

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO QUÍMICO DE UNA FRACCIÓN METANÓLICA DE
LA PLANTA MEDICINAL, *Chenopodium murale*"

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

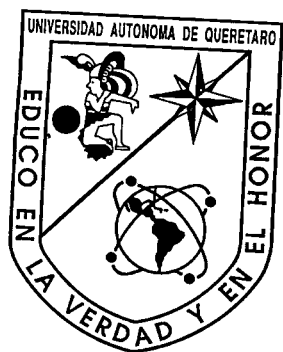
No. Adq. H 70 682

No. Título _____

Clas. TS

615.3239

R 696e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO QUÍMICO DE UNA FRACCIÓN METANÓLICA DE
LA PLANTA MEDICINAL, *Chenopodium murale*"

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H 70 682

No. Título _____

Clas. TS

615.3239

R 696e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO QUÍMICO DE UNA FRACCIÓN METANÓLICA DE
LA PLANTA MEDICINAL, *Chenopodium murale*”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
DIRECTOR

Dra. MARICELA GONZÁLEZ LEAL
SINODAL

Dra. DORA MARINA GUTÉRRIZ AVELLA
SINODAL

M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Antecedentes químicos y farmacológicos de especies de <i>Chenopodium</i>	3
II.1.1 Propiedades farmacológicas de especies del género	3
II.1.2 Compuestos aislados o identificados en especies de <i>Chenopodium</i>	5
II.1.2.1 <i>C. ambrosioides</i>	5
II.1.2.2 <i>C. album</i>	6
II.1.2.3 <i>C. ficifolium</i>	7
II.1.2.4 <i>C. quinoa</i>	7
II.2 Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>C. murale</i>	8
III. HIPÓTESIS	9
IV. OBJETIVOS	10
IV.1 General	10
IV.2 Específicos	10
V. METODOLOGÍA	11
V.1. Materiales	11
V.1.1 Para análisis cromatográficos	11
V.1.2 Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos	11
V.1.3 Equipos	12
V.2 Métodos	12

V.2.1 Fraccionamiento mediante cromatografía en columna	12
V.2.1.1 Columna abierta	12
V.2.2 Cromatografía en capa fina	14
V.2.3 Preparación de la solución reveladora de sulfato cérico para cromatografía en capa fina (CCF)	14
V.2.4 Purificación de los principios	14
V.2.4.1 Implementación de condiciones en cromatografía de líquidos	14
V.2.4.2 Purificación de los constituyentes de la fracción C	15
VI. RESULTADOS	16
VII. DISCUSIÓN	36
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. BIBLIOGRAFÍA	40

1

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción metanólica primaria IX de <i>C. murale</i>	16
2	Picos recolectados de la fracción secundaria C	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras químicas de algunos de los metabolitos aislados de <i>Chenopodium murale</i>	3
2	Marcha seguida durante los estudios químicos de la fracción metanólica primaria (IX)	13
3	Cromatograma de líquidos de alta resolución de la fracción C de <i>C. murale</i>	18
4	Espectro de RMN ^1H del pico CmLu-1	19
5	Ampliación de una porción del espectro de la Figura 3	20
6	Ampliación de la región de campo alto del espectro de la Figura 3	21
7	Espectro de RMN ^{13}C del pico CmLu-1	22
8	Espectro de RMN ^1H de CmLu-2	23
9	Región de campo alto del espectro de RMN ^1H de CmLu-2	24
10	Espectro de RMN ^{13}C de CmLu-2	25
11	Región de campo alto del espectro de RMN ^{13}C de CmLu2	26
12	Ampliación de una región del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-2	27
13	Espectro de RMN ^1H de CmLu-3	28
14	Ampliación de una región del espectro de RMN ^1H de CmLu-3	29
15	Ampliación de una región del espectro de RMN ^1H de CmLu-3	30
16	Ampliación de la región de campo alto del espectro de RMN ^1H de CmLu-3	31
17	Espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3	32
18	Ampliación de una región del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3	33
19	Ampliación de una región del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3	34
20	Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3	35

RESUMEN

Chenopodium murale, al igual que otros epazotes, se consume en México y en diversas partes del mundo, en forma de verduras, o té (infusiones o decocciones) para tratar padecimientos gastrointestinales, generalmente causados por parásitos, infecciones o simplemente por perturbaciones de los movimientos peristálticos del tubo digestivo. Sin embargo, se han descrito diversos efectos tóxicos para algunas de esas plantas, llegándose a reportar casos de fallecimiento por el consumo de epazotes. Para contribuir al conocimiento químico de esta especie vegetal, se llevó a cabo el presente trabajo, el cual consistió en el estudio preliminar del perfil químico de una fracción polar del extracto de *C. murale*. El análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de la fracción demostró la presencia de, al menos, quince compuestos. Algunos de los picos fueron recolectados y sus espectros de RMN registrados para tener una idea acerca de su naturaleza química. En la fracción estudiada, no se encontraron presentes los flavonoides ya descritos en la especie (kaempferol, herbacetina, quercetina). Este análisis permitió concluir que los compuestos presentes en esta fracción consisten en fenoles simples sustituidos con cadenas hidrocarbonadas que tienen metilos, metilenos y posiciones oxigenadas, incluyendo un carbonilo. Tales compuestos no han sido descritos en la especie con anterioridad, por lo que se requerirá la purificación final de los mismos para su identificación completa. De esta forma, se enriquecerá el conocimiento del perfil químico de esta especie ampliamente usada en la medicina tradicional de nuestro país.

I. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos de origen orgánico disponibles se obtienen de dos fuentes: aislamiento biodirigido a partir de los organismos vivos y la síntesis en laboratorio. Una proporción importante de todos los medicamentos vendidos son directamente extraídos de las plantas medicinales. Otros de los productos aislados de plantas se usan como materia prima en la semisíntesis de medicamentos o como modelos estructurales para la síntesis de fármacos con mayor actividad biológica y/o con menor toxicidad. Debido a la gran riqueza florística y la amplia cultura existente en el uso tradicional de plantas medicinales en México, nuestro país constituye una fuente potencial muy importante de nuevos productos con potencial terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades. La búsqueda de los principios activos presentes en esas plantas pasa necesariamente por el aislamiento y la caracterización estructural de los mismos, combinando ese proceso con la determinación de la actividad farmacológica de las sustancias.

Entre las enfermedades de mayor importancia en nuestro país se encuentran los padecimientos gastrointestinales y los cardiovasculares. Para tratar esas enfermedades, la mayoría de los que las padecen recurren a los remedios tradicionales, principalmente las plantas medicinales, las cuales se consumen en forma de maceraciones, infusiones (tés) o decocciones. Esas plantas pueden contener principios activos que contribuyen al control de los padecimientos, ejerciendo su acción farmacológica directamente sobre el tejido liso o produciendo un efecto tóxico sobre los posibles agentes patógenos causantes de la enfermedad.

La presente investigación se llevó a cabo en el marco de la búsqueda de nuevos principios activos sobre el sistema gastrointestinal a partir de la planta medicinal mexicana *Chenopodium murale* (quelite de pollo). Esta especie se consume en México como remedio tradicional para tratar diarreas, cólicos y parasitosis y quizás también como condimento por su semejanza con los epazotes comerciales. La planta también se consume en Egipto como verdura y

como ensalada. También es una de las especies más usadas en Yemen por los médicos tradicionales para tratar enfermedades infecciosas. Estudios anteriores a la presente propuesta han descrito la presencia en *C. murale* de compuestos con actividad hipotensiva. Sin embargo, también existen estudios que mencionan la existencia de metabolitos tóxicos en diversas especies del género.

El aislamiento y la identificación de más metabolitos en esta especie medicinal y alimenticia muy consumida en México permitirán enriquecer el conocimiento acerca de su potencial farmacológico y/o tóxico. La presente tesis se enfocó al estudio del perfil químico de una fracción polar (soluble en metanol) del extracto original de la especie.

II. ANTECEDENTES

II.1. Antecedentes químicos y farmacológicos de especies de *Chenopodium*

II.1.1 Propiedades farmacológicas de especies del género

Diversas especies del género *Chenopodium* se usan en el mundo para diversos propósitos. Por ejemplo, *C. graveolens* y *C. ambrosioides* son dos plantas que se consumen en México de manera indiscriminada como epazote para tratar parasitosis y como condimento. El estudio parcial del metabolismo secundario de algunas especies del género permitió identificar en los aceites esenciales de los extractos y en las preparaciones caseras, altas concentraciones de ascaridol (Figura 1), al que se ha atribuido un potente efecto antihelmíntico, aunque por su toxicidad, también ha sido responsable de fatalidades humanas. Se ha documentado al menos un caso de envenenamiento fatal por el consumo de *C. graveolens* (Montoya-Cabrera y col., 1996). Ese hecho ha conducido al desuso de esta especie medicinal en ciertos lugares.

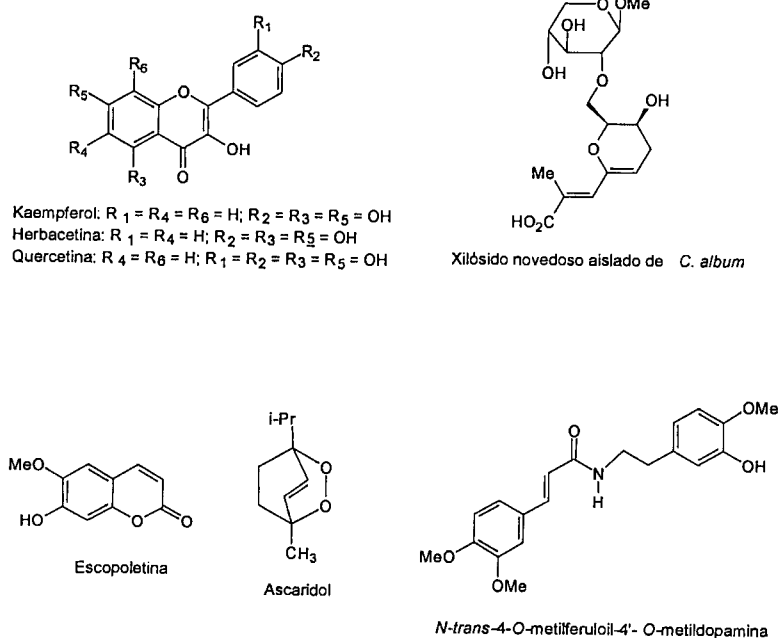


Figura 1. Estructuras químicas de algunos de los metabolitos aislados de *Chenopodium murale*.

En otros experimentos, se ha comprobado que cerca del 90% de la actividad nematocida de las infusiones de la planta se debe a otro componente hidrofílico diferente al ascaridol (MacDonald y col., 2004). Todavía se desconoce la identidad de ese componente.

Un estudio efectuado en dos aldeas cerca de Tarapoto, San Martín, en Perú, demostró que extractos de *C. ambrosioides* (nombre común: paico) ejercen efectos antiparasitarios en el 56% de los casos. La eficacia era del 100% para *Ancilostoma* y *Trichuris* y el 50% para ascariasis (Giove, 1996).

Se evaluó el daño genético inducido con decocciones e infusiones de *C. ambrosioides* sobre linfocitos humanos cultivados, demostrándose (a) un aumento de células con aberraciones cromosómicas e intercambios de cromatina con las células vecinas cuando las mismas fueron expuestas a ambas preparaciones de la planta, (b) una disminución de los índices mitóticos. Estos resultados sugieren un posible efecto genotóxico en el caso b) (Gandano y col., 2002).

En México, la decocción de *C. ambrosioides* tiene amplio uso en Chiapas y quizás en otras regiones del país para tratar la ascariasis. Un estudio etnomédico de campo realizado en aquella entidad puso de manifiesto que dosis aun muy altas de la infusión carecen del presunto efecto antihelmíntico sobre la ascáride adulta (Kliks, 1985). No se justifica por lo tanto el amplio y sostenido uso medicinal de la planta. En cambio, se determinó el alto contenido de ascaridol, metabolito asociado con diversos efectos tóxicos, incluyendo una alta citotoxicidad. Por esta última propiedad, se le han atribuido propiedades antineoplásicas a este compuesto (Efferth y col., 2002). Al mismo tiempo, a esta misma especie se le ha asociado una carcinogénesis, dado que su consumo en una región de Estados Unidos estuvo muy relacionado con una alta incidencia de carcinoma del esófago (Kapadia y col., 1978). La planta suele consumirse también por la población hispana de Nuevo México, Estados Unidos, como abortiva y emenagoga (Conway y Slocumb, 1979). Finalmente, a la especie se

le atribuyen propiedades antiparasitarias en la República Dominicana (Quinlan y col., 2002).

En China, se realizó un estudio de actividad biológica en ratones con el extracto etanólico de las frutas de *C. album*, lográndose comprobar su efecto antipruriginoso y las actividades antinociceptivas. Estos estudios apoyan la evidencia para el uso clínico de las frutas de *C. album* para tratar el prurito cutáneo (Dai y col., 2002). Mientras tanto, las partes aéreas jóvenes se cosen y comen como verdura. Se han reportado dos casos de reacción fototóxica después del consumo de esta especie y la exposición de los consumidores al sol. Se asume, sin evidencia, que la toxicidad se debió a la presencia de furanocumarinas en las partes consumidas (Calka y col., 2005).

Esas observaciones, a veces contradictorias, demuestran la necesidad de llevar a cabo evaluaciones científicas serias de los remedios tradicionales no sólo para buscar principios activos útiles, sino además y sobre todo, para poder fundamentar su uso, recomendar su retiro de la herbolaria, o la moderación de su consumo. Dado que por lo general, ni los consumidores de esas hierbas, ni los médicos tradicionales u ortodoxos asocian los padecimientos con la ingestión de las mismas, es imposible en la actualidad determinar con certeza la incidencia real de muertes por esa causa.

II.1.2 Compuestos aislados o identificados en especies de *Chenopodium*

II.1.2.1 *C. ambrosioides*

Una muestra comercial de aceite esencial de *C. ambrosioides* en Madagascar fue analizada por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) y mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN-¹³C). Los compuestos principales encontrados fueron los siguientes: ascaridol (41,8%), isoascaridol (18,1%), *p*-cimeno (16,2%), α -terpineno (9,7%) y limoneno (3,8%). Sin embargo, el ascaridol presenta isomerización termal parcial a isoascaridol y por lo tanto, la cantidad de ascaridol es subestimada por el análisis por CG. El contenido real de ascaridol e

isoascaridol (55.3% y 4.6 %, respectivamente) se obtuvo después del análisis combinado de la muestra por CG y RMN-¹³C (Cavalli y col., 2004).

Además de los metabolitos antes mencionados, cuatro hidroperóxidos monoterpénicos con actividad antitripanosómica fueron aislados de las partes aéreas de esta especie. Las estructuras de estos monoterpenos fueron establecidas mediante métodos espectroscópicos y correlaciones químicas como los (-)-(2S,4S)- y (-)-(2R,4S)-*p*-menta-1(7),8-dien-2-hidroperóxido y (-)-(1R,4S)- y (-)-(1S,4S)-*p*-menta-2,8-dien-1-hidroperóxido. Las actividades tripanocidas *in vitro* del ascaridol y de estos hidroperóxidos en contra de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fueron 23, 1.2, 1.6, 3.1 y 0.8 μ M (Kiuchi y col., 2002), respectivamente.

II.1.2.2 *C. album*

Se aislaron tres saponinas de las raíces de *C. album*. Una de ellas es un seco-glucósido (Lavaud y col., 2000). En otro estudio, siete amidas del ácido cinámico fueron descritas en *C. album*. Una de las amidas, la *N-trans-4-O*-metilferuloil-4'-*O*-metildopamina (Figura 1) se reportó como compuesto nuevo que tiene efectos sobre la germinación y el crecimiento de los dicotiledones de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) y de la cepa *Allium monocotyledon* (cebolla) (Cuttillo y col., 2003). Más recientemente, 16 nuevos apocarotenoides fueron aislados de *C. album* e identificados como: (3R,6R,7E,9E,11E)-3-hidroxi-13-apo- α -caroten-13-ona y (6S,7E,9E,11E)-3-oxo-13-apo- α -caroten-13-ona por análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Cinco de los compuestos conocidos fueron descritos anteriormente como solo sintéticos. Los mismos demostraron una actividad fitotóxica sobre la germinación y el crecimiento de la lechuga (DellaGreca y col., 2004). Recientemente, los mismos autores han aislado un nuevo xilósido de un monoterpeneo, cuya estructura se reporta en la Figura 1 (DellaGreca y col., 2005).

II.1.2.3 *C. ficifolium*

De las raíces de *C. ficifolium*, se aislaron las saponinas 3-O-β-D-glucopiranosido, ácido oleanólico 28-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosidurónico, además de los compuestos conocidos: estigmasterol-3-O-glucósido y ácido 3-O-β-D-glucopiranosidurónico, ácido oleanólico 28-β-D-glucopiranosido. El último compuesto, así como el ácido oleanólico, el β-sitosterol y su glucósido fueron aislados de las partes aéreas de la planta (Gohar y col., 2002).

II.1.2.4 *C. quinoa*

Por lo menos 16 saponinas fueron detectadas en las semillas de *C. quinoa*. Las cinco saponinas principales, previamente aisladas, fueron: 3-O-β-D-glucuronopiranosil ácido oleanólico 28-O-β-D-glucopiranosil éster, 3-O-α-L-arabinopiranosil hederagenina 28-O-β-D-glucopiranosil éster, 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-L-arabinopiranosil hederagenina 28-O-β-D-glucopiranosil éster, 3-O-α-L-arabinopiranosil ácido fitolacagénico 28-O-β-D-glucopiranosil éster, 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-L-arabinopiranosil ácido fitolacagénico 28-O-β-D-glucopiranosil éster. También se aisló una nueva saponina, el 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-L-arabinopiranosil ácido fitolacagénico. La actividad antifúngica en contra de *Candida albicans* y la actividad hemolítica de estos compuestos y los monodesmósidos derivados fueron evaluadas en eritrocitos, demostrando poca o nula actividad antifúngica, aunque los monodesmósidos tuvieron una mayor actividad hemolítica (Woldemichael y Wink, 2001).

Seis saponinas de triterpenoides fueron aisladas de las semillas de la "kancolla", una variedad dulce de *C. quinoa*. Estas fueron el ácido fitolacagénico 3-O-[α-L-arabinopiranosil-(1"→3')-β-D-glucuronopiranosil]-28-O-β-D-glucopiranosido, el ácido oleanólico 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1"→3')-α-L-arabinopiranosil]-28-O-β-D-glucopiranosido, hederagenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1"→3')-α-L-arabinopiranosil]-28-O-β-D-glucopiranosido, ácido fitolacagénico 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1"→3')-α-L-arabinopiranosil]-28-O-β-D-

glucopiranosido, ácido oleanólico 3-O-[β -D-glucuronopiranosil]-28-O- β -D-glucopiranosido, ácido oleanólico 3-O-[α -L-arabinopiranosil-(1" \rightarrow 3')- β -D-glucuronopiranosil]-28-O- β -D-glucopiranosido, y un nuevo compuesto: el ácido 3-O-[β -D-glucopiranosil-(1" \rightarrow 3')- α -L-arabinopiranosil]-28-O- β -D-glucopiranosido (Dini y col., 2001, 2002).

II.2. Antecedentes químicos y farmacológicos de *C. murale*

Estudios químicos previos a la presente propuesta condujeron al aislamiento y a la identificación de algunos flavonoides, los cuales incluyen el kaempferol y glicósidos del kaempferol, la herbacetina, la quercetina y una cumarina (escopoletina) (Figura 1) (El-Sayed y col., 1999; Gohar y col., 2000). Los flavonoides aislados mostraron una actividad hipotensiva, lo que convierte a esos metabolitos en potenciales agentes antihipertensivos (Gohar y Elmazar, 1997; Gohar y col., 2000). Por otra parte, en nuestro laboratorio y en lo que constituyó una evaluación farmacológica preliminar, se encontró que el extracto cloroformo-metanólico (1:1) obtenido a partir de la especie producía una inhibición de las contracciones espontáneas del íleon aislado de rata, mostrando un valor para la concentración inhibitoria mínima (CI₅₀) de 10.59 μ g/ml (Rojas y col., 1999, 2003). Eso no sólo confirma los resultados publicados con anterioridad, sino que constituye además un antecedente para la búsqueda de más candidatos con potencial farmacológico a partir de la especie.

III. HIPÓTESIS

La fracción metanólica del extracto de *C. murale* contiene fenoles simples con cadenas laterales alifáticas que pudieran contribuir a las actividades farmacológicas de la especie.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Llevar a cabo el estudio químico preliminar de una fracción metanólica de *C. murale* para el aislamiento y la posible caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en ella.

IV.2 Específicos

- Llevar a cabo el fraccionamiento del extracto metanólico mediante columna abierta sobre gel de sílice.
- Implementar condiciones analíticas en cromatografía de líquidos de alta resolución para la separación de los constituyentes individuales de una de las fracciones secundarias.
- Llevar a cabo un escalamiento a nivel preparativo para la purificación de los constituyentes individuales de la fracción seleccionada.
- Obtener los datos espectroscópicos de los principios aislados y establecer en lo posible su estructura química.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Para análisis cromatográficos

- Cromatofolios recubiertos de gel de sílice (silica gel 60 F₂₅₄, Merck).
- Tubos capilares, cámaras para cromatografía en capa fina de diversos tamaños y rociadores de vidrio.
- Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes (47 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro).
- Acrodiscos para la filtración de muestras (13 mm de diámetro y 0.2 µm de tamaño de poro).
- Jeringas micrométricas de vidrio y desechables de 100 y 150 µl para inyección de muestras.
- Jeringa de purga con capacidad de 10 ml.
- Loops (líneas de inyección) de diversas capacidades (5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 µl).
- Columnas de vidrio de diferentes tamaños para CC.
- Columnas analíticas PrepNova-Pak HR C₁₈ (3.9 x 300 mm y 19 x 300 mm, µBondapak) y aminopropilo (NH₂) (3.9 x 300 mm y 19 x 250 mm).

V.1.2 Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos

- Acetona, hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y agua grado reactivo (J. T. Baker y/o Mallinckrodt).
- Agua destilada Grado HPLC de la marca J. T. Baker y/o Mallinckrodt.
- Acetonitrilo grado HPLC de la marca Caledon o Mallinckrodt.
- Metanol grado HPLC de la marca J. T. Baker y/o Mallinckrodt.
- Reactivos para la preparación de la solución reveladora de sulfato cérico.

V.1.3 Equipos

- Parrilla eléctrica.
- Balanza analítica marca Ohaus (0.00001-250.0 g).
- Lámpara ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 366 nm.
- Aparato para punto de fusión Fisher-Johns provisto de un termómetro de 300 °C de alcance.
- Bombas de vacío.
- Sistema Cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de UV-visible programable 486, un detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millenium³² (Waters).

V.2 Métodos

V.2.1 Fraccionamiento mediante cromatografía en columna

V.2.1.1 Columna abierta

La muestra que constituyó el objeto del presente trabajo fue obtenida como fracción IX metanólica durante un estudio químico preliminar del extracto original llevado a cabo antes del inicio de la presente tesis; ésta fracción se seleccionó debido a que la mayoría de los compuestos con actividad biológica se encuentran en las fracciones más polares. La metodología seguida para los estudios químicos de esta fracción se resume en la Figura 2. Se pesaron 1.6828 g de la muestra y se adsorbieron en 1.8 g de gel de sílice. Posteriormente, se aplicó a la columna previamente rellena con la suspensión de gel de sílice hasta las dos terceras partes de su volumen. A continuación, se agregó sulfato de sodio anhidro sobre la muestra con la finalidad de protegerla contra el

rompimiento y controlar la humedad del ambiente. La elución de la columna se llevó a cabo agregando diferentes disolventes de menor a mayor polaridad (diclorometano, acetona, metanol y agua), con el objeto de poder arrastrar los compuestos correspondientes a la polaridad utilizada. Se recolectaron en total 135 fracciones de 250 ml. Cada fracción se concentró en el rotaevaporador a presión reducida. De los residuos obtenidos, se realizaron las cromatografías en capa fina, utilizando las fases móviles apropiadas a la polaridad de cada fracción: diclorometano-hexano (9:1) para las fracciones 1-9, acetona-diclorometano (6:4) para las fracciones 10-26, acetona-metanol (98:2) para las fracciones 27-31, (70:30) para las fracciones 32-37, (60:40) para las fracciones 38-61, (1:1) para las fracciones 62-80, metanol-agua (2.5 ml:10 gotas) para las fracciones 82-135. Se juntaron las que presentaron un perfil similar. De esta forma, se obtuvieron VII fracciones combinadas (ver Cuadro 1 en Resultados).

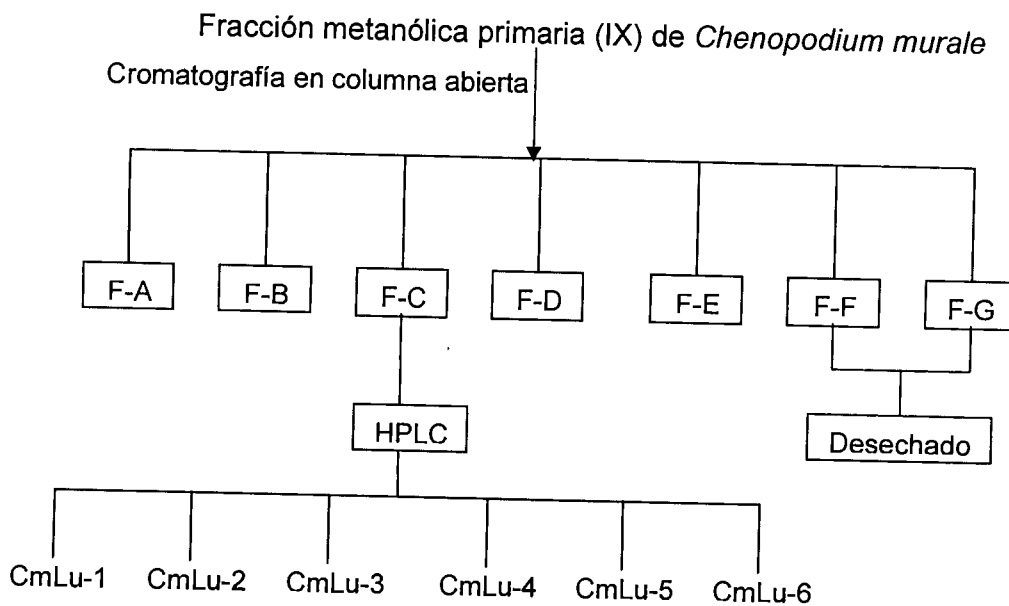


Figura 2. Marcha seguida durante los estudios químicos de la fracción metanólica primaria (IX).

V.2.2 Cromatografía en capa fina

Los análisis por cromatografía en capa fina se realizaron utilizando cromatofolios recubiertos de gel sílice (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) de 20 X 20 cm, con espesor de la fase estacionaria de 2 mm, esto con el fin de realizar los análisis de cada una de las fracciones obtenidas en la columna abierta para la separación y purificación de los compuestos a nivel preparativo. Para evaluar la presencia de compuestos en la placa cromatográfica, se dejó evaporar el eluyente de la placa. Después, la placa se expuso a una lámpara con emisión de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm). Se marcaron las zonas que presentaron fluorescencia. Finalmente, las placas se impregnaron con el agente cromógeno (sulfato cérico) mediante aspersion y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

V.2.3 Preparación de la solución reveladora de sulfato cérico para cromatografía en capa fina (CCF)

Se adicionaron lentamente 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22.5 ml de ácido sulfúrico concentrado a 350 g de hielo picado y se agitó lentamente hasta formar una solución homogénea.

V.2.4 Purificación de los principios

V.2.4.1 Implementación de condiciones en cromatografía de líquidos

Para poder purificar los compuestos obtenidos de cada una de las fracciones secundarias III, IV y V, se requirió investigar las condiciones óptimas para el análisis en HPLC. Los parámetros a definir fueron las fases estacionarias, carga máxima, fases móviles, modo de elución (isocrático o gradiente), detector y el tiempo de elución. En un inicio, se probaron varias columnas, dando finalmente mejores

resultados la analítica de aminopropilmetilsilicio (μ Bondapak, 3.9 x 300 mm). La fase móvil estuvo formada por $H_2O-CH_3CN-MeOH$ (15:70:15) y el flujo fue de 5 ml/min.

V.2.4.2 Purificación de los constituyentes de la fracción C

La fracción secundaria seleccionada para la búsqueda de compuestos, (fracción C, Cuadro 1) se sometió previamente a lavados con cloroformo. Posteriormente, se inyectó en el cromatógrafo de líquidos (HPLC) (Bah y Pereda-Miranda, 1996; 1997), utilizando la columna semipreparativa de aminopropilmetilsilicio (19 x 250 mm). Se colectaron los picos presentes denominados como CmLu-1 a CmLu-6, llevando a cabo numerosas inyecciones. Finalmente, se registraron los datos espectroscópicos de RMN de los picos obtenidos. Este registro se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la UNAM (USAI).

VI. RESULTADOS

La elución de la columna para la separación de los constituyentes de la fracción IX objeto del presente trabajo se llevó a cabo utilizando un gradiente de polaridad y recogiendo fracciones de aproximadamente 250 ml. Los sistemas de elución de la CC de la fracción IX estudiada, las fracciones recogidas, las fracciones combinadas y sus respectivos pesos se reportan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción metanólica primaria IX de *C. murale*.

SISTEMA ELUYENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES RECOLECTADAS	DENOMINACIÓN DE LAS FRACCIONES	PESOS (mg)
CH ₂ Cl ₂	100	1	A	21.8
CH ₂ Cl ₂ - Acetona	9:1	2-9		
	1:1	10-22		
Acetona	100	23-28	B	13.31
		29-38	C	196.42
Acetona- MeOH	9:1	39-60	D	151.91
	7:3	61-70		
	1:1	71-80		
MeOH	100	81-115	E	82.60
MeOH-H ₂ O	8:2	116-122		
		122-129	F	1.12
		130-132	G	2.034
	6:4	133-135		

Las fracciones recolectadas se juntaron en nuevas fracciones (A, B, C, D, E, F, y G), de acuerdo a la similitud de los perfiles obtenidos en la cromatografía en capa fina (CCF).

Para buscar la presencia de algunos grupos funcionales en estas diferentes fracciones, se trató de registrar los espectros infrarrojo de las fracciones A y B.

Por razones de abundancia de la fracción secundaria C, ésta se seleccionó para la búsqueda de compuestos. El análisis de esta fracción mediante HPLC

generó el cromatograma de la Figura 3. Se colectaron los picos con los tiempos de retención y los pesos indicados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Picos recolectados de la fracción secundaria C.

Pico (t_R , min)	Peso (mg)
5.57	2.24
14.49	5.1
15.54	15.41
16.85	3.49
20.23	1.8
22.17	4.98

A los picos con los tiempos de retención (t_R) de 5.57, 14.49 y 20.23 min, se les asignaron las claves de CmLu-1, CmLu-2 y CmLu-3 y se registraron sus espectros de RMN ^1H y/o ^{13}C unidimensionales (Figuras 4-20).

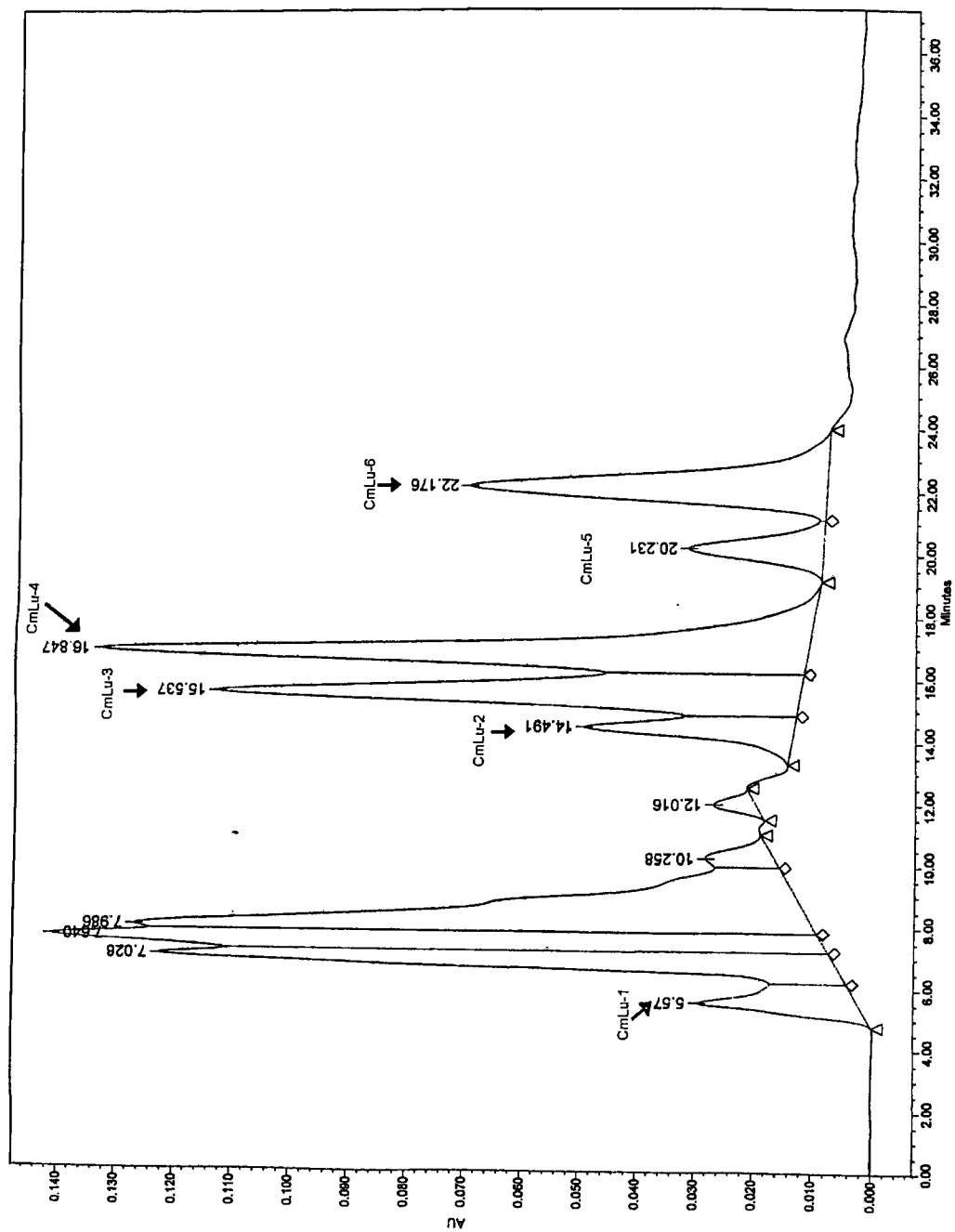


Figura 3. Cromatograma de líquidos de alta resolución de la fracción C de *C. murale*.

USAI
18/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Frágoso
CmLu-1 / CD3OD
IN 299.7 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
300-2
rda

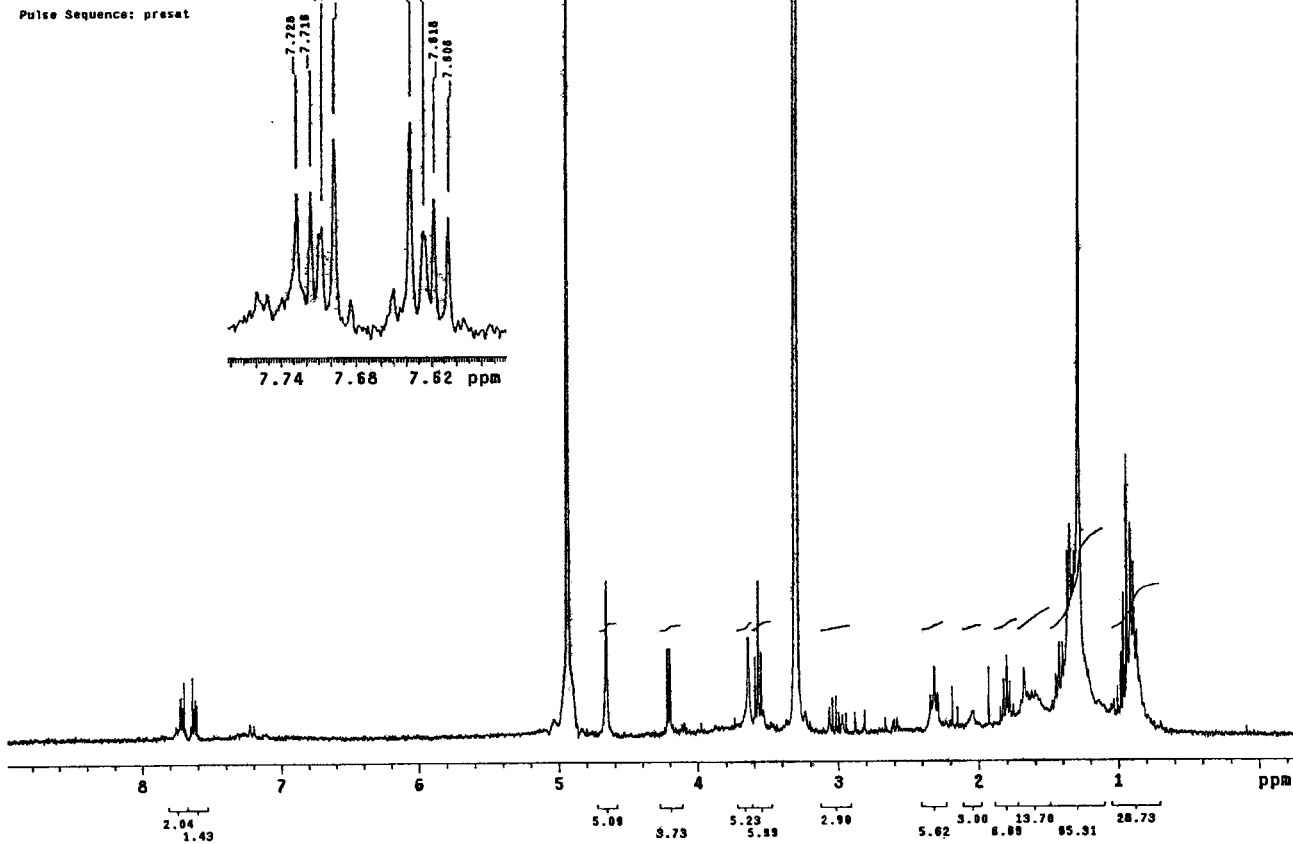


Figura 4. Espectro de RMN ^1H del pico CmLu-1.

u&mi
18/FEBRERO/2009
Dr. Rogelio Pareda / MAbel Fragoso
CmLU-1 / CD30D
1H 299.7 MHz
Ref. CD30D 3.3 ppm
300-2
rdm

Pulse Sequence: presat

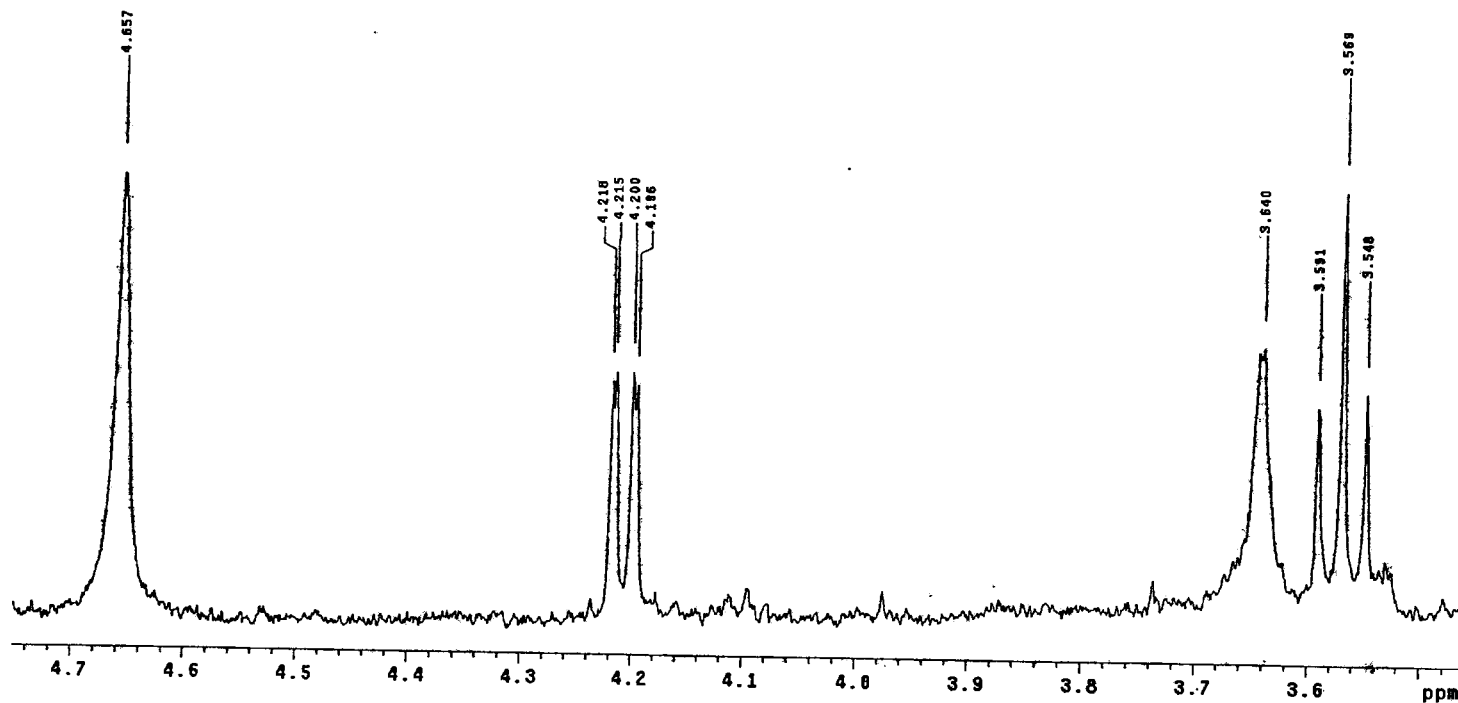


Figura 5. Ampliación de una porción del espectro de la Figura 3.

USA1
18/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / MAbel Fragoso
CmLu-1 / CD300
1H 299.7 MHz
Ref. CD300 3.3 ppm
300-2
Fdm

Pulse Sequence: presat

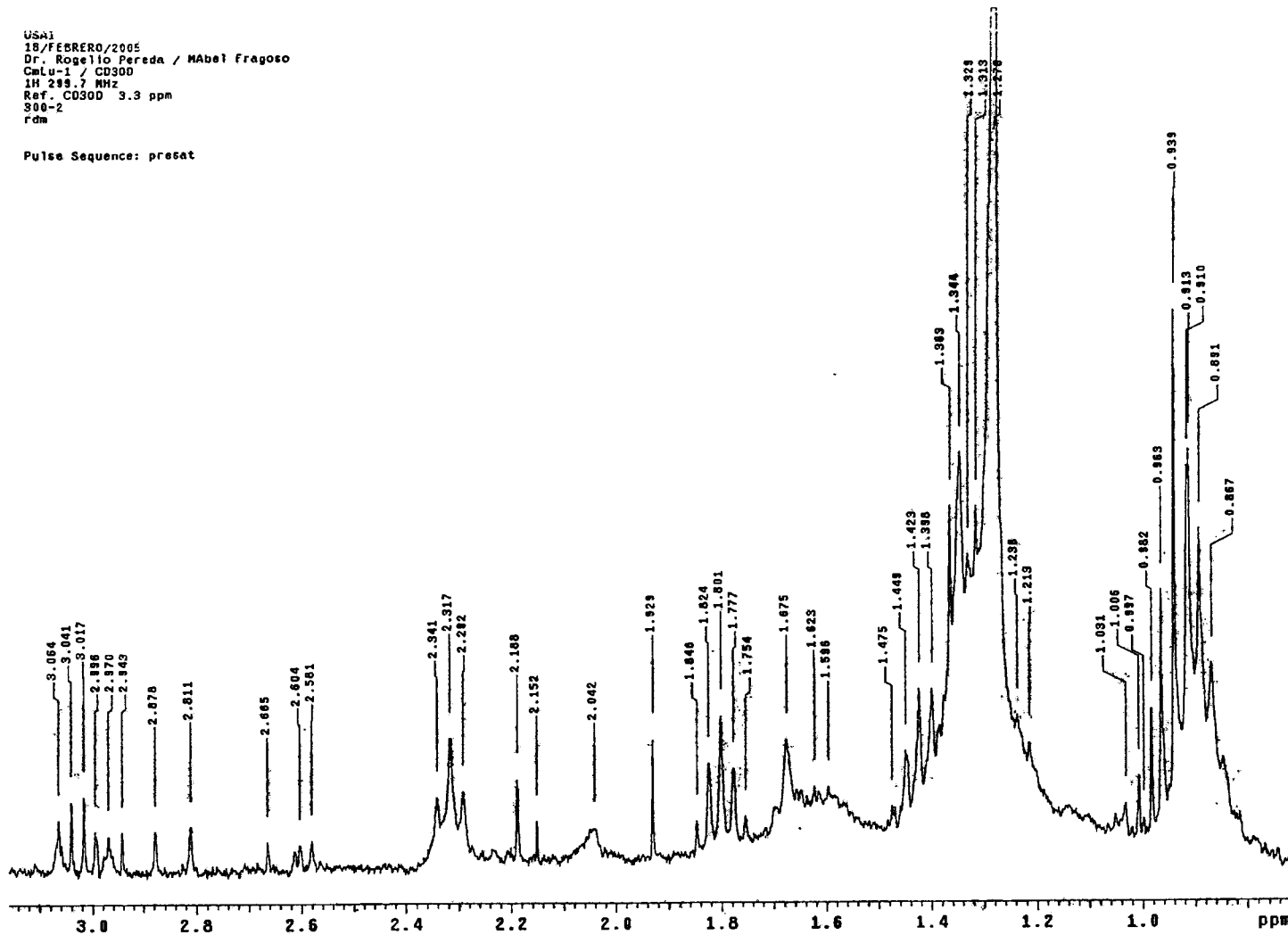


Figura 6. Ampliación de la región de campo alto del espectro de la Figura 3.

USAi
18/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragozo
CmLu-1 / CD3OD
13C 75.5 MHz
Ref. CD3OD 49 ppm
300-2
rdm

Pulse Sequence: s2pu1

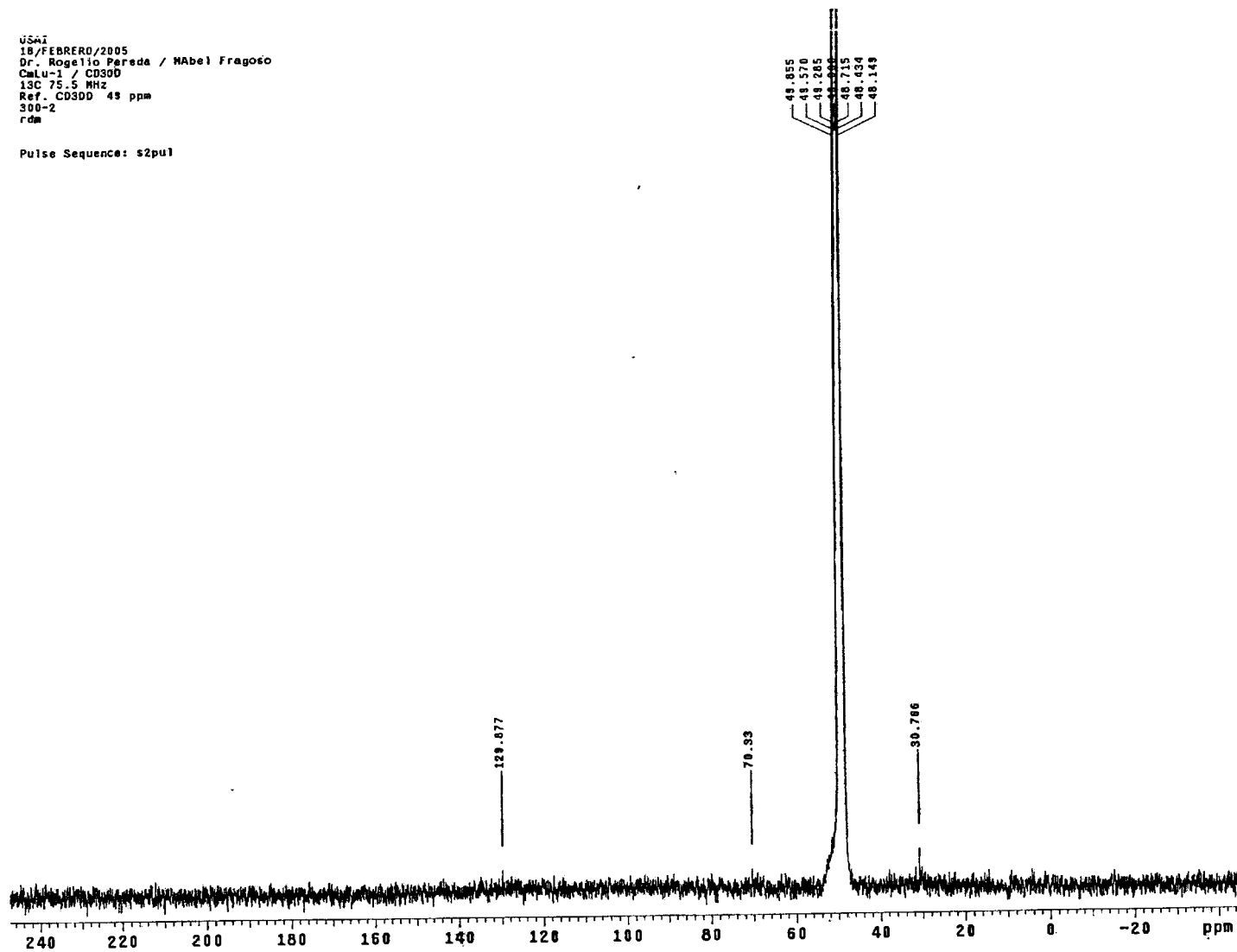


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C del pico CmLu-1.

USAI
18-02-05
Dr. Rogelio Pereda/Mabel Fragoso
CmLu-2/CD3OD
1H 300.2 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
300-1
VMAS
Pulse Sequence: s2pu1

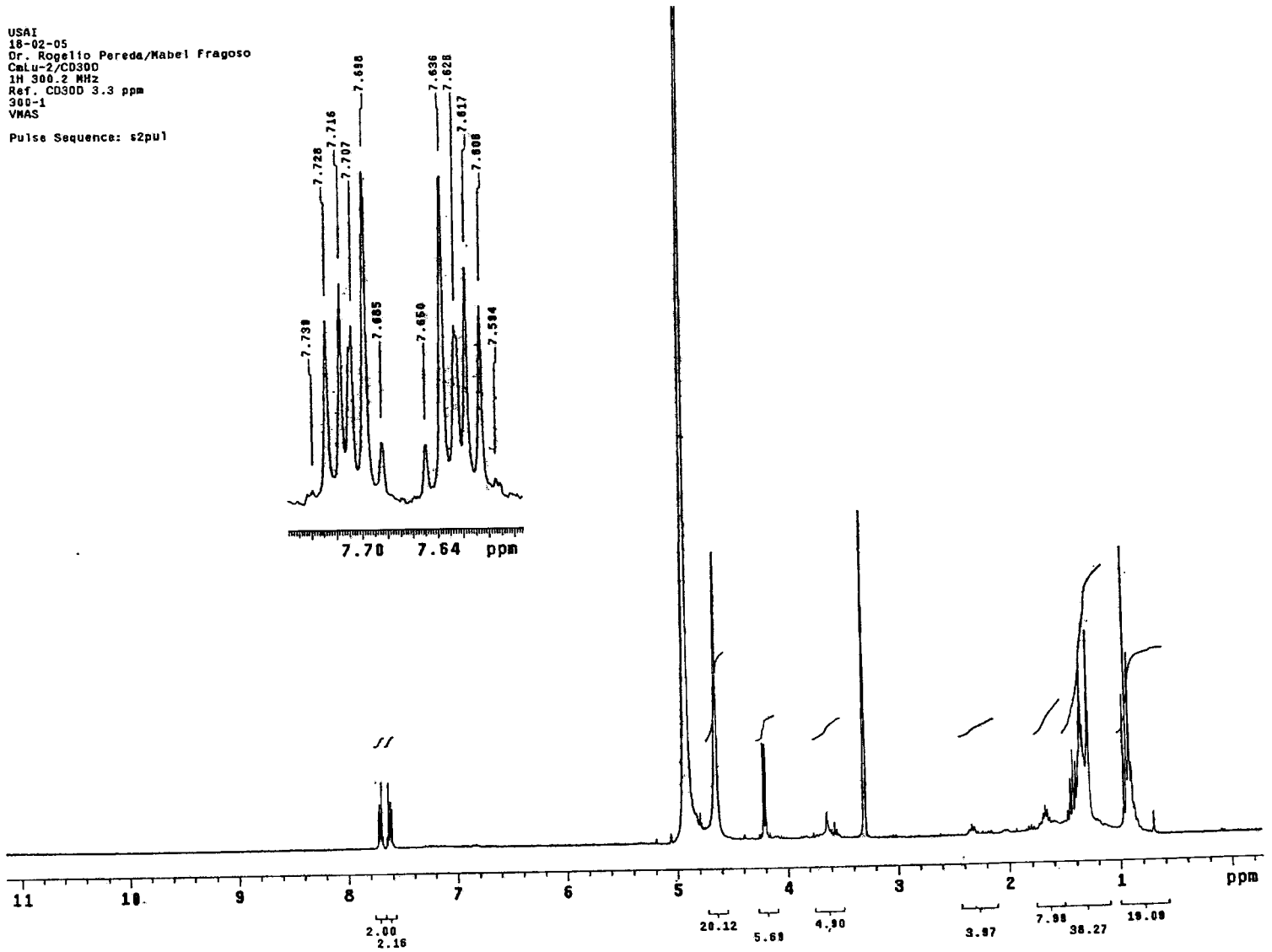


Figura 8. Espectro de RMN ^1H de CmLu-2.

USA1
18-02-85
Dr. Rogelio Pereda/Habel Fragoso
CmLu-2/CD3OD
1H 300.2 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
300-1
VNAS

Pulse Sequence: s2pu1

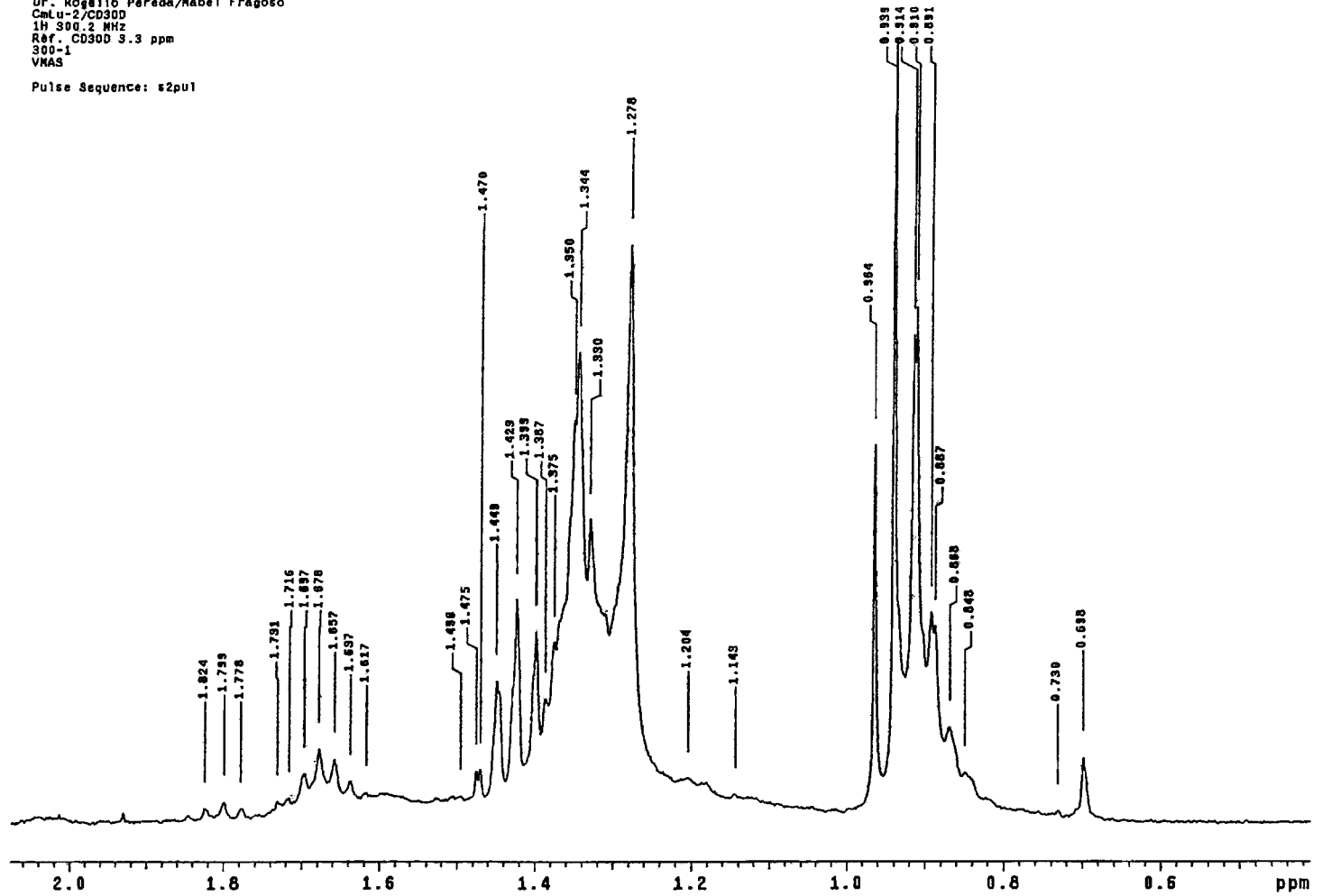


Figura 9. Región de campo alto del espectro de RMN ^1H de CmLu-2.

USA1
18-02-05
Dr. Rogelio Pereda/Nabel Fragoso
CmLu-2/CD3OD
13C 75.5 MHz
Ref. CD3OD 49.15 ppm
300-I
VMAS
Pulse Sequence: s2pu1

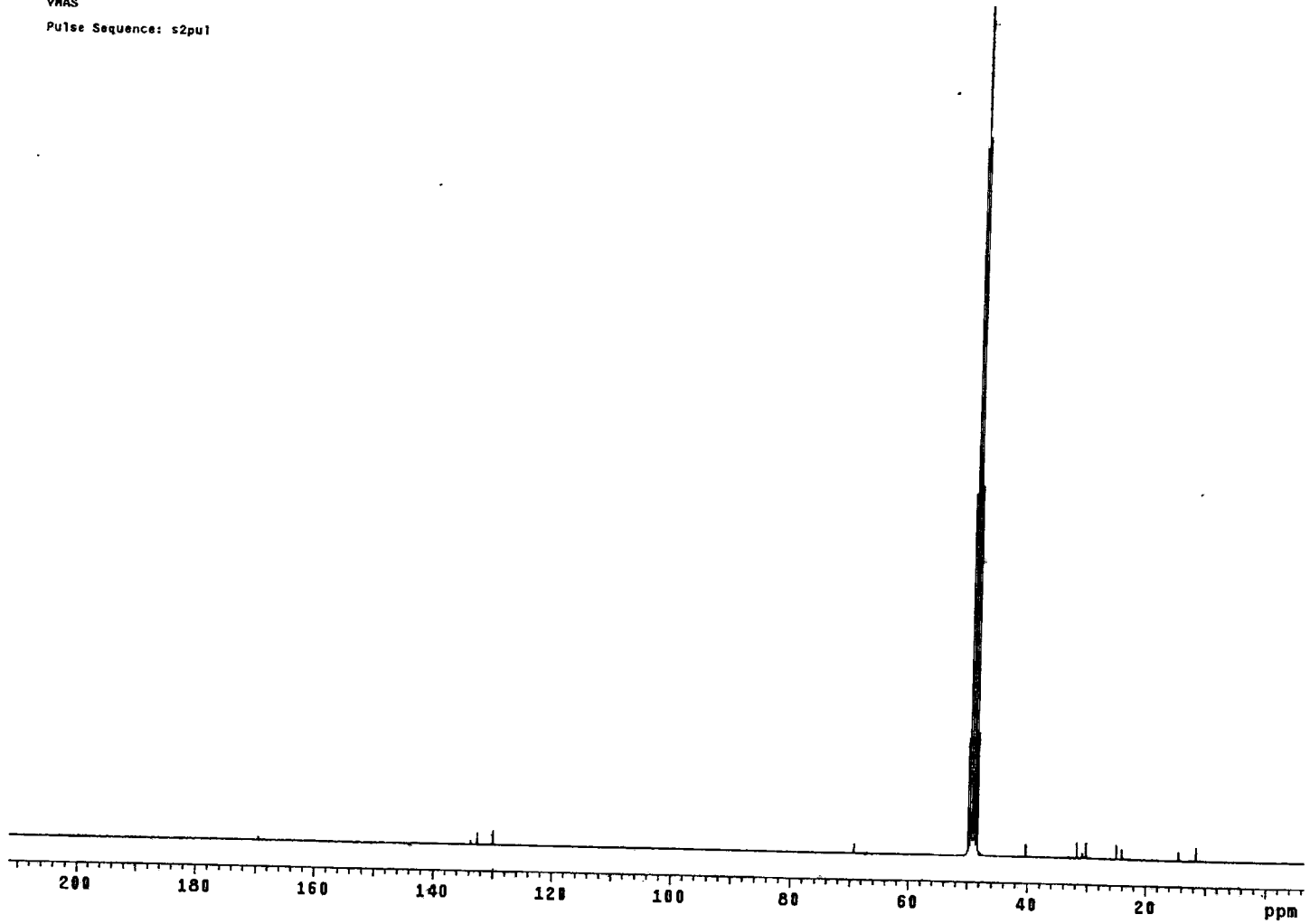


Figura 10. Espectro de RMN ¹³C de CmLu-2.

USAI
18-02-05
Dr. Rogelio Pereda/Mabel Fragoso
CmLu-2/CD30D
13C 75.5 MHz
Ref. CD30D 49.15 ppm
300-1
VNAS
Pulse Sequence: s2pu1

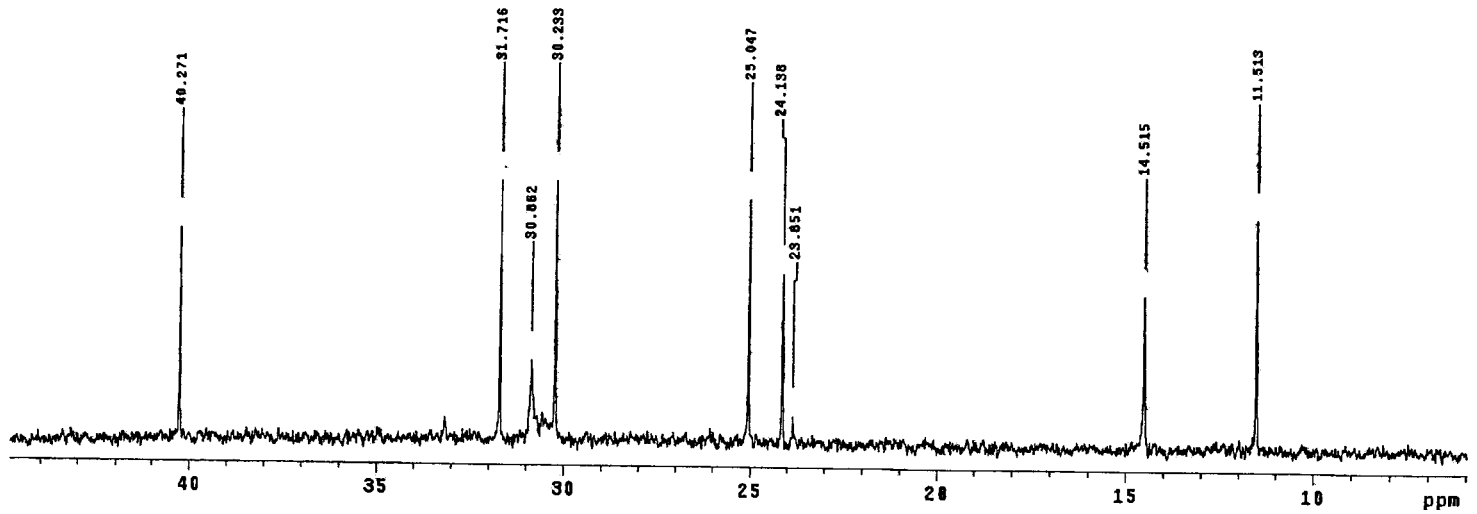


Figura 11. Región de campo alto del espectro de RMN ¹³C de CmLu-2.

Dr. Rogelio Pereda/Mabel Fragoso
CmLu-2/CD3OD
13C 75.5 MHz
Ref. CD3OD 49.15 ppm
300-1
VMAS
Pulse Sequence: s2pu1

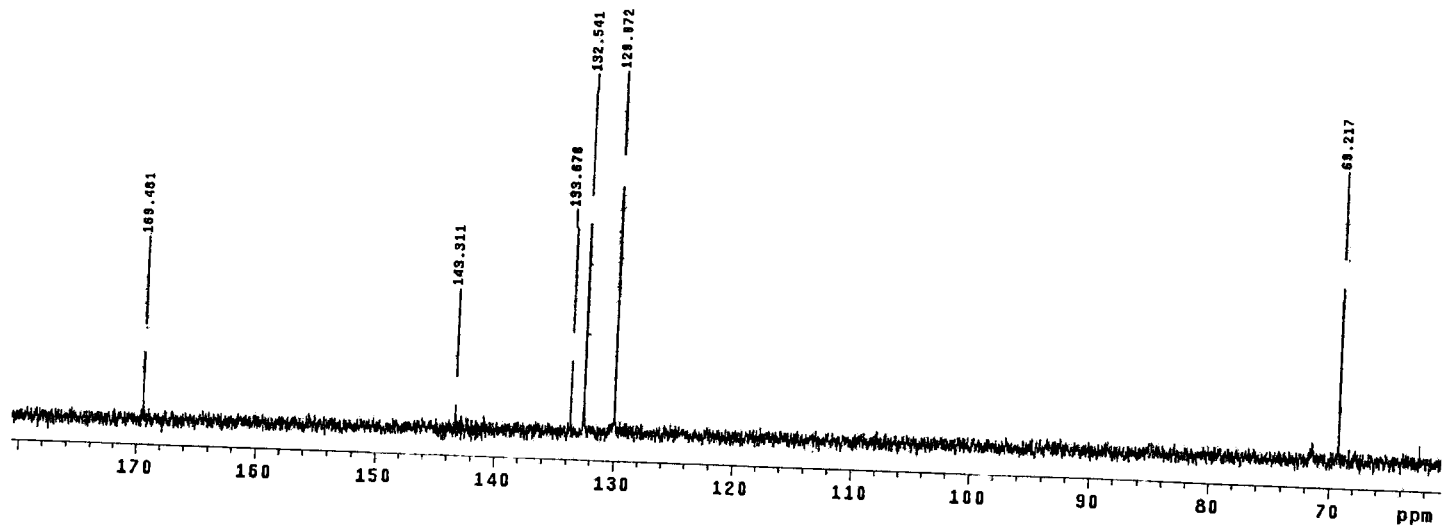


Figura 12. Ampliación de una región del espectro de RMN ¹³C de CmLu-2.

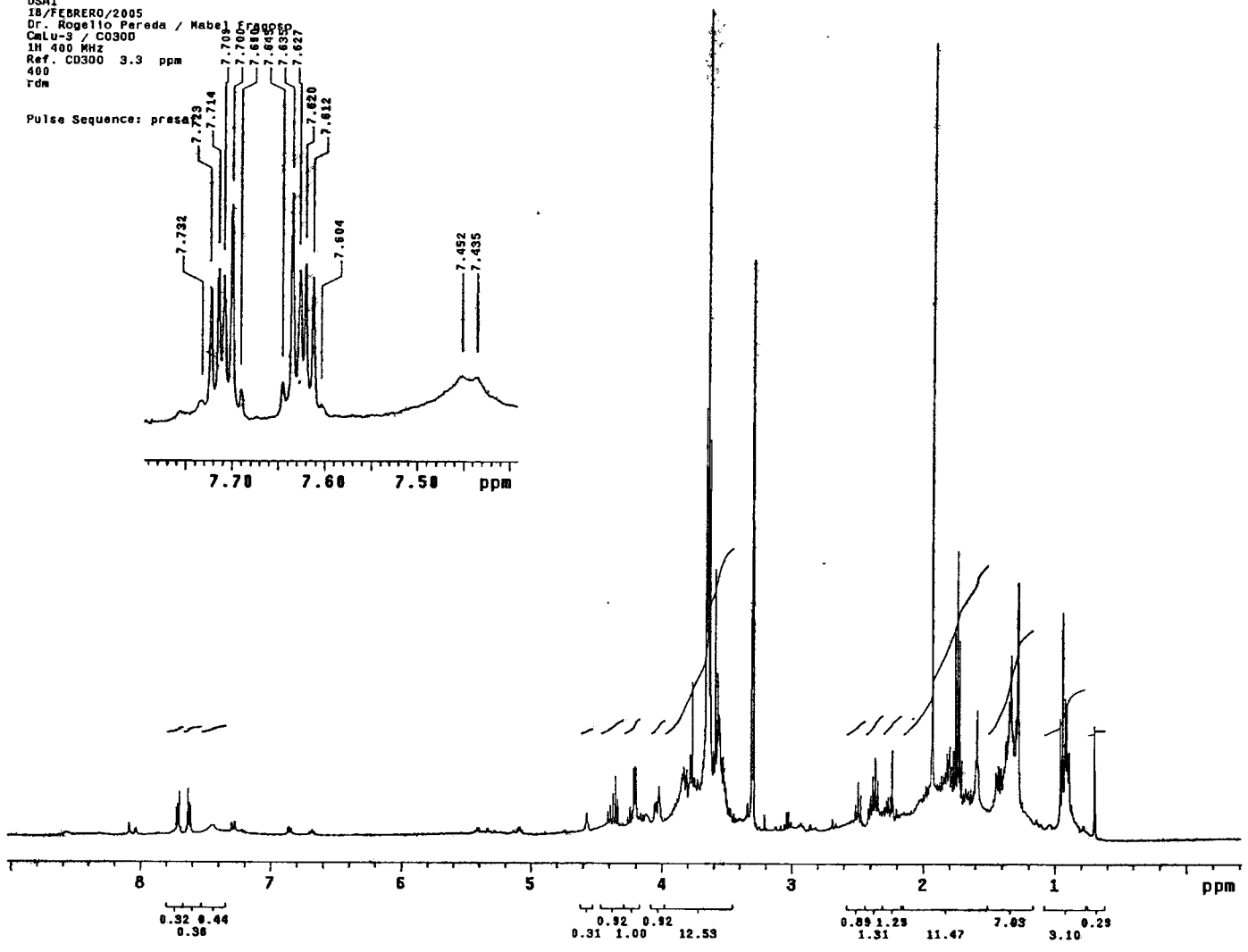
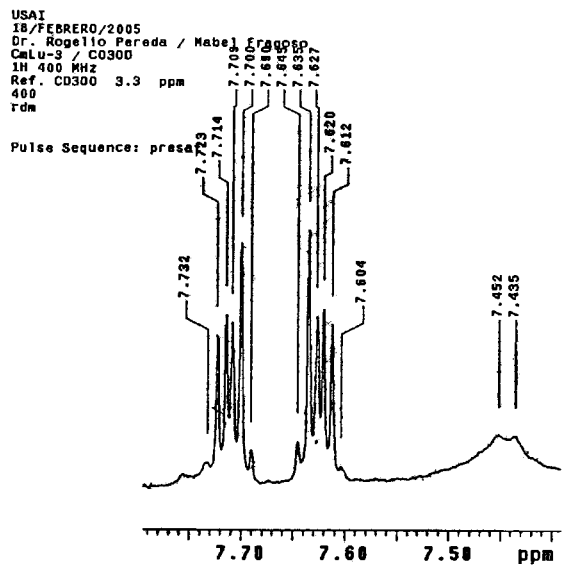


Figura 13. Espectro de RMN ¹H de CmLu-3.

18/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso
CmLu-3 / CD3OD
1H 400 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: preset

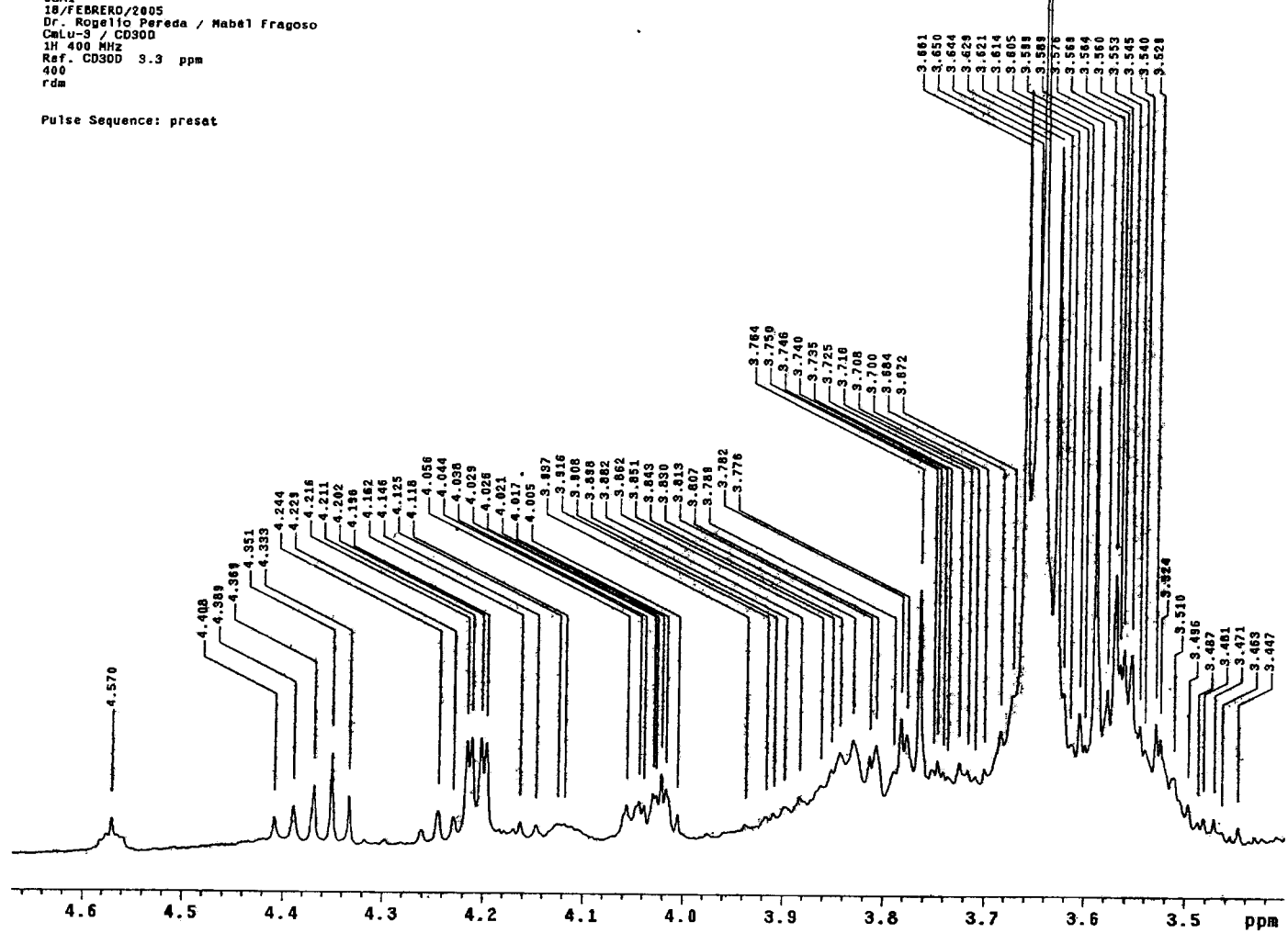


Figura 14. Ampliación de una región del espectro de RMN ¹H de CmLu-3.

Pulse Sequence: presat

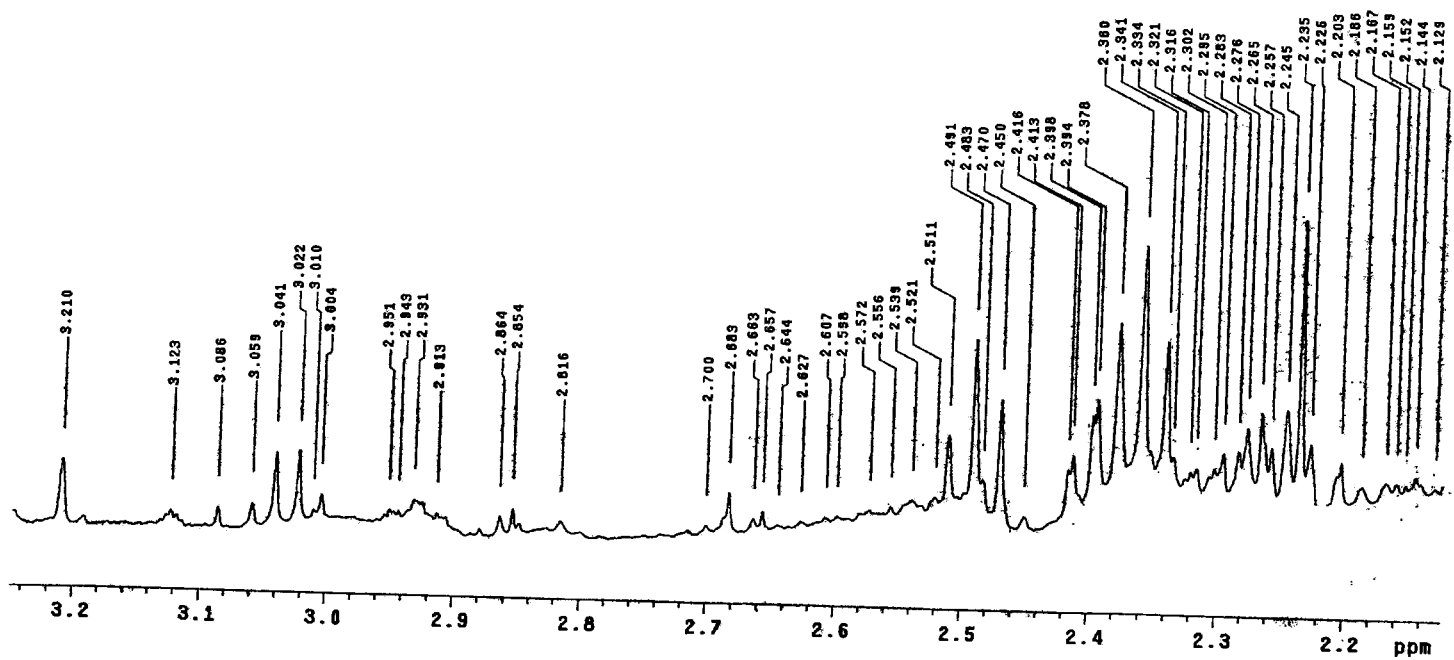


Figura 15. Ampliación de una región del espectro de RMN ¹H de CmLu-3.

USAI
18/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / Nabel Fragoso
CmLu-3 / CD3OD
1H 400 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
400
Fdm

Pulse Sequence: presat

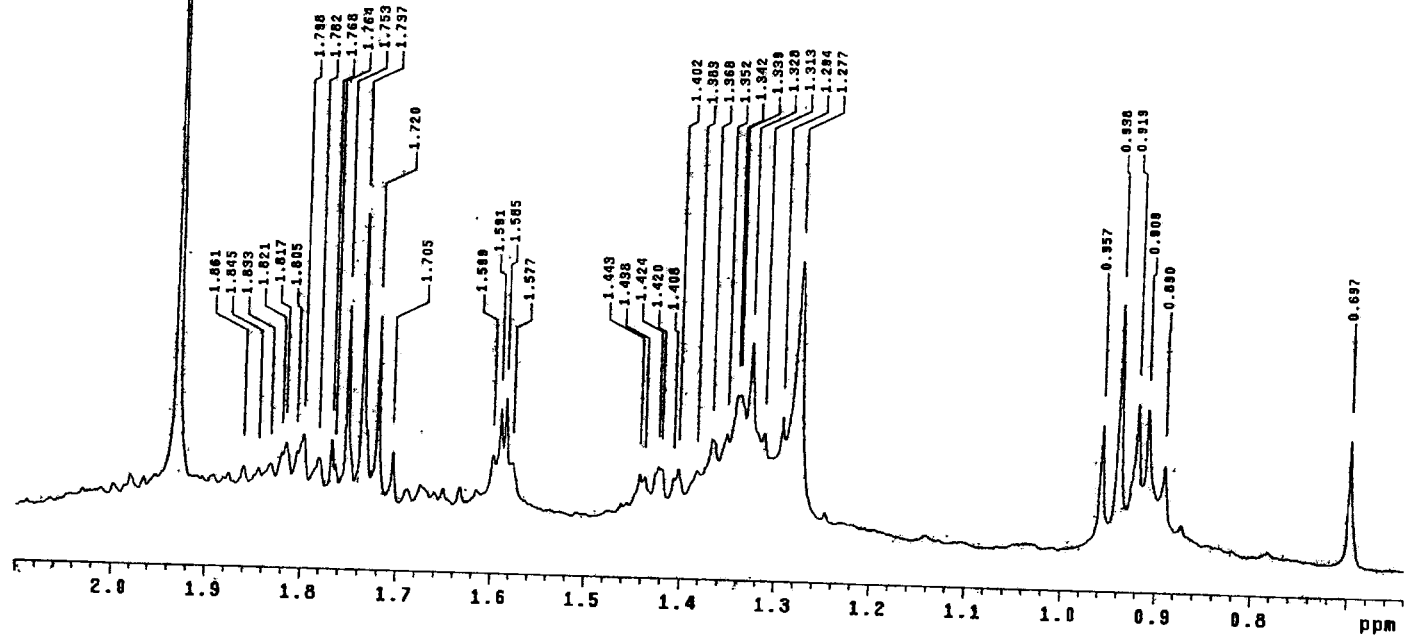


Figura 16. Ampliación de la región de campo alto del espectro de RMN ^1H de CmLu-3.

Pulse Sequence: s2pu1

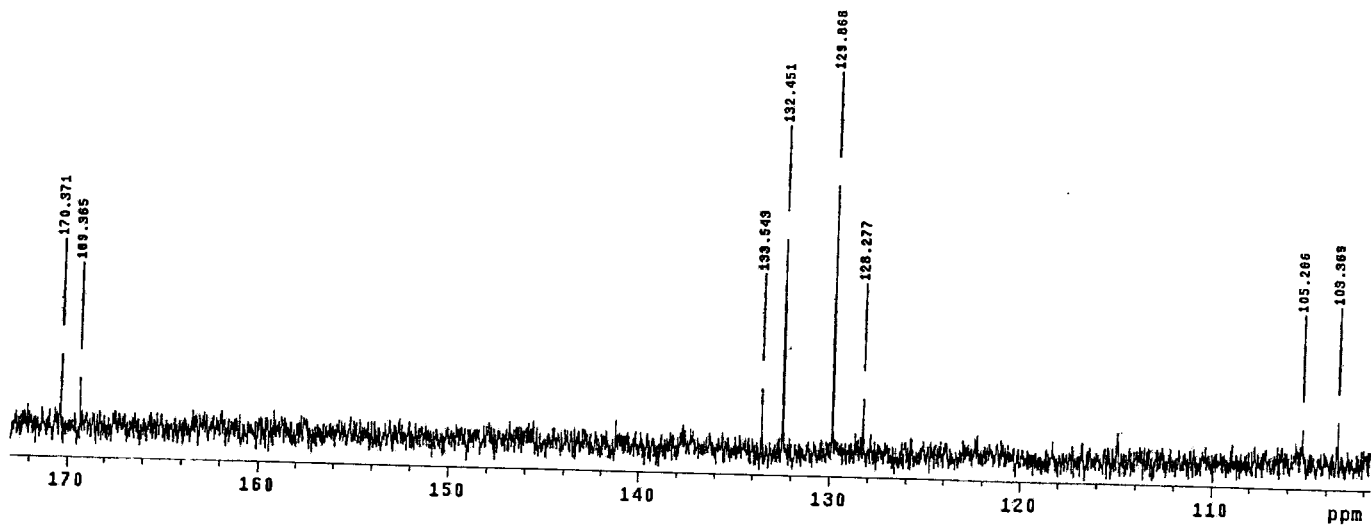


Figura 18. Ampliación de una región del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3.

CmLu-3 / CD3OD
13C 100 MHz
Ref. CD3OD 49 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: s2pu1

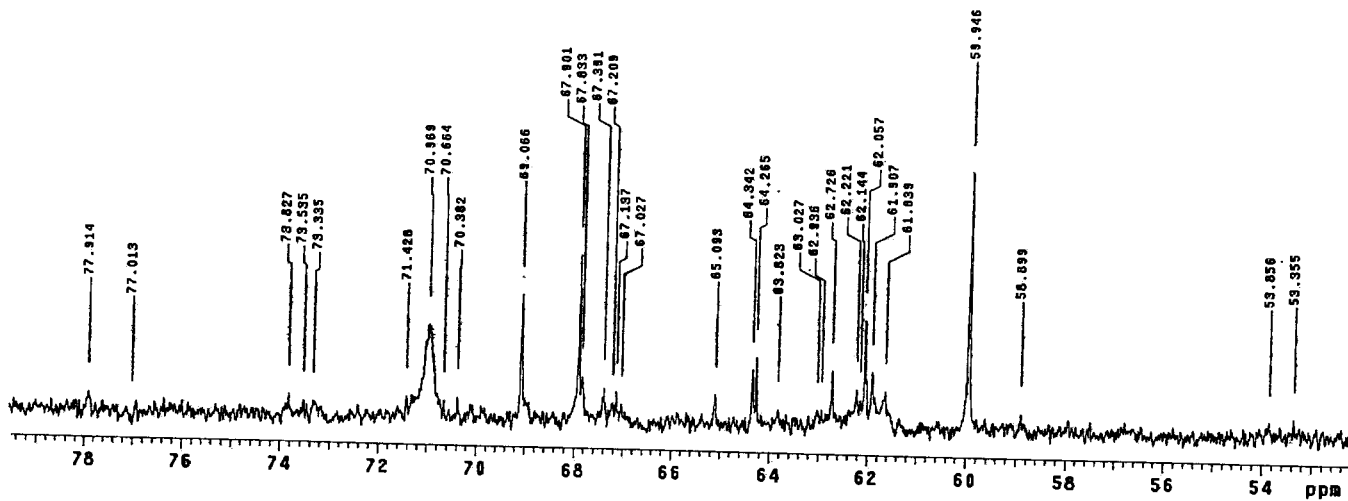


Figura 19. Ampliación de una región del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3.

Pulse Sequence: s2pu1

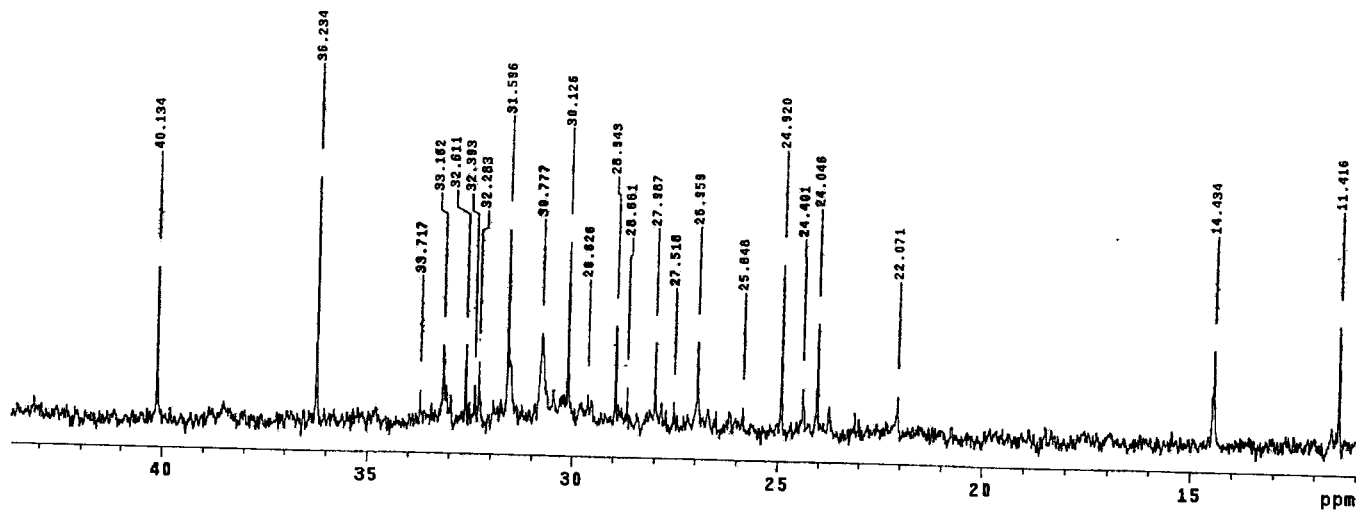


Figura 20. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de CmLu-3.

VII. DISCUSIÓN

Los flavonoides con las actividades espasmolíticas sobre el sistema digestivo y cardiovascular que han sido descritos previamente al presente trabajo fueron aislados de las porciones polares del extracto de *C. murale*. Teniendo en cuenta esos antecedentes químicos de la especie, en el presente trabajo se escogió una de las fracciones más polares obtenidas de la cromatografía en columna del extracto original, para la búsqueda de flavonoides. Durante la implementación de condiciones analíticas en cromatografía de líquidos de alta resolución para una buena separación de los constituyentes individuales de la fracción, se utilizaron diversas fases móviles y estacionarias. La columna que mayor resolución proporcionó fue la de aminopropilmetilsilicio (μ Bondapak, 19 x 250 mm, 125 Å, 10 mm), con un sistema eluyente formado por una mezcla ternaria de acetonitrilo-agua-metanol, en la proporción de 70:15:15 y al flujo de 5 ml/min. La detección se llevó a cabo a la longitud de onda de 254 nm. Sin embargo, a pesar de la aparente intensidad de los picos observados, los rendimientos de las fracciones colectadas durante el análisis de esta fracción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución no proporcionaron cantidades satisfactorias que permitieran una purificación ulterior óptima y, por lo tanto, una elucidación estructural de los metabolitos aislados. No obstante, se decidió registrar algunos espectros de RMN de los compuestos semipurificados para tener una idea acerca de la naturaleza de los constituyentes de la fracción analizada. Esto permitiría reorientar una futura investigación de las fracciones adyacentes a la estudiada con mayor abundancia para la búsqueda de mejores rendimientos.

Ninguno de los espectros de RMN muestra señales características para flavonoides. Aunque con los datos preliminares que se obtienen es imposible establecer una estructura química para los compuestos impuros que se tienen, los espectros RMN ^1H de tres de los constituyentes (CmLu-1, CmLu-2 y CmLu-3) mostraron señales a campo bajo, características de protones aromáticos situados en posiciones con vecindades desactivadas en el anillo. Estas multiplicidades situadas en el rango de δ 7.6 a 7.8 ppm, representan protones

con un patrón de acoplamiento *o-m* ($J = \text{Hz}$) que sugiere un anillo bencénico *o*-sustituido de manera pseudosimétrica. Se confirma la presencia del anillo aromático en el pico CmLu-1 mediante las 4 señales en el espectro RMN ^{13}C en δ 128-144 ppm, los cuales corresponden a 2 pares de carbonos equivalentes. Para CmLu-2, esas señales se encuentran en δ 129.97 (2C), 132.54 (2C), 133.67 (1C) y 143.31 (1C) ppm. Para el constituyente CmLu-3, las señales se sitúan en δ 128.3 (1C), 129.9 (2C), 132.4 (2C) y 133.54 (1C). Asimismo, se observa en los espectros de RMN ^{13}C de tres de las muestras analizadas, la presencia de un grupo carbonilo (C=O) propio de una función éster a $\delta = 169.5$ ppm para CmLu-2, 169.36 y 170.4 para CmLu-3 y 177.20 ppm para CmLu-4. Se requiere obtener los espectros infrarrojo de esas muestras para confirmar la función éster de estos compuestos. A pesar de numerosas horas de adquisición, ninguna señal para grupo carbonilo se registró en el caso de CmLu-1, debido quizás a la muy baja cantidad de muestra. Los sustituyentes de naturaleza alifática en todos los compuestos incluyen grupos metilos en δ entre 0.8 y 1.4 ppm en el espectro RMN ^1H , grupos metilenos entre 1.2 y 2.4 ppm y señales propias de protones en carbonos bases de oxígeno en la región de 3 – 4.7 ppm.

Evidentemente, estos no son más que resultados preliminares. Para la caracterización estructural completa, se requerirá la purificación mediante la técnica de reciclaje de los picos que tengan una abundancia que lo permita, hasta alcanzar una homogeneidad adecuada. Posteriormente, será necesario obtener los espectros infrarrojo, a través de los cuales se podrá determinar en particular la funcionalidad exacta de los grupos C=O. Se deberán de registrar los espectros RMN en varias de sus modalidades, incluyendo la correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY y/o el TOCSY (correlación homonuclear total ^1H - ^1H , en caso necesario) para determinar los diferentes sistemas de espines, la correlación heteronuclear a un enlace ^1H - ^{13}C (HECTOR o HSQC), el DEPT (técnica de exaltación nuclear por transferencia de polarización) o una técnica equivalente (APT, INEPT) y la correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C a larga distancia (tres y cuatro enlaces) (HMBC). Para comprobar la presencia de un anillo aromático en los compuestos, un experimento adecuado sería el registro de los

espectros de masas, mediante la técnica de impacto electrónico. La misma técnica en la modalidad de ionización suave, ya sea utilizando el bombardeo rápido de átomos (conocido como FAB) o la ionización química, permitirá obtener las masas moleculares de los compuestos purificados.

VIII. CONCLUSIONES

Los compuestos que integran la fracción estudiada parecen ser fenoles simples con cadenas laterales alifáticas. No han sido descritos ese tipo de compuestos entre las especies de *Chenopodium* estudiadas desde el punto de vista químico, con excepción de siete amidas del ácido cinámico en *C. album*, especie en la cual también se ha descrito una fototoxicidad, atribuida en este caso a la presencia de furanocumarinas, a pesar de que esos fenoles no han sido aislados en la planta.

La purificación de los compuestos detectados en el presente trabajo y su caracterización estructural constituirán una aportación que enriquecerá el conocimiento del perfil metabólico de *C. murale*, especie ampliamente usada en la medicina tradicional de México y al mismo tiempo permitirá explorar su potencial farmacológico.

A pesar de que los metabolitos detectados no son flavonoides, la presencia de tales compuestos en la especie mexicana no se descarta en las otras fracciones del extracto original que no han sido analizadas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Bah, M., Pereda-Miranda, R. 1996.** Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*. Vol. 52: 13063-13080.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. 1997.** Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*. Vol. 53: 9007-9022.
- Calka, O., Akdeniz, N., Metin, A., Behcet.L. 2005.** Phototoxic dermatitis due to *Chenopodium album* in a mother and son. *Contact Dermatitis*. Vol. 53: 58-60.
- Cavalli, J.F., Tomi, F., Bernardini, A.F., Casanova, J. 2004.** Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*. Vol. 15: 275-279.
- Conway, G.A., Slocumb, J.C. 1979.** Plants used as abortifacients and emenagogues by Spanish New Mexicans. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 1: 241-261.
- Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Di Marino, C., Molino, A., Previtiera, L., Zarrelli, A. 2003.** Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth. *Phytochemistry*. Vol. 64: 1381-1387.
- Dai, Y., Ye, W.C., Wang, Z.T., Matsuda, H., Kubo, M., But, P.P. 2002.** Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 81: 245-250.

- DellaGreca, M., Di Marino, C., Zarrelli, A., D'Abrosca, B. 2004.** Isolation and phytotoxicity of apocarotenoids from *Chenopodium album*. *Journal of Natural Products*. Vol. 67: 1492-1495.
- DellaGreca, M., Previtiera, L., Zarrelli, A. 2005.** A new xyloside from *Chenopodium album*. *Natural Product Research*. Vol. 19: 87-90.
- Dini, I., Tenore, G.C., Schettino, O., Dini, A. 2001.** New oleanane saponins in *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49: 3976-3981.
- Dini, I., Tenore, G.C., Dini, A. 2002.** Oleanane saponins in "kancolla", a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. *Journal of Natural Products*. Vol. 65: 1023-1026.
- Efferth, T., Olbrich, A., Sauerbrey, A., Ross, D.D., Gebhart, E., Neugebauer, M. 2002.** Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multigrug-resistant tumor cells. *Anticancer Research*. Vol. 22: 4221-4224.
- El-Sayed, N.H., Awaad, A.S., Hifnawy, M.S., Mabry, T.J. 1999.** A flavonol triglycoside from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*. Vol. 51: 591-593.
- Gandano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., Carballo, M. 2002.** In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 81: 11-16.
- Giove, N.R.. 1996.** Traditional medicine in the treatment of enteroparasitosis. *Revista de Gastroenterología del Perú*. Vol. 16: 197-202.
- Gohar, A.A., Elmazar, M.M. 1997.** Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytotherapy Research*. Vol. 11: 564-567 .

- Gohar, A.A.; Maatooq, G.T.; Niwa, M. 2000.** Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*. Vol. 53: 299-303.
- Gohar, A.A., Maatooq, G.T., Niwa, M., Yoshiaki, T. 2002.** A new triterpene saponin from *Chenopodium ficifolium*. *Zeitschrift für Naturforschung*. Vol. 57: 597-602.
- Kapadia, G.J., Chung, E.B., Ghosh, B., Shukla, Y.N., Basak, S.P., Morton, J.F., Pradhan, S.N. 1978.** Carcinogenicity of some folk medicinal herbs in rats. *Journal of National Cancer Institute*: 60: 683-686.
- Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. 2002.** Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal Natural*. Vol. 65: 509-512.
- Kliks, M.M. 1985.** Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides*. *Social Science & Medicine*. Vol. 21: 879-886.
- Lavaud, C., Voutquenne, L., Bal, P., Pouny, I. 2000.** Saponins from *Chenopodium album*. *Fitoterapia*. Vol. 71: 338-340.
- MacDonald, D., VanCrey, K., Harrison, P., Rangachari, P.K., Reseenfeld, J., Warren., Sorger, G. 2004.** Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide that is not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 92: 215-221.
- Montoya-Cabrera, M.A., Escalante-Galindo, P., Meckes-Fisher, M., Sánchez-Vaca, G., Flores-Alvárez, E., Reynoso-García, M. 1996.** Fatal poisoning caused by oil of epazote *Chenopodium graveolens*. *Gaceta Médica de México*. Vol. 132: 433-437.

Quinlan, M.B., Quinlan, R.J., Nolan, J.M. 2002. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 80: 75-83.

Rojas, A., Bah, M., Rojas, J.I., Serrano, V., Pacheco, S. 1999. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*. Vol. 6: 367-371.

Rojas, A., Mendoza, S., Moreno, J., Arellano, R.O. 2003. Extracts from plants used in Mexican traditional medicine activate Ca²⁺-dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes. *Phytomedicine*. Vol. 10: 416-421.

Woldemichael, G.M., Wink, M. 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49: 2327-2332.