RMN $^{-1}$: (CDC13 , 90 MHz) δ 3.85 (3H,s) , 3.86 (3H,s) , 6.35 (1H,d,j = 2Hz) , 6.46 (1H , d, j = 2 Hz) , 6.55 (1 H,s) , 6.98 (2H, dd,j = 9 Hz) , 7.81 (2H,dd,j = 9Hz) , 12.79 (1H,s); RMN- 13 : (CDC13 , 22.4 MHz) δ 55.519 (OCH3 en C-4') , 55.758 (O CH3 en C-7) , 99.604 (C-8) , 98.004 (C-6) , 104.329 (C-3) , 105.522 (Carbono entre C-4 y C-5 del núcleo γ -benzopirona) , 114.473 (C-3',C-5') , 123.543 (C-1') , 128.018 (C-2' , C-6') , 157.674 (carbono entre oxígeno y C-8 del núcleo γ - benzopirina) , 162.149 (C-4') , 162.567 (C-5) , 163.999 (C-2) , 165.401 (C-7) , 182.407 (C-3) ; EM : m/z (%) 298 (M⁺ , 100) , 270 (M⁺-CO, 5) , 269 (22) , 255 (M⁺- 43,15) , 166 (11) , 138 (10) , 135 (16) , 132 (14) , 110 (6) , 95 (9) .

ESTUDIO FARMACOLOGICO

Reactivo biológico

Para determinar el efecto abortivo se utilizaron ratones albinos cepa f_{pn} , Cr 1, CD 1(ICR) BR , con peso que fluctúa entre 25 y 30 g obtenidos por el sistema de apareamiento no isogénico, criados en el Bioterio del Departamento de Farmacia , Universidad Nacional de Colombia . Los animales fueron mantenidos en cajas de acero inoxidable de 18.8 x 12.5 cm en las condiciones sanitarias establecidas a temperatura ambiente mantenida mediante un calefactor a $21 \pm 1^{\circ}$ C y humedad en un intervalo de $70 \pm 5\%$. La iluminación se proporcionó mediante lámparas de luz artificial controladas mediante un TAP, por períodos de 12 horas que fueron alternados con períodos de oscuridad de igual duración , a los animales se les suministró una dieta con ingredientes naturales y sintéticos marca Tulipán . El suministro de agua mediante frascos tetero higienizados fue renovado diariamente.

Determinación del efecto abortivo

Se separaron 50 machos y 100 hembras en grupos de 10 animales del mismo sexo bajo las condiciones anteriormente mencionadas por un período de 20 días . Una vez terminado este período de acondicionamiento , los animales se aparearon colocando tres hembras por un macho y conservando las mismas condiciones establecidas. Los animales se controlaron diariamente mediante una observación general y un control de peso . Como criterio seguro de preñez , se consideró un aumento de 4 g de peso por cada hembra , lo que coincidió hacia el día undécimo del período de gestación . Las hembra preñadas se separaban en 11 grupos de 5 animales para probar el efecto abortivo de los 9 grupos de fracciones obtenidas de la columna de cromatografía , de la fracción clorofórmica (fracción B) y un grupo como control al cual se le suministró solamente el vehículo . La dosis de 9 mg de los extractos [por ser la menor dosis que produjo el 100% de efecto abortivo en trabajos anteriores (2)] fue administrada por vía oral en 0.5 ml de vehículo conformado por polietilenglicol: Tween 80: agua (38:2:60) , a partir del día undécimo del inicio del apareamiento y/o alcanzaban el aumento de 4 g de peso. Los animales fueron observados cuatro veces diarias y su peso fue controlado cada 24 horas . La pérdida de peso ganado en el apareamiento , el sangrado vaginal y la expulsión de fetos prematuros , fueron considerados como síntomas de aborto. Los resultados se muestran en la figura N° 1.

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Una vez se observó uno o varios síntomas de aborto se procedió al sacrificio del animal por desnucamiento, haciéndose una disección , seguida de una observación del interior del animal y toma de tejidos de órgano reproductor , hígado , riñones y de los fetos . que fueron fijados en una solución de formaldehído al

10% en buffer fosfatos a pH 7.2 hasta el momento de realizar los cortes y montajes de tejidos (3), que fueron comparados con los de los animales control.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación del compuesto I

Del tercer grupo de fracciones obtenidos de la cromatografía en columna se aisló por cristalización en cloroformo : acetato de etilo (50:50) una sustancia cristalina pf. 192-94°C ; el espectro de masas de alta resolución presenta el pico del ion molecular a m/z 424 que sugiere una fórmula química C₃₀H₄₈O, lo que está de acuerdo con lo aproximadamente esperado para un compuesto de tipo triterpenico. Además el patrón de fragmentación en el espectro de masas no muestra el pico correspondiente a una cadena lateral, demostrando que el compuesto es un triterpeno pentacíclico tipo Oleanano. El espectro IR muestra una banda fuerte a frecuencia máxima en 1715 cm⁻¹ que puede ser asignada a un grupo cetónico en un anillo saturado de 6 miembros, posiblemente en el carbono C-3, como se evidencia en la biogénesis de la mayoría de los triterpenos monooxigenados (4). Este hecho se puede comprobar con el espectro de RMN-H¹ en el que se observan las señales características para los dos protones del carbono C-2 en 2.62 y 2.68 ppm ; lo cual se puede confirmar en el espectro de masas para los picos 218 y 205 de los fragmentos del anillo A. El espectro de RMN-C¹³ y los DEPT a 45.9 y 135, indican que se presentan 30 carbonos : 8 metilos, 11 metilenos, 2 metinos, 9 carbonos cuaternarios de los cuales 2 carbonos unidos por un doble enlace. En el espectro de RMN-H¹ no se observa ninguna señal a campo mas bajo que 2.79 ppm, indicando la ausencia de protones vinílicos, protones geminales y grupo hidroxilo, carboxílicos o aromáticos. Sin embargo de acuerdo a la fórmula química C₃₀H₄₈O y al espectro UV que no muestra bandas de absorción que indiquen la existencia de un tipo de conjugación con el grupo carbonilo, el compuesto debe tener un doble

enlace entre los carbonos C-13 y C-18 (5). Con base en lo anterior la sustancia se identificó como Olean-13(18)-en-3-ona, conocida como δ -amirenona o δ -amirona. Mas evidencias para la identificación del compuesto se logaron por sus espectros UV, IR, RMN-H¹ y EM que son idénticos para los reportados para la δ -amirona aislada de *Cissus quadrangularis*, Vitaceae (6) y *Euphorbia secula*, Euphorbiaceae (7); y el punto de fusión (192-4°C) que se encuentra dentro del rango reportado (194-7°C) para el Olean-13(18)-en-3-ona (8). La δ -amirona no fue reportada anteriormente en *A. acuminata*

Identificación del compuesto II

El control por CCD del grupo V de la cromatografía en columna permitió ver un mínimo de 4 manchas de diferentes tonalidades de azul y violeta entre ellas una de color azul turquí en la parte inferior del cromatograma

Mediante los ensayos de cristalización se obtuvo una sustancia cristalina (II). La pureza del compuesto obtenido se comprobó mediante CCD, eluyendo con diferentes solventes. Su punto de fusión es de 71-72°C. El espectro de masas de alta resolución presenta un pico a m/z 426 y una forma de fragmentación típica de hidrocarburos manifestada por la pérdida secuencial de 14 u.m.a. esto confirmado por el espectro de RMN-H¹ que muestra un triplete a 0.86 ppm que puede asignarse a un grupo metilo; una señal singlete para varios protones de una misma cadena -CH₂ a 1.26 ppm y además presenta un triplete a 3.63 ppm. Puede asignarse para 2 protones de un grupo CH₂ OH, este último se confirma en el espectro IR que presenta una banda ancha y fuerte a 3450 cm⁻¹ para un estiramiento OH y otra a 1075 cm⁻¹ para deformación OH para un alcohol primario.

Con base a lo anterior el compuesto puede corresponder a un alcohol primario alifático de aproximadamente 29 átomos de carbono. La elucidación completa del compuesto (II) está en proceso de investigación.

Identificación del compuesto III

Se observó del control por CCD la presencia de 6 manchas, una de ellas de color amarillo y menor Rf. De los ensayos de cristalización en una mezcla de acetato de etilo:cloroformo (80:20), se obtuvo un compuesto amarillo, que demostró ser puro por el control en CCD eluyendo con diferentes sistemas solventes. El compuesto dio prueba positiva para flavonoides que contienen el núcleo de la γ -benzopirona con el reactivo de Shinoda, además reaccionó con una solución de cloruro férrico al 10% para un grupo OH fenólico. El espectro de masas de alta resolución, dio un pico a m/z 298 para el peso molecular que sugiere una fórmula química $C_{17}H_{14}O_5$. También presentó un pico a m/z 166 para un fragmento correspondiente al anillo A del flavonoide que presenta un grupo hidroxilo (OH) y un grupo metoxilo y un pico a m/z 132 para el anillo B que presenta un metoxilo. La presencia de los grupos metoxilo en los anillos A y B se confirma por las señales singlete en 3.85 para 3 protones y 3.86 ppm para otros tres en el espectro RMN- H^1 . Estos dos grupos metoxilo se encuentran en posiciones 7 y 4' por la presencia de dos señales doblete ($J=2\text{Hz}$) cada una para un protón en 6.35 y 6.46 ppm, y la presencia de dos señales doblete -doblete ($J=9\text{ Hz}$, para cada una) para dos protones en 6.98 y 7.81 ppm. En el espectro de RMN- H^1 la presencia de una señal singlete a 6.55 ppm asignada a un protón aislado por un carbono cuaternario (C-3), indica la estructura de una flavona. El grupo OH se manifiesta en el espectro de RMN- H^1 por la señal singlete para un protón a 12.79 ppm y en el espectro IR por la presencia de una banda a 3450 y 1160 cm^{-1} . El grupo OH debe estar en el carbono C-5 por la presencia de bandas a $\lambda_{\text{máx}}$ 330 y 270 nm.(metanol), que fueron desplazadas a $\lambda_{\text{máx}}$ 343,300, 267, 230 por la adición de AlCl_3 no siendo éstas alteradas por la adición de HCl, debido a la formación de un complejo estable (Quelato), entre el grupo OH en el carbono C-5 y el grupo carbonilo en el carbono C-4. El grupo carbonilo está confirmado por una banda fuerte a 1660 cm^{-1} en el espectro IR. Con base en lo anterior y las asignaciones en el espectro de RMN- C^{13} y el punto

de fusión (165-67°C) que está muy de acuerdo con el reportado (168°C) (9), el compuesto III se identificó como 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona (4',7 - dimetoxiapigenina). Esta es la primera vez que se reporta el aislamiento de este compuesto en *Alnus acuminata* pues solo fue reportado anteriormente en una especie de género *Alnus* (*A. japonica*) y nueve especies del género *Betula* de la familia *Betulaceae* (10).

EFECTO ABORTIVO

Con base en los resultados de los estudios anteriores para determinar este efecto en ratones (2), en el presente trabajo se utilizó la dosis de 9 mg, por ratón administrada en 0.5 ml. de vehículo por vía intragástrica diariamente, a partir del día 11 de gestación hasta la manifestación de síntomas de aborto o hasta el nacimiento de crías.

Se utilizaron grupos de 5 ratones hembra para ensayar: la fracción clorofórmica del extracto etanólico, cada uno de los grupos de fracciones aislados de esta por cromatografía en columna y un grupo con el mismo número de animales para el vehículo (grupo control) Figura 1. No se determinó el efecto abortivo de las fracciones A y C del extracto etanólico, debido a que en el trabajo anterior (2) no manifestó dicho efecto.

Se observa en la Figura 1 un efecto abortivo alto a la dosis de 9 mg, para la fracción clorofórmica (4 abortos de 5 animales tratados), además se observa un efecto abortivo variable para los diferentes grupos de fracciones de la cromatografía en columna ensayados que oscila entre 2 y 5 animales con aborto de 5 animales tratados, siendo el grupo de fracciones 6 y 8 los que presentaron mayor efecto abortivo (4 y 5 animales con aborto respectivamente). Únicamente el grupo de fracciones III, y el control no manifestaron ninguno de los síntomas establecidos como indicativos de aborto.

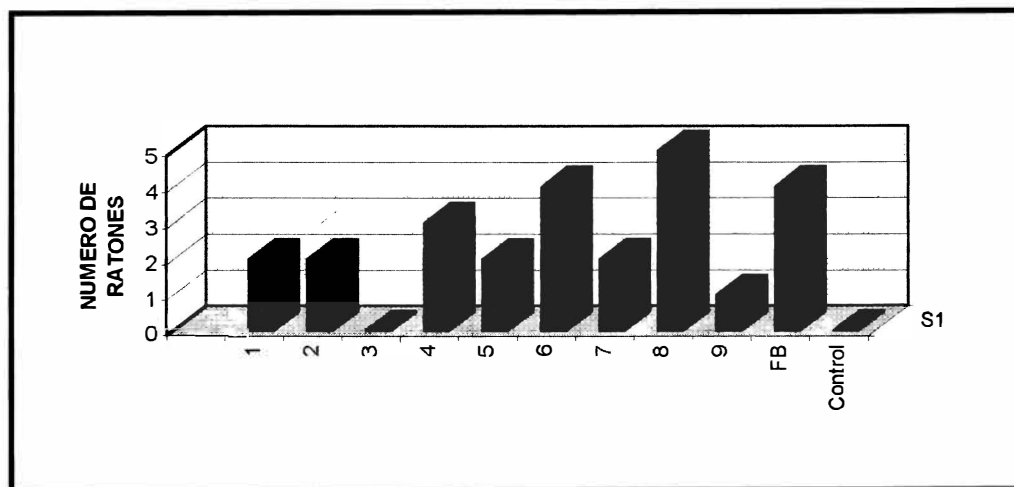
El efecto abortivo se manifestó por uno o varios de los siguientes síntomas: sangrado vaginal, pérdida de peso ganado en la etapa de gestación, expulsión de fetos prematuros, crías muertas, útero hemorrágico y/o maceración.

ESTUDIO HISPATOLOGICO

El estudio realizado sobre tejidos de tracto reproductivo, fetos, riñón e hígado de cada uno de los animales del ensayo, permitió ver una serie de alteraciones cuya gravedad está determinada por la intensidad del eventual daño producido por los extractos y por la etapa del período de gestación en el que se encontraba el animal en el momento del sacrificio. Las mayores alteraciones se presentaron a nivel de tejidos del tracto reproductivo principalmente en úteros gestantes o recién paridos y se manifestaron como:

Hemorragia en la luz uterina o cúmulo de material proteináceo y fibrina en la luz uterina, o cúmulo de polimorfonucleares neutrófilos, edema y congestión de la lámina propia del útero, formación de microtrombos a diferente nivel, necrosis y degeneración de células de trofoblasto, infiltración de polimorfonucleares a diferentes niveles tanto de trofoblasto como de la pared uterina, hiperplasia en las células mucoides del epitelio vaginal. El daño a nivel del trofoblasto es muy importante en el desarrollo del proceso de gestación de los fetos, teniendo en cuenta que este tejido es fundamental para el cambio de constituyentes entre la sangre materna y la sangre fetal; una interrupción de esta función podría desencadenar un aborto. Los animales del grupo control en algunos casos mostraron algunas alteraciones, la diferencia entre estos y los que recibieron los extractos parece ser más cuantitativa y de localización de células afectadas, que cualitativa. La única diferencia

FIGURA 1. COMPARACION DEL NUMERO DE RATONES QUE PRESENTO SINTOMAS DE ABORTO



1-9 : Grupos de fracciones de la Columna Cromat .
FB : Fracción Cloroformica total

comprobable entre un parto normal y un aborto producido por tóxico alguno, sería el tiempo de gestación, el grado de lesión y los grupos de células afectadas.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen, al profesor Jairo Martínez, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander por la toma de los espectros de RMN- H^1 y C^{13} , la profesora Alicia Lucía Morales, Departamento de Química, Universidad Nacional por la toma de los espectros de masas, el profesor Luis Enrique Cuca, por su ayuda en la interpretación de los espectros del flavonoide.

BIBLIOGRAFIA

- 1- A.M. Salama, M. I. Gallego, C. Barrera, E. Espinel. *Rev. Col. Ciencias Quím. Farm.* N° 15, 51 (1988).
- 2- M. G. Galvis, H. León, Determinación del efecto abortivo y antiinfertilidad de las diferentes fracciones del extracto etanólico de las hojas de *A. acuminata*, H.B.K, Trabajo de grado Químico Farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (1989).
- 3- A. W. Ham, D. H. Cormack. Tratado de histología, 8a edición, Editora Interamericana, México, (1983). P.14
- 4- T. Robinson. The organic constituents of higher plants, 3 de. Cordus press, North Amherst, Mass. 01059, (1975) p.153.
- 5- H. Budzikiewicz, J. M Wilson and C. Djerassi, Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, Vol. 2 U.S.A, (1964) p. 121
- 6- K. K. Bhutani, R. Kapoor and C. K. Atal, *Phytochemistry*, **23**, N° 2, 407 (1984).
- 7- G. D. Manners and Davis, *Phytochemistry*, **23**, N° 5, 1059 (1984).
- 8- G. Brownlie and M.B.E. Fayez, F.S. Spring, R. Stevenson and W. S Strachan, *J. Chem. Soc.*, 1377 (1956).
- 9- M. Silva, J. M. Mundaca and P. G. Sammes, *Phytochemistry*, **10**, 1942 (1971).
- 10- E. Wollenweber, *Phytochemistry*, **15**, 438 (1976).