

ESTUDIO QUIMICO Y ASPECTOS FARMACOLOGICOS DE UN ANTICONCEPTIVO VEGETAL

Resumen del trabajo de tesis presentado por MARTHA ELISA HUNTER Z. y ANA VICTORIA BECERRA C., para optar al título de Químico - Farmacéutico.
Presidente de Tesis: Doctor ENRIQUE NÚÑEZ OLARTE.

INTRODUCCION

Actualmente son numerosas las informaciones relacionadas con el estudio y la aplicación de agentes anticonceptivos de origen vegetal (3, 4, 10, 16, 20, 26, 44, 45, 46). Una información ocasional sobre el empleo empírico de conocimientos efectuados con una planta de nombre vulgar "cucaracho" o "Zayno rayado", nos entusiasmó hasta el punto que resolvimos estudiarla a fondo.

Al efectuar una consulta bibliográfica, no se encontró ninguna referencia sobre estudio farmacológico o químico de esta planta.

En efecto la identificamos como Dieffenbachia maculata (también denominada Dieffenbachia amoena).

El objetivo principal de este trabajo corresponde a la identificación de los principios activos de la planta y su relación con las respuestas farmacodinámicas que ellos presentan sobre los órganos de reproducción, mostrándose así su actividad anovulatoria y demostrando científicamente su empleo empírico.

Lógicamente el trabajo comprende tres partes fundamentales: a) El estudio botánico y su exacta identificación, de acuerdo con las normas dictadas por el Primer Congreso Panamericano de Bioquímica y Farmacia de La Habana (1948). b) Las técnicas de extracción y los métodos de identificación de los principios activos.

c) *El ensayo farmacodinámico con experiencias en animal, estudio histopatológico y aspectos secundarios de la actividad anticonceptiva.*

En nuestros días no se escapa la importancia tanto médica como social que un agente anticonceptivo autóctono presenta en el medio latinoamericano y la incidencia que ello pueda traer sobre la economía farmacéutica del país.

Este trabajo se desarrolló en los "Laboratorios de Investigaciones Fitoquímicas del Departamento de Farmacia", "Laboratorios de Farmacología", y "Laboratorios de Análisis Orgánico" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional, y en la "Sección Gineco - obstétrica del Departamento de Patología del Instituto Materno Infantil".

ESTUDIO BOTANICO

A) CLASIFICACION BOTANICA (11, 47)

La planta conocida comercialmente como *Dieffenbachia Amoena*, es una variedad obtenida en cultivo de la *Dieffenbachia Maculata* (Lood) G. Don in Sweet, a la cual todavía no se le ha dado un nombre infraespecífico.

División: Angiospermas.

Clase: Monocotiledóneas.

Orden: Espadicifloras.

Familia: Aráceas.

Género: *Dieffenbachia*.

Especie: *Maculata*.

1. *Sinónimos:*

Dieffenbachia amoena.

Dieffenbachia Medellín.

2. *Nombres vulgares: (38)*

Departamento de Antioquia: "Cucaracho".

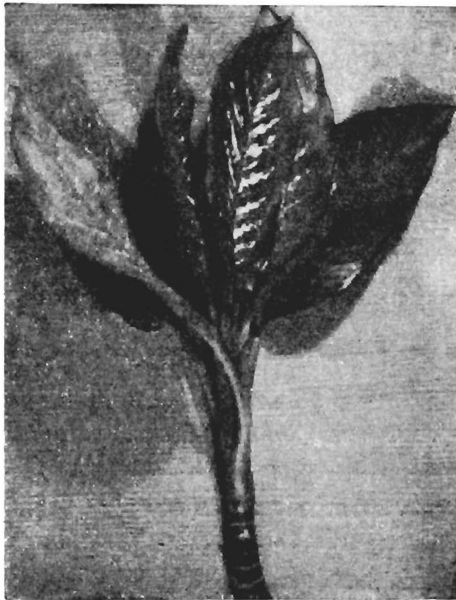
Departamento de Cundinamarca: "Cucaracho", "Zayno Rayado".

Departamentos de Norte de Santander y Santander: "Cucaracho".

B) DESCRIPCION BOTANICA (18)

La planta *Dieffenbachia amoena* se presenta en forma de un arbusto de un metro de altura y puede llegar hasta una altura de 3,5 metros. Tallos carnosos, duros y rígidos; las hojas oblongadas, con pecíolo fuertemente aplanado, son de color verde profundo, el haz es brillante y presenta manchas blanquecinas irregulares a lo largo de los nervios secundarios en disposición pinnada; el envés es opaco y su color verde es más claro.

La inflorescencia, con pedúnculo y espata inflada en utrículo, que alberga la porción basal femenina del espádice, cuyos estigmas son verdes con pétalos blancos; la parte superior del espádice corresponde a la parte masculina de la inflorescencia, con estigmas de pétalos rosados. (Fotografía N° 1).



DIEFFENBACHIA MACULATA

C) DISTRIBUCION GEOGRAFICA (38)

Especie difundida por toda América tropical. En Colombia se encuentra subespontánea en el Vaupés, Chocó, Valle del Cauca y Santander, en lugares húmedos y en el cauce hondo de pequeñas

quebradas. Se cultiva como planta ornamental en todos los climas medios del centro de Colombia. En Medellín hay un cultivo relativamente grande con el fin de exportar "semillas", trozos de tallo y rizoma, ya que es plantada en Miami y en otros lugares como una planta muy ornamental.

ASPECTOS FARMACOLOGICOS

Aunque el presente trabajo corresponde esencialmente al estudio fitoquímico de la planta, nos pareció que la experimentación farmacológica era indispensable si queríamos demostrar la relación teórica que existe entre la estructura química y la farmacodinamia. Pretendíamos además comprobar la utilidad de su uso empírico por mujeres indígenas.

Sin embargo, sólo nos permitimos mostrar las respuestas cualitativas, porque consideramos que se requiere un estudio más amplio y especializado para confirmar con certeza tanto el mecanismo de acción como los efectos cuantitativos del fármaco.

Estamos seguras del gran interés que puede presentar un trabajo farmacológico completo de tan llamativa planta. Seguramente experiencias más detalladas y específicas demostrarán la actividad anticonceptiva que únicamente pretendemos mostrar con estos ensayos preliminares.

Iniciamos los ensayos farmacológicos con la adaptación de los animales a condiciones ambientales como régimen alimenticio, familiarización en cada jaula, para evitar contratiempos posteriores, puesto que durante este período pudimos seleccionar los animales aptos para la experimentación que deseábamos realizar.

Por otra parte obtuvimos un dato promedio de la cantidad de agua bebida por cada ratón para así obtener una base para los cálculos de la dosis del extracto que se debería administrar diariamente.

El cuadro número 1 muestra el control de la cantidad de agua bebida diariamente por cada uno de los ratones. Así obtuvimos un volumen promedio de 3,6 ml. diarios.

Con este dato y teniendo en cuenta que una mujer de 60 kg. de peso promedio, toma diariamente en forma de infusión 50 gm.

CUADRO NUMERO 1

VOLUMEN PROMEDIO DIARIO DE AGUA INGESTA

Jaula	PRIMERA SEMANA		SEGUNDA SEMANA		TERCERA SEMANA	
	Promedio jaula	Promedio ratón	Promedio jaula	Promedio ratón	Promedio jaula	Promedio ratón
1	41,12	4,55	31,70	3,95	35,00	4,37
2	37,42	3,74	24,57	2,45	34,33	3,43
3	38,71	4,30	34,00	3,99	41,83	4,95
4	41,85	5,32	29,14	3,64	40,05	5,00
5	30,14	3,01	35,00	2,50	32,16	3,21
6	30,71	3,07	26,83	2,68	26,50	2,60
7	31,57	3,15	30,00	3,00	28,66	2,86

1ª semana: 3,86 ml.

Promedio diario/ratón 2ª semana: 3,17 ml.

3ª semana: 3,77 ml.

Promedio final del volumen diario de agua bebido por cada ratón: 3,6 ml.

de la planta, la cantidad equivalente será de 5 ml. diarios de extracto 1:1 de la droga seca. Por consiguiente su dosis sería de 0,85 gm. de planta/kg. de peso.

Si consideramos un peso promedio de 25 gm. por cada animal, su dosis diaria sería de 0,02 gm. de planta/kg. de peso. Esta dosis debe estar contenida en los 4 ml. de volumen diario calculado para cada ratón. Así obtuvimos una dilución básica de 0,5% y una dilución máxima del 4,0%.

Con estos datos y las informaciones de su uso empírico, empezamos un tratamiento con la distribución y posología indicados en el cuadro número 2.

CUADRO NUMERO 2
DISTRIBUCION Y POSOLOGIA

Lote	Número de animales	Dilución Ext. 1:1 hoja	Lote	Número de animales	Dilución Ext. 1:1 hoja
A1	30	0,5%	B1	30	0,5%
	10			10	
A2	30	2,0%	B2	30	2,0%
	10			10	
A3	30	4,0%	B3	30	4,0%
	10			10	
A	30	Agua	B	30	Agua
	10			10	

Se emplearon sendos extractos de hoja y de tallo (3, 10, 28, 51), porque en este tiempo de nuestro estudio aún no teníamos resultados fitoquímicos sobre principios activos constituyentes de la planta.

En el cuadro número 3 se tabularon el número de crías de cada una de las hembras sometidas a tratamiento con las diferentes diluciones de extractos de hoja y de tallo, y el número de crías de cada una de las hembras que constituyeron el grupo patrón. El número promedio de crías obtenido en la experimentación con el grupo testigo, coincidió con los datos estadísticos sobre el número de crías por hembra suministrados por el I. C. A. sobre la colonia de ratones empleada.

Relacionando el número de crías por hembra en tratamiento con el número promedio de crías para el grupo testigo, obtuvimos una relación hembras tratadas/hembras control para cada una de las hembras tratadas.

En la parte inferior del cuadro mostramos la rata de crecimiento para tallo y hoja dividiendo la suma de promedios hembras tratadas/hembras control por el número total de hembras en tra-

CUADRO NUMERO 3
 NUMERO DE CRIAS EN SEIS SEMANAS

PATRON			T R A T A M I E N T O										
Hembras	Dieta normal	Tallo 0,5%	Relación hembras tratadas hembras control	Tallo 2%	Relación hembras tratadas hembras control	Tallo 4%	Relación hembras tratadas hembras control	Hoja 0,5%	Relación hembras tratadas hembras control	Hoja 2%	Relación hembras tratadas hembras control	Hoja 4%	Relación hembras tratadas hembras control
Nº 1	8	4	0.48	0	0.0	11	1.32	8	0.96	5	0.6	0	0.0
Nº 2	9	0	0.0	0	0.0	6	0.96	0	0.0	6	0.72	0	0.0
Nº 3	8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

$$\text{Promedio total tallo} = \frac{\text{Suma promedios individuales}}{\text{Número de hembras}} = 0.3$$

$$\text{Promedio total hoja} = \frac{\text{Suma promedios individuales}}{\text{Número de hembras}} = 0.25$$

— II —

tamiento. Así obtuvimos una rata de reproducción para la hoja de 0,26 y para el tallo de 0,30, lo cual nos indica una disminución en la fertilidad en un 74,0 y 70,0%.

En él puede observarse un efecto anticonceptivo significativo, excepto en las hembras tratadas con la dilución al 4.0% de tallo. Se explica fácilmente este fenómeno, si consideramos que en esta dilución por ser la más concentrada, las características anticonceptivas dejan de presentarse, como sucede con los anticonceptivos orales del progestano, cuando hay dosis excesiva (fenómeno de rebote). (49).

Por otra parte es llamativo el hecho de obtener un promedio de natalidad correspondiente al 8,33 para cada hembra control (Cifra que está de acuerdo con los antecedentes promediales de la cepa escogida) y el 0,0% de natalidad para la mayoría de las hembras tratadas.

El efecto anticonceptivo de los extractos de la *Dieffenbachia* fue reversible y la mayoría de los animales apareados resultaron preñados después del retiro de la droga; las crías resultantes no tuvieron ningún defecto visible de nacimiento.

Con el fin de comprobar aún más los resultados anteriores, iniciamos un nuevo tratamiento que nos permitiera efectuar un pequeño estudio histopatológico de los órganos sexuales del animal escogido para nuestra experimentación. Del primer ensayo efectuado según como lo describimos en la parte correspondiente a Material y Métodos, no pudimos obtener ningún resultado, debido a errores cometidos en la obtención de los cortes microscópicos de los órganos sexuales. Siguiendo la insinuación del doctor Alvarado, realizamos segundo ensayo con el cual obtuvimos los resultados a que a continuación nos referiremos.

OBSERVACIONES MACROSCOPICAS DE LOS ORGANOS REPRODUCTORES *

Hembra control N° 1:

Utero con cuerno derecho de 3 cm. de longitud y 0,3 cm. de diámetro. Vagina cornificada, ovarios pequeños sin mucho folículo.

* Estudio realizado por el doctor Ricardo Alvarado del Instituto Materno Infantil.

Hembra control N° 2:

Utero con cuernos de 3 cm., ovarios con folículos, vagina cornificada.

Hembra tratada N° 1:

Utero con cuernos delgados y ovario congestionado.

Hembra tratada N° 2:

Cuernos del útero normales y ovario congestionado.

Hembra tratada N° 3:

Cuernos del útero de 3 cm. de longitud y ovario congestionado.

Hembra tratada N° 4:

Utero con cuerno derecho más largo que el izquierdo. Ovario sin modificaciones.

La congestión ovárica (signo de inflamación) observada en las hembras tratadas, impide la maduración folicular.

OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

Hembra control N° 1:

Corte vaginal: Vagina sin cornificación, estratos celulares 8 en promedio; la rata no estaba en estro.

Corte del ovario de 7 mm. de largo y 2,5 mm. de espesor.

Corte del útero a nivel de los dos cuernos: muestra cavidad triangular tapizada por un epitelio cilíndrico, pseudoestratificado con una hilera de células.

Hembra control N° 2:

Corte vaginal: Se ve la cornificación de las capas superficiales de la vagina y una altura de epitelio con 8 capas, que indica la fase estrogénica.

Corte del ovario: Corte de 7 mm. de longitud y 5 mm. de espesor.

Corte del útero a nivel de los dos cuernos: Tapizado por una capa de epitelio cilíndrico, hay algunas glándulas quísticas dentro

del miometrio; hay infiltración del estroma del endometrio por células eosinófilas.

Corte del útero a nivel medio de los cuernos: Cavidad endometrial en forma de H, tapizada por un epitelio cilíndrico y en la parte inferior se observan glándulas y un estroma con células mayores, con infiltración de células eosinófilas.

Hembra tratada N° 1:

Corte vaginal: No hay cornificación del epitelio vaginal, estratos celulares 5.

Corte del útero a nivel de los cuernos: Cavidad endometrial en forma de H; epitelio cilíndrico pseudoestratificado, se observan algunas glándulas en el estroma.

Corte del útero a nivel medio: Cavidad ovalada, tapizada por un epitelio cilíndrico y algunas glándulas en el estroma.

Hembra tratada N° 2:

Ovario: Corte de 9 mm. de longitud por 5 mm. de espesor.

Corte del útero a nivel de los cuernos: Infiltración por eosinófilos del estroma. Cavidad uterina en forma de H, epitelio cilíndrico con vacuolas que indican secreciones.

Corte del útero a nivel medio: Cavidad tapizada por un epitelio cilíndrico con muchas vacuolas, infiltración de eosinófilos, glándulas dentro del estroma.

Hembra tratada N° 3:

Vagina: Cornificada, promedio de estratos siete.

Ovario: Corte de 10 mm. de longitud y 7 mm. de espesor.

Corte del útero en la unión de los dos cuernos: Dilatación en la unión de la cavidad uterina, tapizada por un epitelio cilíndrico, infiltración del estroma por eosinófilos.

Corte del útero a nivel medio: Cavidad uterina dilatada, parte externa tapizada por epitelio cilíndrico con algunas glándulas en el estroma, infiltración de eosinófilos, se observan parásitos dentro del útero.

Hembra tratada N° 4:

Vagina: Se observó gran cornificación en la vagina.

Ovario: Corte de 9 mm. de longitud y 7 mm. de espesor.

Corte del útero a nivel de los dos cuernos: tapizado por un epitelio cilíndrico con vacuolas, infiltración por eosinófilos (indica inflamación).

Corte del útero a nivel medio: Cavidad uterina en forma de H, tapizada por epitelio cilíndrico con vacuolas; infiltración por eosinófilos y algunas glándulas dentro del estroma.

Las vacuolas e infiltración eosinófila, signos de inflamación en el útero, impiden la anidación del huevo.

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico en ovarios, por el Grupo de Investigación Hormonal del Hospital Materno Infantil, mostraron una serie de modificaciones foliculares que aparecen en el cuadro N° 4, donde se observa que para el cuerpo

CUADRO NUMERO 4

RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS EN OVARIOS

	HEMBRAS CONTROL			HEMBRAS TRATADAS				Relación dosis control
	N° 1	N° 2	Promedio	N° 1	N° 2	N° 3	Promedio	
Cuerpos amarillos	7	3	5	4	3	4	3,6	72%
Folículos Graff	12	7	10	4	15	6	7	70%
Folículos primordiales	22	15	18	16	7	8	10	55%
Folículos atrésicos	3	5	4	0	0	0	0	0%

amarillo hay una disminución del 28,0%, para el folículo de Graff un 30,0%, para los folículos primordiales un 45,0% y un 100,0% para los folículos atrésicos. Estas disminuciones en la esfera folicular de la rata hembra, están de acuerdo por lo observado por Pincus y colaboradores en 1965 (40), por Laksman y Nelson en 1962 (30) y confirmadas por Keele y Neyl en 1965 (27) quienes demostraron que sólo un tratamiento muy prolongado ocasionaría la total inhibición folicular en rata y ratón hembras. No está por demás hacer hincapié sobre el hecho que otros investigadores (23, 34, 43) con esteroides de diferentes naturalezas, confirmaron distintos grados de inhibición o disminución de la fase ovárica folicular y la significativa actividad antifertilizante.

ESTUDIO QUIMICO

En este capítulo nos referiremos a los resultados obtenidos en el estudio químico y farmacognóstico de la planta.

En un corte transversal de la hoja, se observó una epidermis superior con células isodiamétricas alargadas de paredes delgadas. Una sola capa de tejido en empalizada de células rectangulares con abundante cantidad de cloroplastos y drusas de oxalato de calcio distribuidas en todo el mesófilo. El tejido esponjoso contiene también cloroplastos y rafidios de oxalato de calcio. La epidermis inferior consta de células irregulares aplanadas de paredes delgadas, con estomas escasos distribuidos simétricamente. Se observaron algunos granos de almidón con el reactivo de Wagner.

En el corte transversal del tallo se observa ausencia de tejido suberificado. Epidermis con dos capas de células isodiamétricas con rafidios de oxalato de calcio en paquetes. El floema de células también isodiamétricas, contiene abundantes cloroplastos y escasos granos de almidón. El tejido vascular con vasos espiralados y gran cantidad de granos de almidón y paquetes con rafidios de oxalato de calcio. Los granos de almidón son simples, de forma bacilar, bastante irregulares y alargados con íleo excéntrico distal. El tamaño de los granos es de 2 a 10 micras.

En el cuadro número 5 se observan los resultados preliminares (5) para la investigación cualitativa de los principios activos contenidos en la hoja y en el tallo de la planta en estudio.

Se encontró que los valores de pH para las soluciones acuosas, fueron de 5,0 en la hoja y de 5,5 en el tallo; esta acidez nos indicó la posible existencia de ácidos orgánicos libres o de sustancias fenólicas. La reacción positiva con el cloruro férrico nos sugirió la presencia de sustancias tánicas o fenólicas en la hoja. El precipitado blanco que se presentó por la acción del acetato y del subacetato de plomo, nos indicó que podrían estar presentes ácidos orgánicos, tanoides, proteínas y mucinas que precipitan con el acetato, así como gomas, mucílagos y heterósidos que precipitan con el subacetato. Se comprobó la presencia de mucílagos y de gomas en el tallo, y se obtuvieron pruebas positivas para alcaloides tanto en la extracción acuosa como en la extracción con agua acidulada. Se encontraron también sustancias reductoras de los reactivos de Fehling y de Tollens.

CUADRO NUMERO 5

ENSAYOS PRELIMINARES

TIPO DE PREPARACION	REACTIVO	RESULTADOS	
		Tallo	Hoja
	Microsublimación	—	—
Principios activos solubles en agua	Rojo Congo	3,0—5,2	3,0—5,2
	Rojo de Metilo	4,4—6,2	4,4—6,2
	Fenoltaleína	--	--
	Anaranjado de Metilo	3,1—4,4	3,1—4,4
	Reacción con cloruro férrico al 5%.	—	+
Mucílagos y gomas	Acción del HCl al 2% y alcohol de 95%	+	—
	Reactivo de Bouchardat.	+	+
Alcaloides	Reactivo de Hager	+	+
	Reactivo de Mayer	+	+
	Reactivo de Wagner	+	+
	Reactivo de Valser	+	+
Substancias reductoras	Acción del acetato y del sub- acetato de plomo	+	+
	Reactivo de Fehling	+	+
	Reactivo de Tollens	+	+
Alcaloides en la extracción con agua acidulada	Reactivo de Bouchardat	+	+
	Reactivo de Hager	+	+
	Reactivo de Mayer	+	+
	Reactivo de Wagner	+	+
	Reactivo de Valser	+	+
Heterósidos cianogénicos	Reactivo de Grignard	—	—

En la marcha fitoquímica sistemática (1, 5, 12, 51) se comprobó la presencia de taninos en la hoja (39) así como de saponinas en la hoja y en el tallo. Se obtuvieron nuevamente pruebas positivas para alcaloides en el residuo del extracto alcohólico disuelto en ácido clorhídrico al 1%, pero las pruebas fueron todas negativas después de alcalinizar con amoníaco y extraer con éter y luego con cloroformo, lo que nos indicó la posible insolubilidad de los alcaloides en estos solventes. (Cuadro número 6).

Los cuadros números 7 y 8 corresponden a los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica según Floriani (5, 14). Como se puede observar, se presentaron resultados negativos para alca-

CUADRO NUMERO 6
 MARCHA FITOQUIMICA SISTEMATICA
 (M. E. Wall y col.)

PRINCIPIOS ACTIVOS	REACTIVO	RESULTADOS	
		Tallo	Hoja
Saponinas	Prueba de la espuma	+	+
	Prueba de hemólisis	+	+
Heterósidos cardiotónicos	R. de Keller - Killiani	-	-
	Reactivo de Legal	-	-
Alcaloides	Reactivo de Bouchardat	+	+
	Reactivo de Wagner	+	+
	Reactivo de Mandelin	+	+
Taninos	Reactivo de Gelatina - sal y cloruro férrico al 5%	-	+
	Reactivo de Braemer	-	+
Flavonoles	Acido clorhídrico conc. y li-maduras de magnesio	-	-
Fenoles	Cloruro férrico al 5%	-	-
	R. de Liebermann	-	-
Acidos orgánicos	Solución de bicarbonato de sodio al 10%	-	-
Esteroles insaturados	Reactivo de Liebermann-Bu-chard	+	+

CUADRO NUMERO 7

MARCHA FITOQUIMICA SISTEMATICA

(Luis Floriani)

EXTRACCION CON ETER/CLOROFORMO 1:1

PRINCIPIOS ACTIVOS	REACTIVO	RESULTADOS	
		Tallo	Hoja
Alcaloides	Reactivo de Bouchardat	—	—
	Reactivo de Wagner	—	—
	Reactivo de Hager	—	—
	Reactivo de Valser	—	—
	Reactivo de Mandelin	—	—
Fenoles	Reactivo de Liebermann	—	—
	Reactivo de Pougner	—	—
	Solución de cloruro férrico al 5%	—	—
Acidos orgánicos	Solución de bicarbonato de sodio al 10%	—	—
Grasas	Reactivo de Sudan III	+	+
Fitosterol	Reactivo de Liebermann - Buchard	+	+
Acidos grasos	Solución alcohólica saturada de violeta de genciana.	—	+
Principios amargos	Examen organoléptico	+	+
Resinas	Solución alcohólica de Fuscina - Anilina 1:1	—	+
Pigmentos flavónicos	Acido sulfúrico y sales de hierro	—	—

CUADRO NUMERO 8

MARCHA FITOQUIMICA SISTEMATICA

(Luis. Floriani)

DESTILACION POR ARRASTRE DE VAPOR

PRINCIPIOS ACTIVOS	REACTIVO	RESULTADOS	
		Tallo	Hoja
D E S T I L A D O			
	Reactivo de Hager	—	—
Alcaloides volátiles	Reactivo de Bouchardat	—	—
	Reactivo de Wagner	—	—
	Reactivo de Mandelin	—	—
	Reactivo de Sudan III	—	—
Aceites esenciales	Solución de nitrato de plata al 10%	—	—
Acidos volátiles			
R E S I D U O D E L A D E S T I L A C I O N			
Gomas y mucílagos	Acido nítrico conc.	+	+
Saponinas	Prueba de la espuma	+	+
	Prueba de Hemólisis	+	+
Alcaloides	Reactivo de Bouchardat	+	+
	Reactivo de Wagner	+	+
	Reactivo de Valser	+	+
	Reactivo de Hager	+	+
	Reactivo de Mandelin	+	+
	Taninos	Cloruro férrico al 5%	—
	Reactivo de Braemer	—	+

loides en la primera parte, que corresponde a la extracción con éter-cloroformo, pero las pruebas fueron todas positivas en la segunda parte de la marcha. Se obtuvieron también resultados positivos para fitosterol, (13) gomas, grasas, (19) saponinas en la hoja y en el tallo y además para resinas (35) y taninos en la hoja.

Confirmada la presencia de alcaloides y de saponinas y siendo los principios activos más importantes, encontrados en la *Dieffenbachia amoena*, procedimos entonces a su extracción, purificación e identificación, sin ninguna orientación sobre el grupo al cual podrían pertenecer, ya que no se encontró ningún estudio químico de esta planta, así como tampoco de su familia (*Araceae*), ni de su género (*Dieffenbachia*); solamente Fochtman y col. (15), hicieron un estudio de la *Dieffenbachia picta* y de la *Dieffenbachia exótica* para evaluar su toxicidad y dilucidar el constituyente tóxico, que se atribuyó a la sensibilidad a una sustancia de estructura proteica.

Con los resultados obtenidos en las marchas fitoquímicas, se comprobó la insolubilidad de los alcaloides en éter y en cloroformo, pero al iniciar el estudio de éstos, se hizo una extracción por el método de Stass Otto (2) obteniendo un resultado completamente negativo, con lo cual se demostró su total insolubilidad en dichos solventes.

Debido a esta insolubilidad se pensó en la presencia de glucoalcaloides y por el efecto anticonceptivo demostrado en el estudio farmacológico, la posible estructura esteroideal.

La extracción con alcohol amílico (solvente recomendado para glucoalcaloides) (2), comprobó esta suposición. En el cuadro número 9 aparecen los resultados de las reacciones efectuadas con esta extracción.

El rendimiento de alcaloides totales por este método fue de 2,72%. En base a este resultado, ensayamos las técnicas de I. Gyenes y T. Pierzchalski (21, 39), específicas para la extracción de glucoalcaloides con precipitación secundaria por alcalinización en medio acuoso con amoníaco. Ninguna de estas técnicas pudimos realizarla totalmente, debido a que los glucoalcaloides presentes no precipitaron en medio alcalino como sucede con algunos glucoalcaloides que poseen las propiedades de ión-dipolar. (32).

Anteriormente habíamos demostrado su insolubilidad en solventes no polares, que explicamos con la posibilidad de tener glu-

CUADRO NUMERO 9

REACCIONES DE LOS ALCALOIDES
EXTRACCION CON ALCOHOL AMILICO

REACTIVO	RESULTADO
Reactivo de Valser	Precipitado pardo oscuro
Reactivo de Wagner	Precipitado pardo oscuro
Reactivo de Bouchardat	Precipitado pardo oscuro
Reactivo de Mayer	Precipitado pardo oscuro
Reactivo de Mandelin	Coloración parda rojiza-verde limón
Acido sulfúrico concentrado	Coloración rosa violácea-parda-azul violeta-violeta
Acido nítrico concentrado	No hubo coloración
Acido clorhídrico concentrado	No hubo coloración

coalcaloides, pero más tarde en la hidrólisis de estos glucoalcaloides, encontramos que tampoco el aglicón precipitaba por alcalinización en medio acuoso; esto no concuerda con las propiedades de las aminas orgánicas que son generalmente solubles en solventes orgánicos pero no en agua; si consideramos estos glucoalcaloides como sustancias con propiedades de ión-dipolar, en el cual hay un grupo ácido ionizado y un grupo amino se encuentra protonado a un pH neutro; para lograr la obtención de estos glucoalcaloides por los métodos de I. Gyenes y T. Pierzchalski, habríamos tenido que buscar el pH correspondiente al punto isoeléctrico en el cual sí hubiésemos logrado la separación por precipitación de los glucoalcaloides (9).

Para la extracción definitiva de los glucoalcaloides, se empleó el método de Lahary y col. (29) con el cual se obtuvo un rendimiento de 0,91% de alcaloides totales.

De los diferentes sistemas de solventes empleados para la separación de los glucoalcaloides por cromatografía sobre capa fina anotados en el cuadro 10 (17, 24, 25, 46, 55) se seleccionó el sis-

CUADRO NUMERO 10
SOLVENTES ENSAYADOS PARA ALCALOIDES

NUMERO 1		NUMERO 2		NUMERO 3		NUMERO 4	
n-butanol	4	n-butanol	4	n-butanol	3	n-butanol	3
Acido acético	1	Acido fórmico	1	Etanol	1	Acetona	1
Agua	5	Agua	5	Acido acético	1	Acido acético	1
Usar fase orgánica		Usar fase orgánica		Agua	3	Agua	1
NUMERO 5		NUMERO 6		NUMERO 7		NUMERO 8	
Etanol	5	Etanol	50	Cloroformo	25	Cloroformo	60
Dioxano	40	Acido fórmico	10	Acido acético	10	Acido acético	5
Benceno	50	Agua	10	Metanol	65	Metanol	35
Amoniaco conc.	5	Formamida	30				
NUMERO 9		NUMERO 10		NUMERO 11		NUMERO 12	
n-butanol	50	Benceno	50	Cloroformo	47	Cloroformo	60
Cloroformo	10	Acetona	50	Metanol	47	Metanol	35
Amoniaco conc.	4	Agua	2	Acido acético	10	Acido acético	5
NUMERO 13		NUMERO 14		NUMERO 15		NUMERO 16	
Acetato de etilo	50	n-butanol	3	Cloroformo	80	Metanol	50
Benceno	50	Piridina	1	Metanol	15	Cloroformo	45
Acido acético	20	Agua	1	Acido acético	5	Acido acético	5
NUMERO 17		NUMERO 18		NUMERO 19		NUMERO 20	
Cloroformo	50	Cloroformo	55	Metanol	60	Metanol	55
Metanol	45	Metanol	45	Cloroformo	35	Cloroformo	45
Acido acético	5	Acido acético	5	Acido acético	5	Agua	5
NUMERO 21		NUMERO 22		NUMERO 23		NUMERO 24	
Cloroformo	70	Cloroformo	90	Metanol	50	Metanol	55
Metanol	30	Acido acético	10	Cloroformo	50	Cloroformo	45
						Acido acético	5
						Agua destilada	2

tema de solventes número 24 constituido por: metanol, cloroformo, ácido acético y agua (55:45:2:2), con el que se obtuvo la mejor separación de dos alcaloides coincidiendo los Rf obtenidos en el cromatograma del extracto de la hoja, con los obtenidos para el extracto del tallo.

El cuadro número 11 muestra los valores de Rf y las coloraciones presentadas con los diferentes reveladores (41, 46).

CUADRO NUMERO 11

CROMATOGRAFIA DE LOS ALCALOIDES

REVELADOR	COLORACION	
	Alcaloide Nº 1	Alcaloide Nº 2
Reactivo de Dragendorff	Anaranjada	Anaranjada
Tricloruro de antimonio al 20% en cloroformo	Amarilla parda	Parda oscura
Acido ortofosfórico al 50% en agua	Amarilla	Parda
Acido fosfomolibdico al 5% en etanol	Azul oscura	Azul oscura
Valor de "Rf"	0,52	0,70

Es importante anotar que los alcaloides presentaron coloraciones con los reveladores específicos para estructuras esteroidales (46).

Al efectuar la separación de los dos alcaloides por cromatografía de preparación, (31, 42) se observó la descomposición de estos al evaporar el dioxano por calentamiento, resolvimos entonces hacer una hidrólisis ácida sobre cada uno de los alcaloides separados, demostrándose la presencia de glucosa en los productos de hidrólisis por medio de cromatografía sobre papel (22, 50).

Con los glucoalcaloides separados por cromatografía en columna y su correspondiente aglicón obtenido después de hidrólisis, realizamos la identificación de estos por sus reacciones químicas (37). En el cuadro número 12 se observan los resultados obtenidos que nos confirman claramente la estructura glucoesteroidal y ade-

CUADRO NUMERO 12

IDENTIFICACION DE LOS ALCALOIDES POR SUS REACCIONES QUIMICAS

REACTIVO	ALCALOIDE NUMERO 1	ALCALOIDE NUMERO 2	AGLICON
Presencia de nitrógeno	Positiva	Positiva	Positiva
Punto de fusión	125 C con descomp.	200 C con descomp.	—
Solubilidad	Soluble en agua, metanol y etanol. Insoluble en éter, cloroformo y benceno.	Soluble en agua, metanol y etanol. Insoluble en éter, cloroformo y benceno.	Soluble en éter y en cloroformo
Producción de espuma	No se presenta	No se presenta	No se presenta
Reactivo de Tollens	Formación del espejo de plata	Formación del espejo de plata	Formación del espejo de plata
Reactivo de Fehling	Reducción del reactivo	Reducción del reactivo	No hubo reducción
Resorcinol en ácido acético glacial y ácido sulfúrico conc.	Anaranjado - rojo vino	Anaranjado - rojo vino	Anaranjado - rojo cereza - rojo vino
Vainillina en ácido acético glacial y ácido sulfúrico en frío.	Rosado - rojo cereza	Rosado	Anillo pardo rodeado de halo rojo - vino
Vainillina en ácido acético glacial y ácido sulfúrico conc. en caliente.	Anaranjado - rojo vino - rojo sangre	Anaranjado - rojo violáceo	Anaranjado pardo
Acido sulfúrico concentrado en caliente.	Anaranjado - rojo pardo	Anaranjado pardo	Anaranjado pardo
Acido fosfomolibdico.	Azul oscuro	Azul oscuro	Azul oscuro
Reactivo de Liebermann - Buchard.	Rojo vino	Rojo vino	Rojo vino

más por la presencia de nitrógeno su origen alcaloidal (8). Es importante observar que los puntos de fusión son elevados con descomposición lo cual está de acuerdo con la forma de ión dipolar en estado sólido, porque el ión dipolar es esencialmente una sal interna, la cual debe poseer un elevado punto de fusión frecuentemente con descomposición.

Es importante anotar, que en el cromatograma de la mezcla de los glucoalcaloides y de cada uno de estos separados por la cromatografía de preparación que permitió la separación de estos completamente puros, el alcaloide número 1 se desdobló en dos manchas, mientras que el número 2 presentó una sola mancha; esto nos hace pensar que los dos glucoalcaloides son isómeros y que la forma más estable es la del glucoalcaloide número 2, lo cual nos parece muy factible si tenemos en cuenta que las reacciones específicas efectuadas nos demostraron su estructura esteroidal, donde el fenómeno de isomería se puede presentar; además ambos glucoalcaloides poseen como azúcar la glucosa y como veremos más adelante, estos glucoalcaloides presentan al I.R. espectros muy similares.

A continuación nos referiremos al análisis de los espectros al I.R. de los alcaloides números 1 y 2.

Para su análisis seguimos las indicaciones encontradas en la bibliografía (6, 7, 36), según las cuales para el estudio de un espectro debe considerarse en primer lugar todo el conjunto y luego las principales bandas de absorción con su aspecto e identidad; nunca deben pasarse por alto los pequeños picos que aparecen tanto sobre la línea principal como sobre las bandas (hombros, espaldas), lo mismo que la presencia de dobletes y tripletes ya que algunas veces son decisivos para una interpretación correcta.

Observando el conjunto de los espectros vemos que no son compuestos aromáticos y según la absorción en las diferentes regiones, encontramos la presencia de un grupo amino secundario, grupo $-\text{CH}_3$ y grupo carbonilo.

Observamos en el análisis de los espectros al I.R. que tanto la región de los grupos funcionales, como la región de las huellas digitales de ambos espectros son muy semejantes. Esta semejanza nos confirma la isomería antes anotada de los dos glucoalcaloides.

Para finalizar el análisis de los espectros al I.R. de los dos glucoalcaloides aislados, queremos anotar la similitud existente

BANDAS OBSERVADAS EN EL ESPECTRO NUMERO 1

POSICION		CARACTERISTICAS
Bandas μ	Bandas cm.^{-1}	
3,10	3.226	Banda ancha y nítida.
3,51	2.849	Banda nítida y aguda.
3,80	2.632	Banda muy pequeña. (Pico de ciclohexano).
5,85	1.709	Banda aguda y nítida.
6,0-6,20	1.667-1.613	Hombro doblete.
6,45	1.590	Hombro.
7,25	1.269	Banda en forma de tijera.
10,90	917	Banda muy débil.
11,40	878	Banda muy débil.

BANDAS OBSERVADAS PARA EL ESPECTRO NUMERO 2

POSICION		CARACTERISTICAS
Bandas μ	Bandas cm.^{-1}	
2,9-3,0	3.448-3.279	Banda ancha y nítida.
3,45	2.899	Banda nítida aguda.
3,85	2.597	Banda pequeña.
5,82	1.721	Banda nítida y aguda.
6,0-6,15	1.667-1.626	Hombro doblete.
7,25	1.279	Banda en tijera.
10,9	917	Banda pequeña muy débil.
11,35	881	Banda pequeña muy débil.

entre el I.R. de los glucoalcaloides extraídos de la planta *Solanum marginatum* con los I.R. de los glucoalcaloides aislados de la planta *Dieffenbachia amoena*.

Así terminamos el estudio químico de los glucoalcaloides presentes en la *Dieffenbachia amoena*; de todos los métodos químicos e instrumentales de análisis efectuados, obtuvimos como resultado la separación de dos glucoalcaloides esteroideos isómeros. Nos es imposible dar su estructura determinada por carecer de los elemen-

tos necesarios para definirla, como son sus espectros de masa y de resonancia nuclear magnética.

Continuando con la explicación de los resultados obtenidos en el curso del estudio químico de la planta, nos referiremos ahora al estudio de las saponinas.

En las marchas fitoquímicas según M. E. Wall y Col. y Floriani, se demostró la presencia de saponinas con las pruebas de hemólisis y de la espuma positivas. Siendo principios fundamentales en nuestro estudio, iniciamos éste, con una extracción preliminar (33) que nos permitió clasificar las saponinas presentes en saponinas esteroidales. (51, 52).

Pasamos a la extracción de las saponinas esteroidales siguiendo el método de M. E. Wall y Col; posteriormente hicimos una hidrólisis ácida para la obtención de las sapogeninas (51, 52, 53, 54, 55) que se utilizaron para la separación por cromatografía en capa fina (41, 46). En el cuadro número 13 se observan los diferentes sistemas de solventes ensayados para esta separación; el sistema número 24 se seleccionó para la obtención de las sapogeninas puras.

Como los cromatogramas para las sapogeninas del tallo mostraron manchas muy poco significativas, continuamos únicamente con la separación e identificación de las sapogeninas de la hoja.

En el cuadro número 14 podemos observar que en las tres extracciones efectuadas por el método de M. E. Wall y col. solamente dos de las manchas que aparecieron en los cromatogramas coincidieron en sus R_f y coloraciones con ácido ortofosfórico. Como explicación podemos decir que este fenómeno pudo ser causado, porque el material botánico recolectado no estaba constituido por plantas de una misma edad o por obtención de diferentes productos de hidrólisis, aunque el método de extracción de las sapogeninas por hidrólisis se procuró reproducir en idénticas condiciones para cada una de las tres extracciones. Por lo tanto únicamente se separaron por cromatografía de preparación las dos sapogeninas que fueron constantes en las diferentes extracciones efectuadas.

Las sapogeninas puras obtenidas en esta forma fueron utilizadas para el análisis al infrarrojo.

Siguiendo las mismas indicaciones que para el análisis de los espectros I.R. de alcaloides, continuaremos con el análisis de los espectros I.R. de las sapogeninas aisladas.

CUADRO NUMERO 13

SOLVENTES ENSAYADOS PARA SAPONINAS

NUMERO 1		NUMERO 2		NUMERO 3		NUMERO 4	
Cloroformo	80	Cloroformo	80	Cloroformo	70	Cloroformo	95
Acetato de etilo	20	Acetato de etilo	20	Acetona	20	Acetona	2,5
Acido acético	1	Acido acético	3	Acido acético	10	Acido acético	2,5
NUMERO 5		NUMERO 6		NUMERO 7		NUMERO 8	
Benceno	40	Benceno	60	Cloroformo	90	Cloroformo	90
Cloroformo	60	Cloroformo	40	Acido acético	5	Amoniaco conc.	5
NUMERO 9		NUMERO 10		NUMERO 11		NUMERO 12	
Acetato de etilo	40	Cloroformo	80	Benceno	90	Benceno	28
Eucaliptol	20	Acetato de etilo	20	Etanol	10	Cloroformo	72
NUMERO 13		NUMERO 14		NUMERO 15		NUMERO 16	
Cloroformo	92	Benceno	85	Benceno	99	Benceno	70
Metanol	2	Metanol	1	Metanol	1	Benceno - éter	30
NUMERO 17		NUMERO 18		NUMERO 19		NUMERO 20	
Cloroformo	60	Benceno	70	Benceno	75	Cloroformo	90
Benceno	10	Eter	30	Eter de petróleo	25	Acetona	10
NUMERO 21		NUMERO 22		NUMERO 23		NUMERO 24	
Benceno	90	Cloroformo	97	Cloroformo	85	Benceno	97
Cloroformo	60	Acetona	1,5	Acetona	5	Acetona	2,5
Etanol	30	Acido acético	1,5	Acido acético saturado	5	Acido acético saturado con agua	1,5

CUADRO NUMERO 14

CROMATOGRAFIA DE LAS SAPOGENINAS

NUMERO DE EXTRACCIONES	1	2	3	ACIDO ORTOFOSFORICO
	Rf	Rf	Rf	COLORACION
Tallo	0,04	0,04	0,04	Parda
	0,16	0,16	0,16	Parda oscura
	0,30	0,30	0,30	Parda
Hoja	0,25	0,25	0,25	Verde azulosa
	0,44	—	—	Violeta
	0,70	—	—	Parda
	0,89	0,89	0,89	Anaranjada
	0,97	—	—	Parda oscura

BANDAS OBSERVADAS EN EL ESPECTRO NUMERO 3

POSICION		CARACTERISTICAS
Bandas μ	Bandas cm.^{-1}	
3.45	2.899	Banda aguda y nítida.
5.75	1.739	Banda nítida.
7.25	1.379	Banda pequeña.
7.9	1.266	Banda pequeña.

BANDAS OBSERVADAS EN EL ESPECTRO NUMERO 4

POSICION		CARACTERISTICAS
Bandas μ	Bandas cm.^{-1}	
2.95	3.390	Banda pequeña no muy nítida.
3.2	3.125	Banda pequeña.
3.5	2.857	Banda nítida aguda.
5.8	1.724	Banda nítida aguda.
6.9	1.449	Banda pequeña.
7.28	1.374	Banda pequeña en tijera.
7.95	1.258	Banda pequeña aguda.

Comparando los espectros de las sapogeninas extraídas de la planta, con el espectro I.R. de la Hecogenina, observamos su similitud; en este caso igual que con los glucoalcaloides no podemos dar una estructura química definida; únicamente podemos afirmar que son sapogeninas esteroidales.

CONCLUSIONES

1. Según los datos suministrados al doctor Jesús Idrobo por el doctor Dans H. Nicolson del Smithsonian Institution y por el doctor George S. Bunting de la Universidad Central de Venezuela, Instituto de Botánica Agrícola, concluimos que la planta motivo de nuestro estudio es una variedad de la *Dieffenbachia maculata* (Lood). El nombre *Dieffenbachia amoena* es un nombre comercial.

2. Se demostró actividad antifertilizante de los extractos de la planta. Extracto de hoja produjo disminución de la fertilidad en un 74,0% y el extracto de tallo una disminución del 70,0%. Los resultados obtenidos tanto experimentales como histopatológicos, nos permiten asegurar que la planta es un agente anovulatorio y por consiguiente se confirma su uso empírico.

3. Los extractos de la planta no produjeron efectos sobre la formación de las crías de las hembras tratadas (Acción teratógena negativa).

4. El efecto del extracto de la planta es reversible y no produce malformaciones en las crías (Acción teratógena negativa).

5. Como componentes más importantes de la planta, fueron aislados 2 glucoalcaloides y 2 sapogeninas.

6. Se comprobó la estructura esteroideal de las dos sapogeninas aisladas.

7. Los dos glucoalcaloides de la *Dieffenbachia maculata* contienen glucosa en su estructura.

8. Por las reacciones específicas y el análisis al infrarrojo, concluimos que los alcaloides son glucoalcaloides esteroidales.

9. Los dos glucoalcaloides son isómeros siendo más estable el glucoalcaloide número 2.

10. Las estructuras obtenidas son significativas en cuanto se refieren a la capacidad inhibidora sobre la ovulación y sobre las modificaciones histológicas del útero. En efecto, en los derivados

de la estructura esteroideal descuellan hoy día tanto los norprogestanos como los estrógenos anovulatorios con clara y definida actividad representada, principalmente, para los primeros por su influencia sobre el útero y para los segundos sobre la hipófisis anterior, ocasionándose así un complejo fisiológico al cual se llama acción anovulatoria o inhibición ovárica.

De los estudios espectrofotométricos al infrarrojo, se concluye que los principios activos de la planta tienen estructura esteroideal y al asociar estos con las respuestas farmacológicas e histopatológicas, nos permiten suponer que tales estructuras pueden identificarse dentro del grupo de los nosteroides anovulatorios posiblemente con un solo radical metilo y una cetona.

RÈSUMEN

Iniciamos el presente trabajo con la clasificación botánica de la planta y se llegó a la conclusión de que esta planta conocida comercialmente con el nombre de *Dieffenbachia amoena*, es una variedad obtenida en cultivo de la *Dieffenbachia maculata* Lood.

En el estudio farmacológico se determinaron en primer lugar las condiciones fisiológicas óptimas del animal de experimentación para verificar ingesta de alimentos y rata de crecimiento. Luego se administraron los extractos de la planta en dilución del 0.5, 2.0 y 4.0% comprobándose su acción anticonceptiva reversible y su efecto teratógeno negativo.

Posteriormente realizamos un estudio macroscópico de los órganos sexuales de ratas hembras tratadas con los extractos de la planta observándose como hechos significativos congestión ovárica y presencia de vacuolas e infiltraciones eosinófilas en el útero.

Realizamos un estudio histopatológico en ovarios de ratas sometidas a tratamiento con extractos de la planta, con el que se demostró una disminución en la actividad folicular de las ratas con significativa actividad antifertilizante.

El estudio químico de la planta lo iniciamos con investigaciones preliminares que nos condujeron al conocimiento de los principios activos, siendo los más importantes alcaloides y saponinas.

Procedimos a la extracción, purificación, separación e identificación de estos principios activos por métodos químicos e instru-

mentales, en esta forma se aislaron dos glucoalcaloides esteroidales isómeros y dos sapogeninas esteroidales.

La presencia de estos principios esteroidales es muy importante en lo que se relaciona con la acción anticonceptiva demostrada anteriormente.

SUMMARY

This plant known as *Dieffenbachia amoena* was botanically re-classified and it was considered as a variety obtained by cultural practices from *Dieffenbachia maculata* Lood.

For the pharmacological work, the optimal physiological conditions of the animal were determined, in order to know growth rate and food intake.

The extracts from the plant diluted to 0.5, 2.0 and 4.0% were given to rats. A reversible anticonceptive effect as well as a negative teratogenic effect were noted. The microscopical study of the sexual organs of the rats showed ovaric congestion, vacuoles and eosinofilic infiltrations in the uterus.

The ovaries of the animals treated with the plant extracts were subjected to histopathological studies. A decrease in the follicular activity and a significant antifertilizing activity was noted. The phytochemical study of the plant revealed the presence of alkaloids and saponins as the major constituents. These compounds were isolated, purified and identified. Two isomeric steroidal glucoalcaloids and two steroidal sapogenins were identified. These steroidal compounds play an important role in the anticonceptive action of the extracts.

RÉSUMÉ

Nous avons montré que *Dieffenbachia amoena* (dénomination commerciale) est une variété obtenue lors de la culture de *Dieffenbachia maculata*, Lood.

L'étude pharmacologique a été précédée par la détermination des conditions physiologiques optima des animaux de laboratoire quant à l'ingestion d'aliments et au taux de croissance. L'administration des extraits de la plante en concentration de 0.5, 2.0 et 4.0% provoque une activité anticonceptive réversible, mais un effet teratogène négatif.

L'examen macroscopique des organes sexuels des rates traitées avec les extraits de la plante montrent une congestion des ovaires, la présence de vacuoles et une infiltration éosinophile.

Des essais chimiques préliminaires ont permis d'isoler deux glucoalcaloïdes stéroïdaux et deux sapogénines stéroïdales. L'activité anticonceptive est en étroit rapport avec la présence de ces stéroïdes.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN'S. 1924. Commercial Organic Analysis. Blackiston Co. New York. Vol. II, p. 768.
2. BAMFORD, F. 1947. Poison their insolation and identification. 3^a edition. The Blackiston Co. Philadelphia. p. 180.
3. BARFKENECHT, F. C. J. Pharm. Sc. 57, 1607 (1968).
4. BURKHOLDER, E. Lancet. 1, 822 (1964).
5. CALDERÓN, E. Guía para Análisis de plantas y notas prácticas sobre Fitoquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1963.
6. CALDERÓN, E. Análisis al infrarrojo. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1966.
7. CALDERÓN, E. Notas sobre espectros al infrarrojo, del curso de Análisis Instrumental. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1971.
8. CHERONIS, N. D. and ENTRIKIN, J. 1957. Semimicro Qualitative Organic Analysis. Interscience Publishers. Inc. New York. p. 172.
9. CONN, E. E., y STUMPF, P. K. 1969. Bioquímica Fundamental, 2^a edición. Editorial Limusa - Wiley S. A. México. p. 86.
10. CRANSTON, E. M. J. Pharm. Explt. Therap. 82, 130 (1945).
11. ENGLER, A. 1915. Das Pflanzenreich Regni Vegetabilis conspectus. Verlag Von Wilhelm Engelmann. Leipzig. p. 51.
12. FARNSWORTH, N. R. J. of Pharm. Sc. 55, 327 (1966).
13. FLORIANI, L. 1938. Análisis Químico de los Vegetales. Librería Ed. Vásquez. Buenos Aires. p. 7-29.
14. FLORIANI, L. Idem. p. 59.
15. FOCHTMAN, F. and Col. Toxicology and applied Pharmacology. 15. 38-45. (1969).
16. GARCÍA, H. Botánica Médica. 1, 141 (1970). (Informe no publicado).
17. GERAH, G. y LUGARO, G. Chem. Abst. 63, 1825 f. (1965).
18. GRAF, A. Exótica. 2, 987. Fig. 118-123. (1959).
19. GRAJALES, J. 1965. Prácticas de Fitoquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
20. GUJRAL, M. L. and VARMA, D. R. Ind. Jour. Med. Res. 48, 48 (1960).
21. GYENES, I. Chem. Abst. 61, 4684c (1964).
22. HEFTMAN, E. 1961. Chromatography. Reinhold Publishing Corp. New York. p. 504.
23. HOLMES, R. L. and MANDL, A. M. J. Endocrinol. 24, 497 (1962).

24. HULTIN, E. *Acta Chem. Scand.* 20, 1588 (1966).
25. HULTIN, E. *Acta Chem. Scand.* 19, 588 (1965).
26. JUNE, E. J. *Endocrin.* 12, 252 (1955).
27. KEELE, C. A. and NEIL, E. 1965. *Samson Wright's Applied Physiology*. 2ª Ed. Oxford University Press. London.
28. KLEBER, J. J. *Am. Pharm. Sci. Ed.* 41, 218 (1952).
29. LAHARY, S. C. and MAITI, P. C. *Experientia*, 22, 464 (1966).
30. LAKSHMAN, A. B. and NELSON, W. O. *Nature*. 199, 608 (1963).
31. MANSKE, R. 1953. *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*. Academic Publishers. New York. Vol. III. p. 247.
32. MANSKE, R. 1960. *Idem*. Vol. VII. p. 344.
33. MOES, A. *Chem. Abst.* 66, 14011d (1967).
34. MUNSHI, S. R. J. *Reprod. and Fertil.* 5, 287 (1963).
35. MUÑOZ, J. E. 1950. *Guía para Análisis de Vegetales*. Editorial Talleres Gráficos Nacionales. Quito. p. 28.
36. NENDERTM, W. and ROPKE, H. 1965. *Atlas of Steroids Spectra*, Springer Verlag. New York.
37. PAECH, K. and TRACEY, M. V. 1965. *Modern Methods of Plant Analysis*. Springer Verlag. Berlin. p. 479.
38. PÉREZ, E. 1947. *Plantas Útiles de Colombia*. Editorial Talleres de la Imprenta Nacional. Bogotá. p. 152.
39. PIERZCHALSKI, T. *Chem. Abst.* 61, 4691d (1964).
40. PINCUS, G. and CHANG, M. C. *Endocrinology*. 59, 695 (1956).
41. RANDERATH, K. 1963. *Thin Layer Chromatography*, Academic Press. New York. p. 111 - 125.
42. RANDERATH, K. *Idem*. p. 71.
43. SAUNDERS, F. J. and ELTON, R. I. 1959. *Recent Progress in the Endocrinology of Reproduction*. Academic Press. New York. p. 227 - 255.
44. *SOUZAS, D. E., 1970. Notas etnobotánicas acerca de la flora amazónica de Colombia, en el II Simposio y Foro de Biología Tropical amazónica. Editado por J. M. Idrobo. Bogotá, p. 178 - 196.*
45. SKELTON, F. R. *Am. J. Phys.* 167, 379 (1951).
46. STAHL, E. 1965. *Thin Layer Chromatography*. Academic Press Publishers. New York, p. 262.
47. STRASBURGER, E. 1960. *Tratado de Botánica*. 5ª Edición. Manuel Marín & Cía. Editores. Barcelona, p. 595.
48. SUZUKI, H. *Chem. Abst.* 167, 379 (1951).
49. UFER, J. 1965. *Hormonoterapia en gineco-obstetricia*. Fundamentos y Práctica. 3ª Ed. Editorial Alhambra, S. A. Madrid.
50. VILLAR, P. V. 1953. *Cromatografía sobre papel*. Instituto Español de Fisiología y Bioquímica. Madrid. p. 135.
51. WALL, M. E. and COL. *J. Am. Pharm. Assoc.* 43, 1 (1954).
52. WALL, M. E. and COL. *An Chem.* 26, 325 (1964).
53. WALL, M. E. and COL. *An. Chem.* 24, 1336 (1952).
54. WALL, M. E. and COL. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4013 (1952).
55. WALL, M. E. and COL. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5791 (1952).