

2ej
11



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS DE
ERYTHRINA BREVIFLORA**

T E S I S
Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

RESPICIO PEDRO BAUTISTA VALVERDE



1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION
- II. GENERALIDADES
- III. DISCUSION DE RESULTADOS
- IV. PARTE EXPERIMENTAL
- V. CONCLUSIONES
- VI. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

La flora de nuestro país es muy variada y aún no ha sido estudiada completamente desde un punto de vista botánico y químico, así como farmacológico; teniendo presente que uno de los objetivos de la química farmacéutica es buscar sustancias con actividad terapéutica, se realizó el estudio de las semillas de Erythrina breviflora, especie que no ha sido estudiada anteriormente.

Estudios farmacológicos de los componentes químicos de las plantas del género Erythrina, han demostrado que contienen alcaloides altamente tóxicos, pero que administrados en dosis adecuadas actúan como bloqueadores neuromusculares. Así, se estudiaron las semillas de Erythrina breviflora (especie vulgarmente conocida como "patol") colectadas en el estado de Michoacán, por los siguientes procedimientos: extracción, separación y purificación por métodos cromatográficos de los principales principios, así como su identificación por métodos espectroscópicos y por cromatografía de líquidos. Mediante estos procedimientos se lograron aislar e identificar dos alcaloides, los cuales fueron: hipaforina y alfa-eritroidina.

II. GENERALIDADES

El género Erythrina perteneciente a la familia de las leguminosas subfamilia papilionáceas, está formado por cerca de 108 especies distribuidas ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo¹; encontrándose en México tan solo 20 de estas especies², -- siendo una de ellas la Erythrina breviflora comúnmente conocida como "patol".

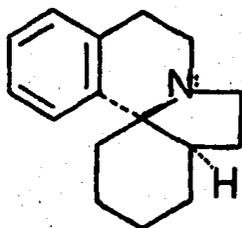
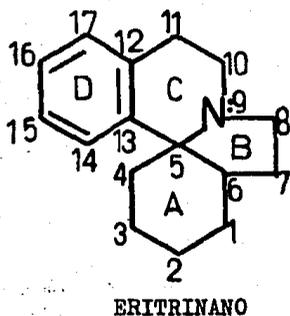
La especie breviflora es un arbusto espinoso de 2-4 m de altura, que da flores rojas con rayas amarillas en el estandarte y que miran hacia adentro³. Se encuentra dispersa a través del eje volcánico, desde el estado de Morelos, el Estado de México hasta el estado de Jalisco, encontrándose especies endémicas en los estados de Puebla, Oaxaca y Guerrero⁴.

Las semillas de esta especie son suaves, lisas y negras de forma reniforme a elipsoide, que miden 17-20 x 14-19 mm⁵.

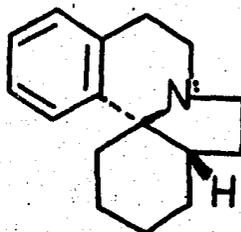
Los compuestos más comúnmente aislados de este género, son alcaloides que en su estructura incluyen un núcleo indólico parcialmente reducido, pero se han clasificado dentro del gran grupo de alcaloides tetrahydroisoquinolínicos, encontrados también en plantas de la familia de las menispermáceas.

Los alcaloides de este género se clasifican en tres grupos: I) Dienoides, II) Alkenoides y III) Lactónicos⁶; todos derivados del núcleo del citrinano, que es un esqueleto aminoespíránico tetracíclico conocido en sus formas cis y trans⁷, en los que el anillo A, B y C con co

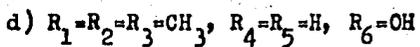
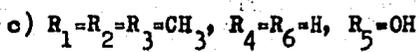
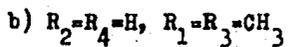
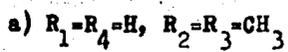
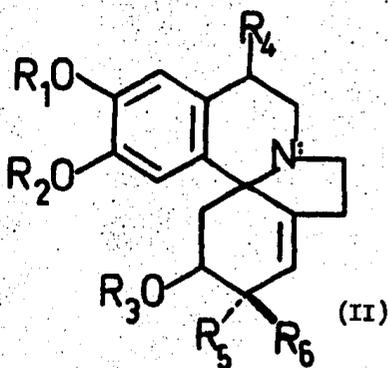
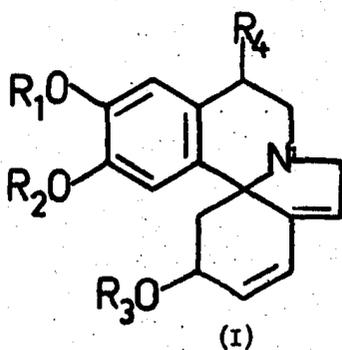
munos en los tres casos y solamente difieren en la naturaleza del anillo D.
llo D.

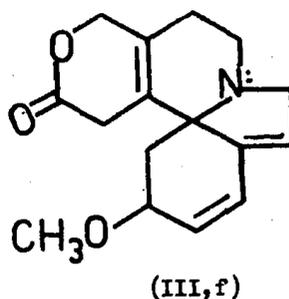
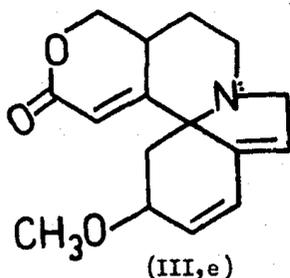


A/B-Cis



A/B-Trans





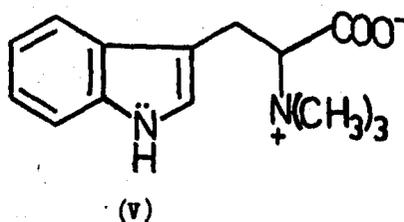
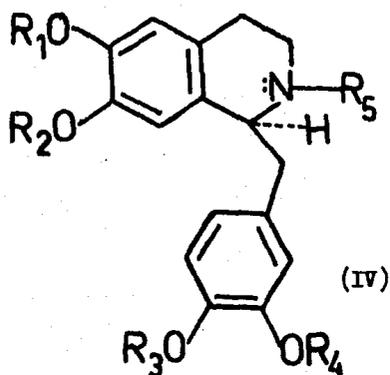
El primer grupo se caracteriza por poseer un sistema diénico con jugado heteroanular en los anillos A y B. Dos ejemplos de los alcaloides que más abundan en este grupo son; la erisodina (I,a) y la erisovina (I,b)^{6,8}.

Los alcaloides del segundo grupo, presentan una doble ligadura - $\Delta^{1,6}$ en el anillo A; aquí podemos mencionar a la eritratidina (II,e) y a su correspondiente isómero epi-eritratidina (II,d)^{6,8}.

En el tercer grupo los alcaloides presentan aspectos estructurales diferentes a los anteriores, en los que el anillo D es una σ -valerolactona insaturada y como representantes se encuentran alfa (III,e) y beta-critroidina (III,f)^{6,8}.

Otros alcaloides no pertenecientes al grupo Erythrina, han sido aislados también de varias especies de este género y son predominantemente del tipo tetrahidrobencilisoquinolínicos (IV). Un alcaloide sin relación estructural con los anteriores y que se ha encontrado en todas las especies de Erythrina, es la hipaforina (V); la presencia de este alcaloide con la excepción de la especie officinalis del género

Pterocarpus⁹, no se ha registrado en otras plantas por lo que parece ser característica del género Erythrina. Químicamente es la betaína del L-triptofano¹⁰ o beta-indolilalanina.



Los alcaloides del género Erythrina, se han subdividido en alcaloides libres y combinados. Los libres son nombrados con el prefijo "Eritr-", por ejemplos eritramina¹¹, eritralina¹², eritroidina, eritratidina, eritratina¹³; los combinados son los que se encuentran formando ésteres del ácido sulfoacético y se nombran con el prefijo "Erisotio-", como por ejemplo: erisotiovina y erisotiopina^{14,15}. La hidrólisis de los alcaloides combinados, producen los alcaloides liberados y estos se denominan con el prefijo "Eriso-", dentro de este grupo se encuentran la erisovina, erisolina, erisodina, erisotrina^{15bis}, erisopina¹⁴, erisotina y erisosalvina.

El interés químico de los alcaloides del género Erythrina data--

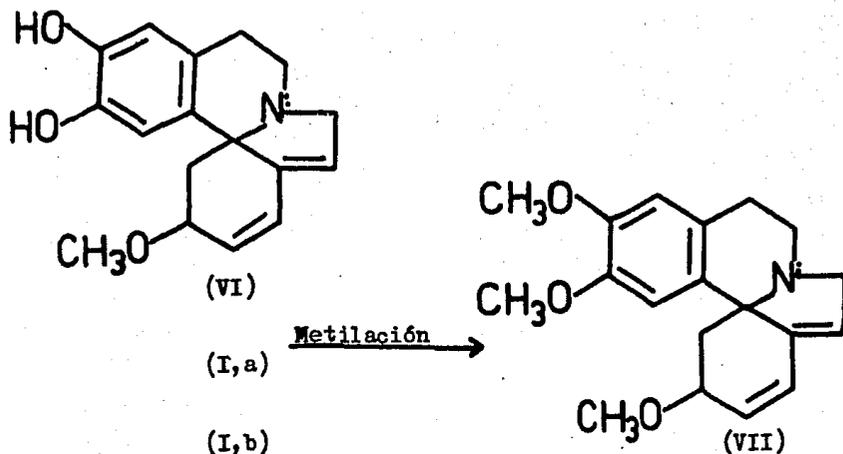
de los años 30's y 40's, cuando se descubrió la acción "curarizante" de los extractos de semillas de varias especies⁶; a pesar de que anteriormente Domínguez y Altamirano (1877) reconocieron dicha acción en extractos de semillas de E. americana¹⁶.

En 1937 Folkers y Major aislaron de varias especies de Erythrina un principio cristalino fisiológicamente activo que estaba formado -- por alfa y beta-eritroidina¹⁷. Estas dos sustancias principalmente la beta-eritroidina actúan farmacológicamente como bloqueadores de la -- transmisión neuromuscular, pudiendo utilizarse como antiespasmódicos y a diferencia del curare que sólo actúa por vía intramuscular, las eritroidinas actúan por vía oral¹⁸.

Después del descubrimiento de las eritroidinas, Folkers y sus co laboradores iniciaron una intensa investigación sobre más de cincuenta especies de Erythrina colectadas por todo el mundo, aislando otros alcaloides. A pesar de que obtuvieron muchos alcaloides puros, pocos fueron los datos con que contaban para deducir sus estructuras². Sin embargo después de un período de intensa actividad se pudieron elucidar sus estructuras.

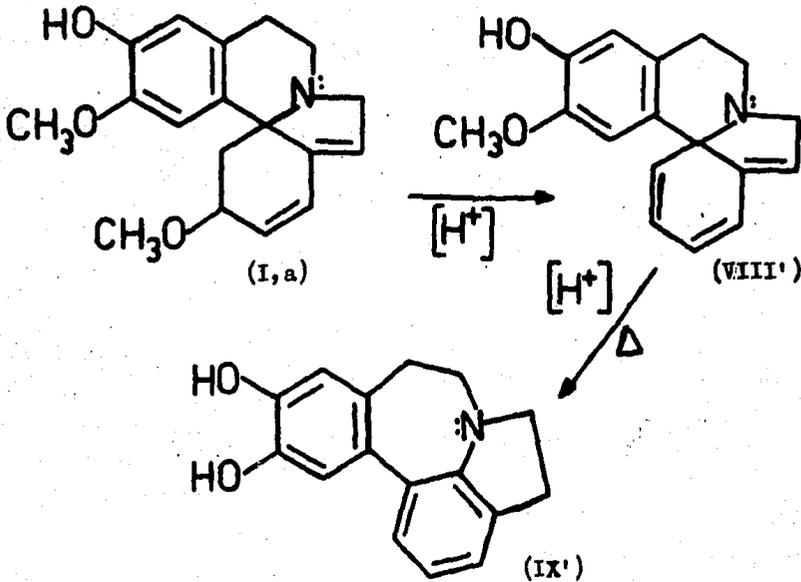
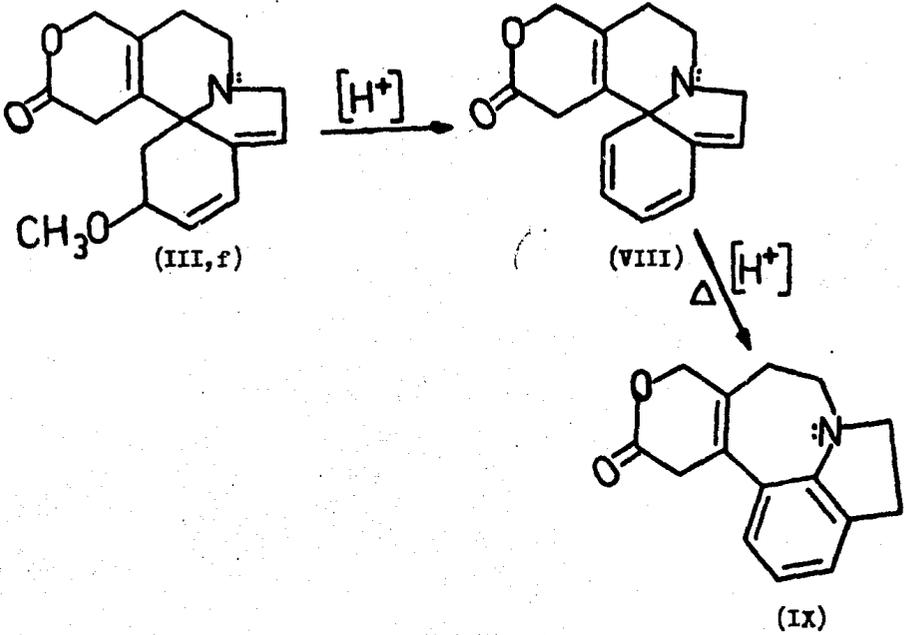
En 1951 Carmack, McKusick y Prelog sintetizaron el eritrinano -- y establecieron la estructura de la espiroamina de los alcaloides de este género¹⁹. Para establecer la mayoría de las estructuras de éstos, se valieron principalmente de las degradaciones y las interrelaciones químicas entre ellos. Por ejemplo, la metilación de la erisodina (I,a)

erisovina (I,b) y la erisopina (VI) dan un producto idéntico: la erisotrina (VII)²⁰, el cual se aisló después como producto natural de otra especie de Erythrina.



Cuando las bases libres erisodina (I,a) y beta-eritroidina (III,f) se pone en medio ácido a temperatura ambiente, se producen sus derivados desmetoxilados (VIII') y (VIII) respectivamente, los cuales al ser sometidos a tratamientos también ácidos pero de manera drástica, — por ejemplo ácido bromhídrico ó polifosfórico a 125 °C, ocurre un reagrupamiento con aromatización del anillo A²¹; como resultado de esta reacción conocida como apotransposición, se obtiene un derivado dihidroindólico que en el caso de apo-beta-eritroidina (IX) y apo-erisopina (IX') son ópticamente inactivos, por destrucción de los centros asimétricos en las posiciones 3 y 5. Este reagrupamiento también se ve

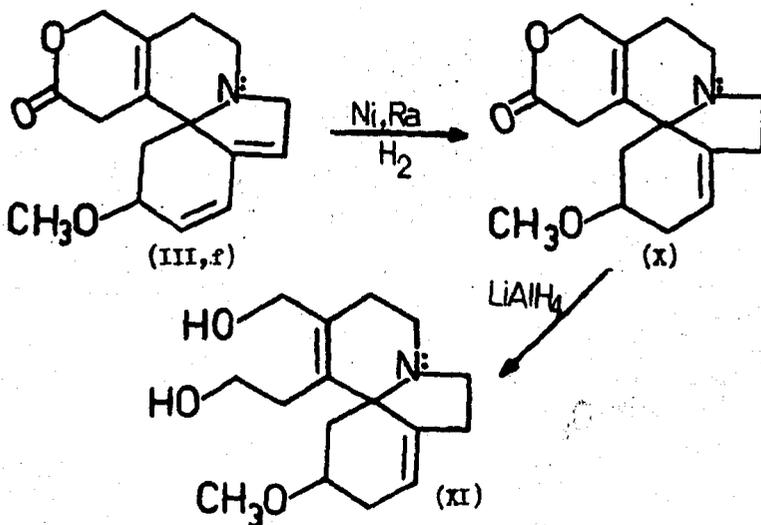
acompañado por el rompimiento de las ligaduras éter en los alcaloides aromáticos.



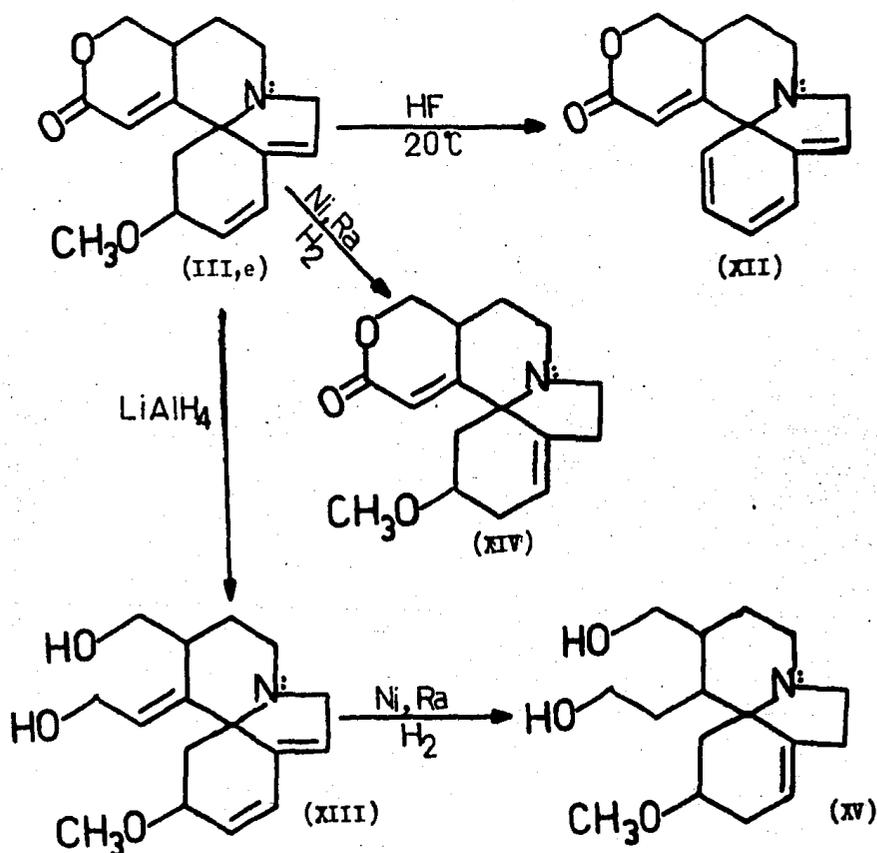
PROPIEDADES GENERALES DE LAS ERITROIDINAS.

Alfa y beta-eritroidina son bases terciarias con dos dobles enlaces capaces de ser hidrogenados, con un grupo metil éter fácil de eliminar y una lactona insaturada. Sus espectros infrarrojo producen bandas a 5.78 μ m debidas al grupo carbonilo y se encuentran en la misma posición, mientras que la absorción máxima al ultravioleta de sus correspondientes clorhidratos son diferentes: 224 nm ($\log E=4.5$) y 238-nm ($\log E=4.4$) respectivamente. Beta-eritroidina da un color rojo característico con ácido sulfúrico y cloruro férrico.

La beta-eritroidina (III,f) puede hidrogenarse con Níquel-Raney²² en solución alcalina, para dar como producto dihidro-beta-eritroidina (X) y a su vez la reducción de esta última con hidruro de litio y aluminio produce el dihidro-beta-eritroidinol (XI).

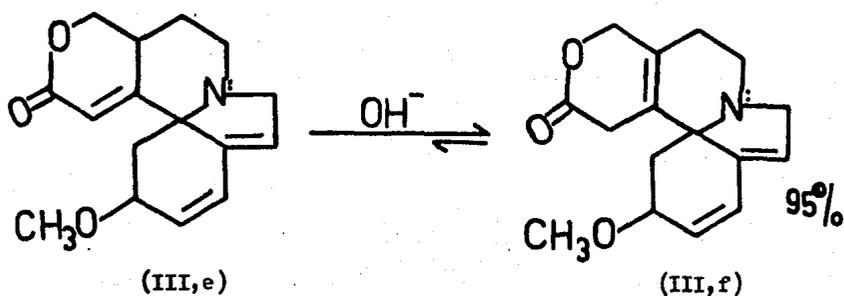


Alfa-eritroidina (III,e) es extremadamente sensible al aire, pero relativamente estable en forma de sus sales²³. Bajo condiciones de reacción de apo-transposición, no da productos aislables y no da ninguna reacción de color²³. Con ácido fluorhídrico a 20 °C produce la — desmetoxi-alfa-eritroidina (XII). La reducción de (III,e) con LiAlH_4 da el diol correspondiente (XIII). Con Niquel-Raney ambas bases (III,e y XIII) son hidrogenadas parcialmente a dihidro-alfa-eritroidina (XIV) y dihidro-alfa-eritroidinol (XV) respectivamente (esquema # 1).



Esquema # 1.

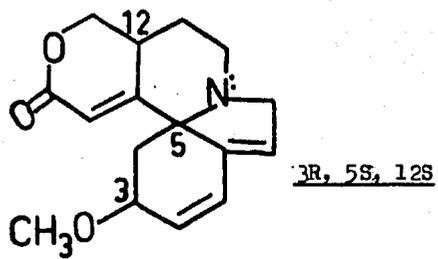
La interrelación entre alfa y beta-eritroidina fué demostrada en 1958 por Boekelheide y Morrison, cuando realizaron la isomerización - de alfa a beta-eritroidina en medio básico²⁴, desplazándose este equi- libro en un 95 % en favor del isómero beta. Esto demostró que ambos - compuestos son isómeros estereoquímicamente iguales y que la única di- ferencia radica en la localización del doble enlace del anillo D.



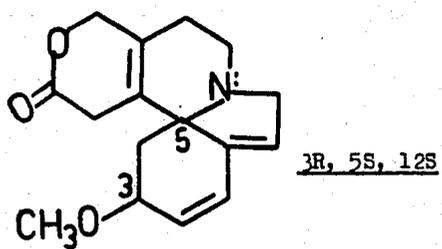
Beta-eritroidina (III,f) posee dos centros asimétricos, uno en - el carbono espiránico (C-5) y otro en el carbono sustituido por el - metoxilo (C-3); en tanto que alfa-eritroidina (III,e) posee a parte - de éstos, otro centro de asimetría adicional en C-12. La asignación de las configuraciones relativas y absolutas de los centros asimétricos - se efectuó por métodos químicos, espectroscópicos y cristalográficos^{25,26,27}, resultando las siguientes configuraciones para dichos isóme- ros:

Alfa-eritroidina: 3R, 5S, 12S.

Beta-eritroidina: 3R, 5S.



ALFA-ERITROIDINA



BETA-ERITROIDINA

FARMACOLOGIA

La acción curarizante de los extractos de semillas de varias especies del género Erythrina, se conoce desde el siglo pasado mediante estudios realizados por Domínguez y Altamirano en 1877¹⁶. Investigaciones posteriores efectuadas en plantas de más de 50 especies de este género, demostraron que todas contenían alcaloides con actividad curarizante.

De los alcaloides farmacológicamente estudiados, se descubrió que uno de los más activos era la beta-eritroidina junto con sus derivados, ya que fueron los primeros agentes efectivos oralmente¹⁸. Beta-eritroidina, es un agente curarizante que produce una acción relajante muscular, apo-beta-eritroidina produce la misma acción, pero ésta es parecida a la de la mefenesina, benzimidazol y glicetal²⁸, en tanto que su acción periférica se ve disminuida.

Slater y colaboradores, queriendo ampliar más a fondo la acción farmacológica de la beta-eritroidina y sus derivados, publicaron un trabajo en 1955 que incluía efectos periféricos y sobre el sistema nervioso central²⁹. La acción periférica fué demostrada por Lehman, cuando administró extractos alcohólicos de semillas de E.americana a animales de prueba³⁰.

Dihidro-beta-eritroidina es cinco veces más potente que beta-eritroidina³¹ y de un quinto a un décimo de potente que la d-tubocurari-

na^{32,33}.

Los alcaloides del género Erythrina, son activos como bases terciarias, en tanto que su cuaternización provoca una reducción de su potencia en aproximadamente cien veces³¹. Con la reacción de apo-transposición, la acción farmacológica de éstos no se prolonga en las conexiones neuromusculares, pero provoca una acción depresora del sistema nervioso central^{28,29}.

Las eritroidinas causan disminución de la presión arterial y de presión respiratoria a dosis paralizantes y a diferencia de la d-tubocurarina, no se libera histamina. La parálisis causada por estos alcaloides puede antagonizarse al igual que en la d-tubocurarina con anticolinesterasas³¹. Beta-eritroidina y dihidro-beta-eritroidina han sido utilizadas en medicina clínica como sustitutos del curare³⁰, dando buenos resultados, demostrando así que estos alcaloides son de mucha importancia farmacológica.

Se ha descubierto, que farmacológicamente la hipaforina actúa como un veneno convulsivante³⁷.

III. DISCUSION DE RESULTADOS

Las semillas de Erythrina breviflora se estudiaron de la siguiente manera: se pesaron, y se molieron en un molino "Thomas Wiley Modelo 4" y se desengrasaron con hexano por extracción continua. El extracto hexánico constituyó el 21.8% en peso de las semillas.

Las semillas libres de disolvente, se extrajeron exhaustivamente con metanol. El extracto metanólico pesó 168.0 g (8.33% en peso de semillas) y presentó un aspecto gomoso café oscuro.

Como en la mayoría de los trabajos publicados con anterioridad - sobre extracción de semillas de otras especies diferentes del género Erythrina se ha encontrado la presencia de hipaforina⁸, se procedió a seguir el método habitual para aislar este alcaloide¹⁴. Se disolvió - el extracto metanólico en la mínima cantidad de solución acuosa de ácido clorhídrico al 5% y se extrajo repetidamente con benceno y después con cloroformo para eliminar la grasa residual. La fase ácida se evaporó a vacío a la mitad de su volumen y se guardó en el refrigerador por dos días, al cabo de los cuales se obtuvieron unos cristales color rosa que se filtraron y reoristalizaron de agua caliente y pesaron 18.1 g (0.90% en peso de semillas), con un punto de fusión de 230 -232 C; por cromatografía en placa fina reveló una mancha con R.f=0.65 (utilizando un sistema de elución cloroformo; metanol 50/50, v/v y Dragendorff como reactivo de revelado); en el espectro infrarrojo (espectro No. 2) la banda a 3250 cm^{-1} ancha sugiere la presencia del grupo

-NH, la banda en 1740 cm^{-1} para un grupo carbonilo y la banda ancha en 1200 cm^{-1} para una unión C-N ó C-O.

El espectro de resonancia magnética nuclear (espectro No.3), mostró una señal sencilla muy intensa en 3.1 ppm, que integró para 10 — protones y por su posición e integración podría asignarse al grupo — $\text{-N}(\underline{\text{CH}}_3)_3$ y otro protón perteneciente a uno de los hidrógenos en posición beta al grupo carbonilo que desplaza en el mismo lugar; en 3.25-ppm aparece una señal sencilla que integra para un protón y se asignó al otro protón beta. En 4.0 ppm aparece una señal que podría interpretarse como doble de dobles que se asignó al protón alfa al grupo carbonilo, con una constante de acoplamiento mayor de 9 Hz, como resultado de su interacción con uno de los protones beta y otra constante menor de 4.8 Hz para su interacción con el otro protón beta y que integra para un protón. En 7.12 ppm se encuentra una señal sencilla dentro de un grupo de señales, que se asignó al protón de la posición 2 del anillo indólico; de 7.05 a 7.25 ppm y de 7.3 a 7.6 ppm aparecen dos grupos de señales múltiples que se asignaron, el primero a los protones 5 y 6 y el segundo a los protones 4 y 7 del anillo indólico.

El espectro de u.v. (espectro No.1), mostró dos absorciones máximas en 231 y 282 nm. La rotación específica (+79.2) demuestra la presencia del carbono alfa asimétrico.

Posteriormente se liberó al alcaloide de su correspondiente clor

hidrato, por medio de una columna de amberlita aniónica como se describe en la parte práctica³⁴. Como resultado se obtuvieron unas agujas blancas cristalinas que correspondieron a hipaforina libre como se observó por sus siguientes constantes; el punto de fusión fué de 249 - 250 C con descomposición. El espectro infrarrojo (espectro No.5) conservó la señal propuesta para el grupo -NH- y desaparecieron un grupo de señales que estaban presentes en el espectro infrarrojo del clorhidrato, en 2750 y 2500 cm^{-1} probablemente la primera debida al -OH del ácido. La señal en 1740 cm^{-1} del carbonilo del ácido se desplazó a 1650 cm^{-1} que corresponde al carbonilo del carboxilato. El espectro de resonancia magnética de hidrógeno (espectro No.6), conserva todas las señales esperadas para este alcaloide.

La fase acuosa libre de cristales de hipaforina, se alcalinizó con bicarbonato de sodio a pH de 8-9 para obtener la fracción de alcaloides "libres" con un 0.91% de rendimiento en base al peso de semillas. En esta fracción se espera encontrar la mezcla de isómeros de alfa y beta-eritroidina, las que se han intentado separar por cromatografía preparativa en capa delgada, cromatografía de gases y el método que dió resultado fué por cromatografía en columna de alúmina neutra grado II-III (Brockman), empleando benceno para eluirlo, como se indica en la parte práctica.

En las primeras fracciones de elución se separaron dos compues--

tos mezclados, uno de los cuales (el más polar) reveló con reactivo de Dragendorff, pero ambos resultaron en una cantidad tan pequeña que no fué posible su posterior separación en otra columna. Las siguientes fracciones de elución mostraron por cromatografía en capa fina una sola mancha que correspondió al compuesto más polar de las primeras fracciones y que al revelar con reactivo de Dragendorff, sugirió la posibilidad de que fuese un alcaloide. Como en esta fracción se han aislado las eritroidinas en semillas de otros géneros de Erythrina, se procedió al análisis de sus constantes espectroscópicas, resultando un compuesto no aromático por i.r y por r.m.n., muy inestable que se descompone por exposición al aire y no fué posible cristalizarlo. El espectro infrarrojo (espectro No.8) presenta una banda fuerte en 1730 cm^{-1} de un grupo carbonilo, además de otras absorciones en 2840, 1090, 890 y 650 cm^{-1} . La rotación óptica a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ es de +123.8 y el espectro de u.v. (espectro No.7) muestra un máximo de absorción en 226-nm ($\log E=4.18$).

El espectro de r.m.n (espectro No.9), muestra las siguientes señales: en 6.4 ppm una señal doble que integra para un protón ($J=11\text{ Hz}$ y 2 Hz). En 5.95 ppm una señal doble ($J=11\text{ Hz}$) que integró para un protón. Ambas señales tienen una constante de acoplamiento igual y por su posición, se asignaron a dos protones vinílicos vecinos entre sí. En 6.76 y 5.76 ppm dos señales simples, también de dos protones vinílicos, uno de ellos aislado (14-H). Estos datos proveen información -

de que se trata de un compuesto de tipo lactona, por sus señales de absorción en u.v. e i.r. y las señales en r.m.n. concuerdan con el número de protones vinílicos que posee alfa-eritroidina. Se corroboró su identidad por el resto de señales en el espectro de r.m.n.: en 4.41 ppm una señal doble de dobles ($J=11$ y 6 Hz), como parte A de un sistema ABX y la parte B del mismo sistema, se encuentra en 4.05 ($J=11$ y 9 Hz), también representada por una señal doble de dobles; juntas integraron para dos protones y se asignaron a los protones del metileno en posición 17.

La señal sencilla ancha en 3.6 ppm que integró para dos protones se asignó al grupo metileno alílico en posición 8 vecino al átomo de Nitrógeno; de 3.5 a 3.9 ppm se encuentra una señal múltiple que se asignó al protón en posición 3 que es base del grupo metoxilo. En 3.36 ppm se encuentra una señal sencilla para los protones del grupo metoxilo; de 2.46 a 3.3 ppm, una señal múltiple que fué asignada a los protones de los grupos metileno en las posiciones 10, 11 y 12 y de 1.56 a 1.93 ppm, una señal múltiple para los protones en posición 4.

Se trató de buscar la presencia de alcaloides liberados en estas semillas, por lo que se hizo lo siguiente:

El extracto acuoso básico agotado de alcaloides "libres" se neutralizó con ácido clorhídrico y después se acidificó hasta un pH de 1. Después de someter la solución a reflujo por cinco minutos, se enfrió

y alcalinizó con bicarbonato de sodio hasta pH de 8 y se extrajo repetidas veces con cloroformo. No se obtuvo algún producto de este tratamiento, por lo que se concluyó que estas semillas no contienen alcaloides "liberados".

En 1966, Leete y Ahmad³⁵ demostraron la incorporación de tirosina -2-C¹⁴ en las eritroidinas y sugieren la formación de alfa-eritroidina en el paso final de la biosíntesis, que por una isomerización de la doble ligadura en C-13 y C-14 del anillo D de la lactona, se forma beta-eritroidina más estable. En una revisión hecha por Hargreaves et al⁸ y por Games et al³⁶ en 1974 de los alcaloides de diferentes especies de semillas de Erythrina, en la mayoría de los casos en que se encuentran alfa y beta-eritroidina presentes, suelen estar mezclados, beta en mayor proporción que alfa, además en algunas especies solamente se encuentra el isómero beta, pero en ningún caso existe el isómero alfa aislado.

Por los resultados obtenidos del estudio de las semillas de Erythrina breviflora, se puede concluir que los alcaloides presentes son hipaforina y alfa-eritroidina como único alcaloide libre, a diferencia de los otros casos citados en la bibliografía.

como una comprobación de la presencia de alfa-eritroidina como único alcaloide libre, se hizo un análisis cualitativo de alcaloides por cromatografía de líquidos de alta resolución, inyectando el extra

to clorofórmico y empleando como estándares externos muestras puras de alfa y beta-eritroidina por separado.

En los cromatogramas resultantes, coincidió el tiempo de retención de alfa-eritroidina con el tiempo de retención de un pico del extracto clorofórmico (extracto purificado), mas no se obtuvo ningún pico con el mismo tiempo de retención del estándar de beta-eritroidina.

Con estos resultados se pudo comprobar que en las semillas de E. breviflora, existe sólo alfa-eritroidina como único alcaloide libre.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato "Fisher Scientific Co" 115 volt-1.4 amp.; 50/60 cycle. Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro "Perkin-Elmer Mod. 599-B", en discos de bromuro de potasio o en solución clorofórmica.

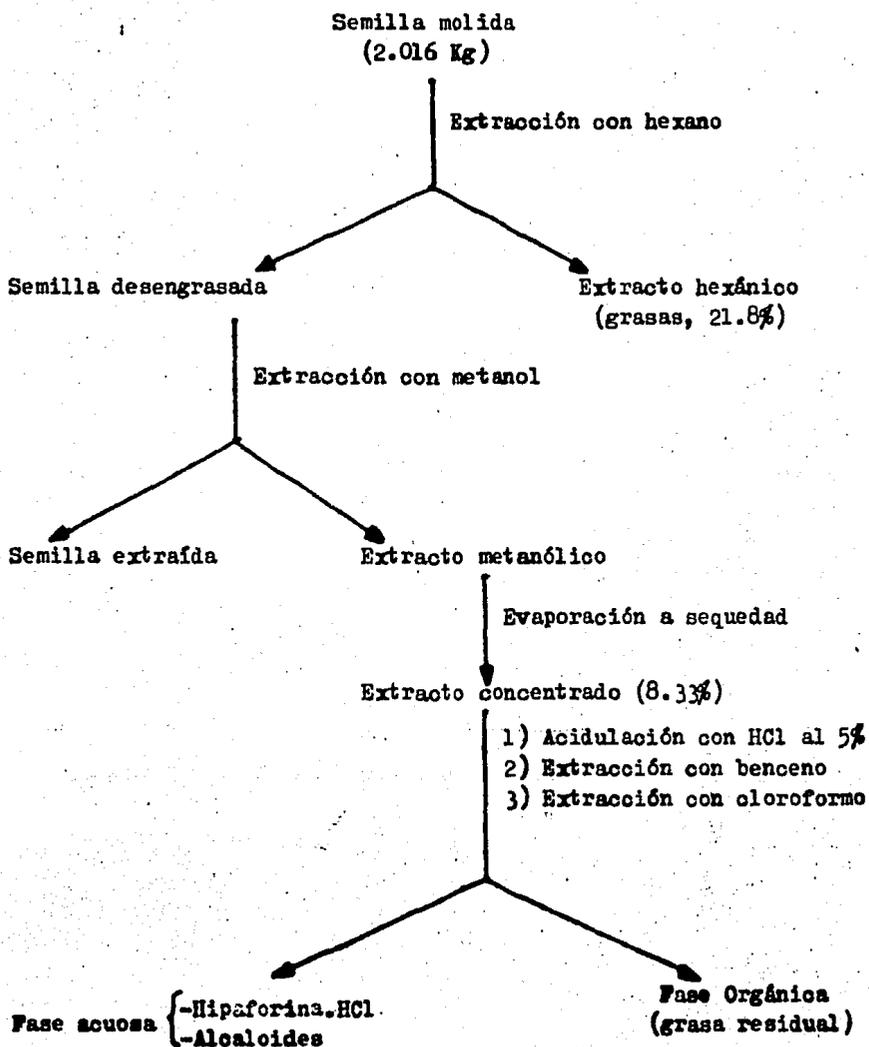
Las rotaciones específicas fueron determinadas en un polarímetro "perkin-Elmer Mod. 241". Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un espectrofotómetro analítico "Varian EM-390" usando agua deuterada o cloroformo deuterado como disolvente, empleando sólo en el caso del espectro de alfa-eritroidina tetrametilsilano como referencia interna; el desplazamiento químico está expresado en partes por millón (ppm), utilizando el parámetro delta.

Los espectros de ultravioleta se determinaron en un espectrofotómetro U.V-visible "Perkin-Elmer Mod. 202".

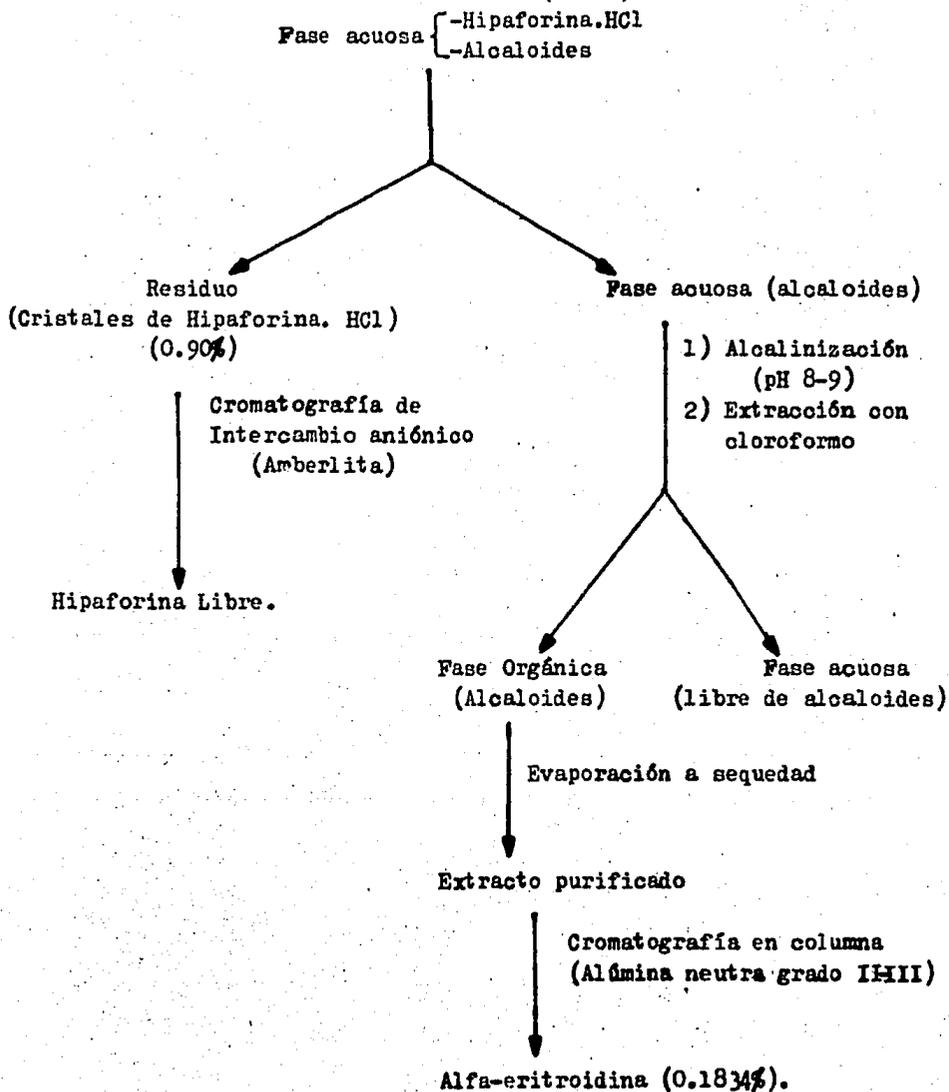
En la cromatografía de líquidos se empleó un cromatógrafo de líquidos "Perkin-Elmer Mod. Series 2".

Para la cromatografía en película se utilizaron placas fluorescentes de gel de sílice (Merck) tipo G-254 y para la columna cromatográfica se empleó alúmina neutra grado II-III (Brockman).

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION



PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION (CONT.)



EXTRACCION DE LAS SEMILLAS.

2.016 Kg de semillas secas de E.breviflora (patol), colectadas - en la región de Tuxpan, Michoacán y molidas en un molino "Thomas Wiley Mod. 4", se sometieron a reflujo durante 24 hr con 3 litros de hexano con el fin de desengrasarlas, repitiéndose este proceso hasta que no se comprobó la presencia de grasas. Los extractos hexánicos se combinaron y se evaporó el disolvente; se obtuvo un residuo aceitoso de color amarillo que pesó 437.2 g (21.68% en peso de semillas). Las semillas desengrasadas y secas se extrajeron continuamente con 3.5 lt de metanol durante 24 hr calentando suavemente la mezcla; este proceso se repitió hasta que los últimos extractos no dieron positiva la prueba para alcaloides con el reactivo de Mayer y Dragendorff.

AISLAMIENTO DE HIPAFORINA

Los extractos metanólicos se juntaron y concentraron en un rotavapor controlando la temperatura del baño maría entre 40-50 °C para evitar la descomposición de los principios activos. Posteriormente con la ayuda de la bomba de vacío se secaron a temperatura ambiente, obteniéndose un residuo gomoso café oscuro que pesó 168.0 g (8.33% en peso de semillas). Este residuo se disolvió en la mínima cantidad de ácido clorhídrico al 5% quedando una fracción insoluble, la cual se eliminó por filtración con vacío. El filtrado ácido se extrajo con

cloroformo y benceno para eliminar grasa residual e impurezas.

La fase acidulada se concentró a vacío a la mitad del volumen original y se puso en refrigeración durante dos días, al cabo de los cuales, cristalizó hipaforina en forma de agujas pequeñas de color rosáceo; al filtrar y recrystalizar estas agujas de agua caliente, se obtuvieron agujas pequeñas blanco rosáceas, las cuales pesaron 18.1 g (0.9% en peso de semillas) y presentaron las siguientes características:

P.f.: 230-232°C (con descomposición); $\lambda_{\text{máx.}}$: 231 y 282 nm (en agua); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +79.2$ (16.8 mg/10 ml, etanol); r.f. (CHCl₃:MeOH 50-50, v/v) = 0.65; i.r. $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$: 3250, 2750, 1740 y 1200 cm⁻¹; r.m.n. (80MHz, D₂O): 3.1 (N(Me)₃), s), 3.04-3.15 (m, β -H), 3.25 (m, β -H), 4.0 (dd, α -H, J:9Hz, — 4.8 Hz, 1-H), 4.6 (HDO), 7.12 (s, 2-H), 7.05-7.25 (m, 5-H y 6-H), 7.3-7.6 (m, 4-H y 7-H) ppm.

OBTENCION DE HIPAFORINA LIBRE

Se utilizó una columna de resina de intercambio iónico de la siguiente manera³⁴:

5g de Amberlita IRA-402 (OH⁻), se suspendieron en un matraz con 7.5 ml de agua destilada, se lavó la resina y se transfirió a un embudo Büchner donde se enjuagó con 10 ml de agua y después con 25 ml de una solución 1N de hidróxido de sodio. Se lavó la amberlita con agua hasta que el pH de los lavados fué neutro, evitando dejar la resina -

expuesta al aire. Finalmente se lavó con 30 ml de etanol del 96 y se transfirió la suspensión a una bureta de 50 ml y se lavó con agua. Se aplicaron 100 mg de clorhidrato de hipaforina disueltos en la mínima cantidad de agua, eluyéndose la columna con el mismo disolvente y se obtuvieron 85.0 mg del compuesto eluido, el cual se recrystalizó de agua caliente y presentó las siguientes características:

Agujas blancas cristalinas; p.f.= 249-250 °C con descomposición;-

$\lambda_{\text{máx.}}$: 229.5 y 280 nm (en agua); i.r. $\left. \begin{array}{l} \text{KBr} \\ \text{máx.} \end{array} \right\}$: 1650, 1730 cm^{-1} ; r.m.n.

las señales observadas en el espectro fueron consistentes con las esperadas.

PURIFICACION DEL EXTRACTO

La fase acuosa libre de alcaloides se alcalinizó con bicarbonato de sodio a un pH entre 8 y 9, y se extrajo repetidas veces con porciones de cloroformo hasta que los últimos extractos clorofórmicos no dieron positiva la prueba para alcaloides con los reactivos de Mayer y Dragendorff. Los extractos clorofórmicos combinados, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a sequedad, obteniéndose 18.44 g (0.91% en peso de semillas) de un residuo gomoso café. Se corrió una placa cromatográfica que al u.v. presentó 3 manchas en un sistema cloroformo:metanol 50-50,v/v, una de las cuales reveló con reactivo de Dragendorff presentando un r.f.= 0.82.

AISLAMIENTO DE ALFA-ERITROIDINA

200 mg del extracto purificado se adsorbieron en 1g de alúmina, - la cual una vez seca se agregó a una columna cromatográfica de 1.5 cm de diámetro por 70 cm de altura, empacada con 70 g de alúmina neutra grado II-III (Brockman), empleando como eluyente benceno.

En las primeras fracciones (1-8 de 100 ml c/u) no se observó mancha alguna al correr placas cromatográficas y revelarlas con U.V.; de las fracciones 9-12 de 100 ml c/u se observó la presencia de dos manchas, una de las cuales reveló con reactivo de Dragendorff. A partir de la fracción 13 se observó la presencia de una sola mancha la cual siguió apareciendo hasta la fracción 20, todas de un volumen de 50 ml y presentó el mismo r.f que la mancha más polar de las fracciones 9-12 al revelarla con reactivo de Dragendorff, el cual fué de 0.55 en un sistema cloroformo:metanol 95-5 (v/v).

Con el fin de aislar otros alcaloides un poco más polares que el primero, se cambió el sistema de elución a benceno:acetato de etilo - 95-5 (v/v), a partir del cual se empezaron a coleccionar fracciones de - 100 ml c/u, aislándose otra sustancia en tan pequeña cantidad que no fué posible su identificación.

Se obtuvieron 40.1 mg (0.1834% en peso de semillas) del alcaloide aislado, el cual presentó las siguientes características:

Sólido amarillento, r.f (CHCl₃:MeOH, 95/5, v/v) = 0.55; $\lambda_{\text{máx.}}$: 226

nm ($\log E = 4.18$); i.r.) $\frac{\text{CHCl}_3}{\text{máx.}}$: 2840, 1730, 1090, 890 y 650 cm^{-1} ; r.m.n
 : (90 MHz, TMS): 6.4(dd, $J_{2-1} = 11$ Hz, $J_{2-3} = 3$ Hz, 2-H), 5.95(d, $J_{1-2} =$
 11 Hz, 1-H), 5.76(s, 14-H), 5.73(s, 7-H), 4.41(A de ABX, dd, $J_{A,B} = 11$ -
 Hz, $J_{AX} = 6$ Hz, 17-H_{ax} 6 eq), 4.05(B de ABX, dd, $J_{B,A} = 11$ Hz, $J_{B,X} = 9$ Hz,
 17-H_{ax} 6 eq), 3.5-3.9(m, 3-H), 3.6(s.a, 8-H), 3.36(s, -OCH₃), 2.46-3.3
 (m, -CH₂-, 10, 11, 12-H), 1.56-1.93 ppm(m, -CH₂-, 4-H).

IDENTIFICACION DE ALFA-ERITROIDINA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
 DE ALTA RESOLUCION.

Cromatógrafo: "Perkin-Elmer Mod. Series 2"

Condiciones: Fase reversa

Fase Móvil: Agua:Metanol 5/95 (v/v)

Velocidad de Flujo: 1.5 ml/min.

Longitud de onda del detector: 223 nm.

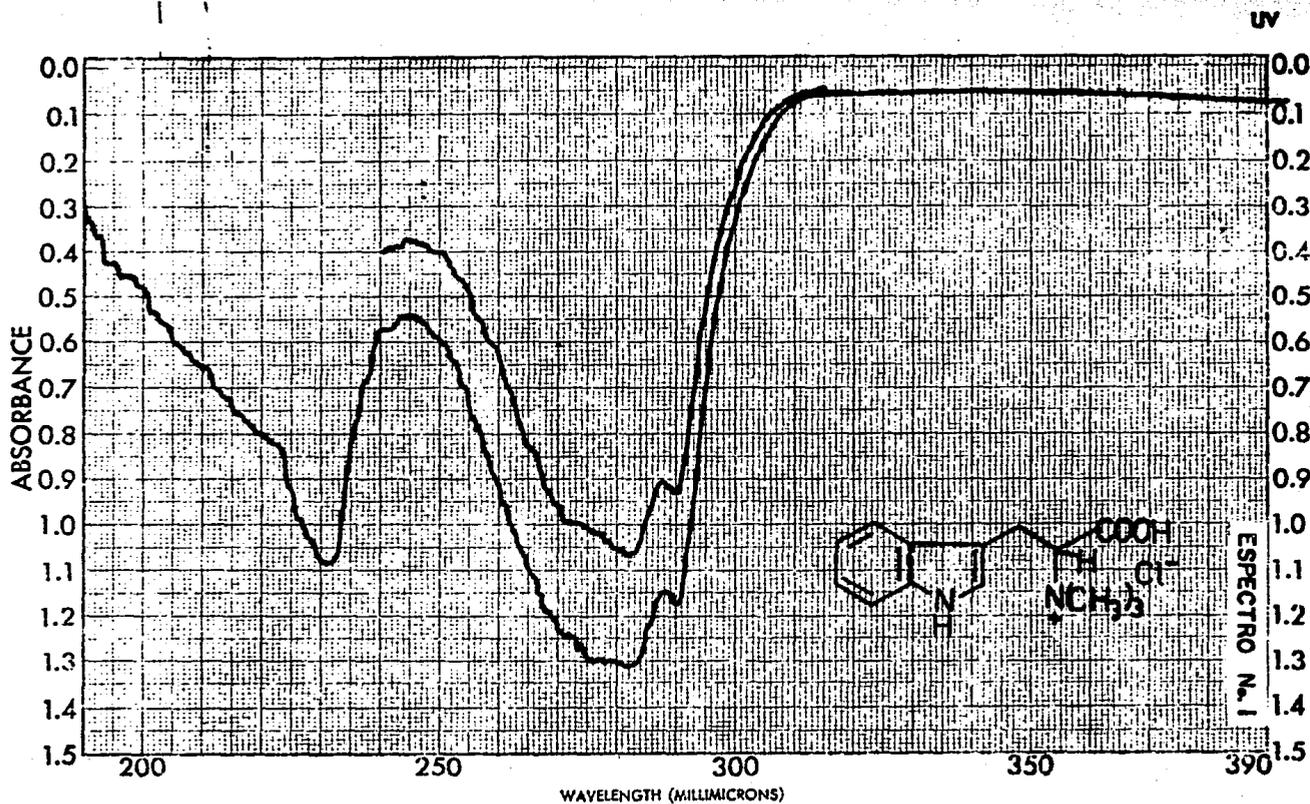
Columna: Microbondapack (C-18), unido químicamente un grupo ciano.

En estas condiciones se inyectaron muestras de alfa y beta-eri-
 troidina como estándares externos, las cuales mostraron un tiempo de_
 retención de 2.75 y 3.34 minutos respectivamente. Posteriormente se -
 inyectó una muestra del extracto clorofórmico purificado y se obtuvo_
 solamente un tiempo de retención que fué de 2.77 min, el cual coinci-
 de con el tiempo de retención de alfa-eritroidina. Para comprobar que
 no había beta-eritroidina en el extracto, se inyectó una muestra de -

extracto purificado adicionado de beta-eritroidina estándar, obteniéndose un tiempo de retención a los 3.33 minutos, pero alcanzándose a distinguir un borde antes de que se alcanzara el pico máximo y que correspondía al isómero alfa. Esto no es de extrañar, ya que como se mencionó en la discusión de resultados, la separación de estos isómeros es difícil por métodos cromatográficos y a esto se debe que tengan un tiempo de retención aproximado.

E S P E C T R O S

1. Ultravioleta del Clorhidrato de Hipaforina
2. Infrarrojo del Clorhidrato de Hipaforina
3. Resonancia magnética protónica del Clorhidrato de
Hipaforina
4. Ultravioleta de Hipaforina libre
5. Infrarrojo de Hipaforina libre
6. Resonancia magnética protónica de Hipaforina libre
7. Ultravioleta de Alfa-eritroidina
8. Infrarrojo de Alfa-eritroidina
9. Resonancia magnética protónica de Alfa-eritroidina.

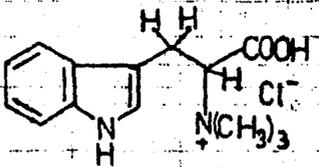
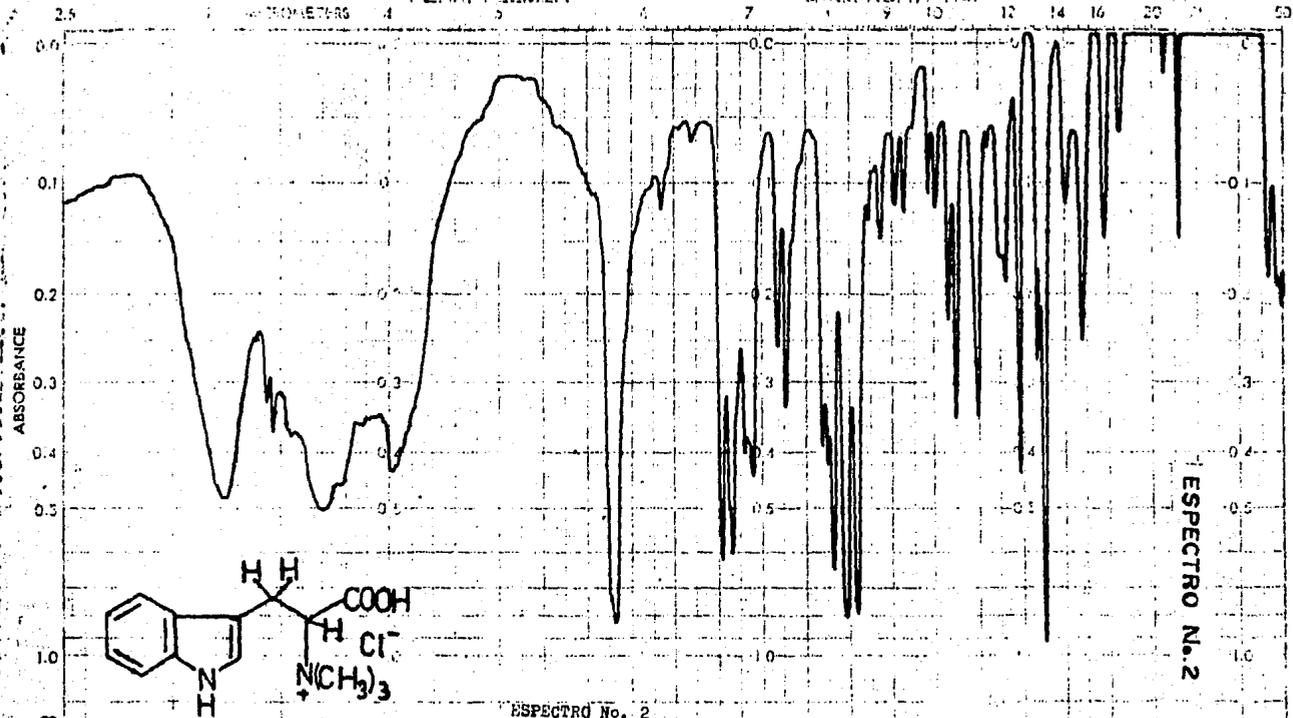


ESPECTRO No. 1

SAMPLE Hipatorina·HCl	CURVE NO. <u>1567</u>	SCAN SPEED <u>12</u>	OPERATOR <u>Silvia</u>
ORIGIN <u>Parke Davis</u>	CONC.	SLIT <u>25</u>	DATE <u>19/11/85</u>
SOLVENT <u>H₂O</u>	CELL PATH <u>1 cm</u>	REMARKS	
	REFERENCE <u>H₂O</u>		

PART NO. 202-1511

PERKIN-ELMER



SPECTRO No. 2

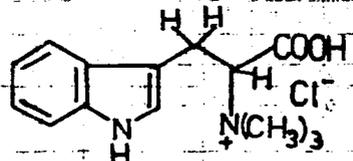
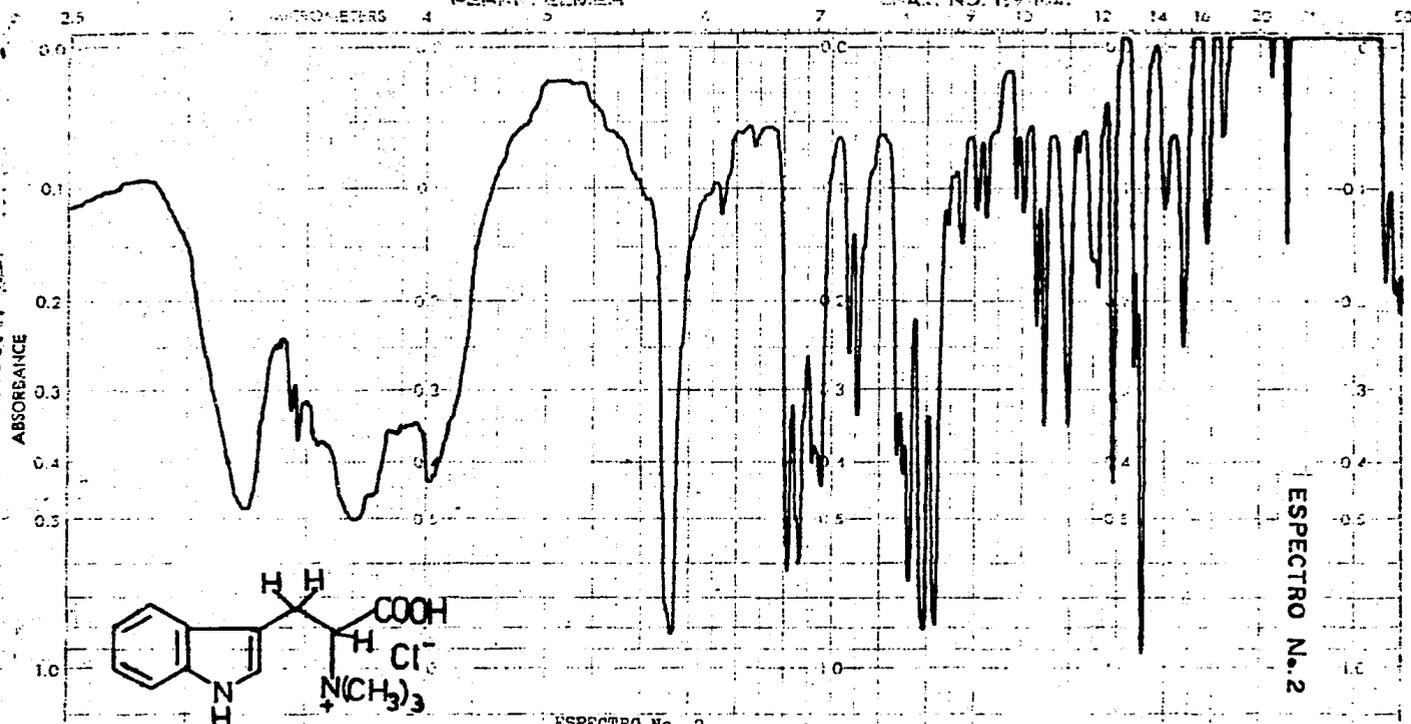
SPECTRO No. 2

EXP. NO. <i>19274</i>	PREP. BY <i>Nipolovina H.C.</i>	EXPANSION <i>100</i>	WEIGHT <i>0.35</i>	SCAN TIME <i>1.2</i>	MULTIPLIER <i>1</i>	REP. SCANS <i>1</i>	SINGLE SCANS <i>1</i>
SAMPLE NAME <i>1-61</i>		REMARKS <i>pure</i>		SOLVENT <i>Me</i>		CELL PATH <i>cm</i>	
DATE <i>9/4</i>		ANALYST <i>L.S.</i>		SPLIT PROSPAM <i>0</i>		OPERATOR <i>L.S.</i>	

SAMPLE REF. NO.

PERKIN-ELMER

CHART NO. 199 1044



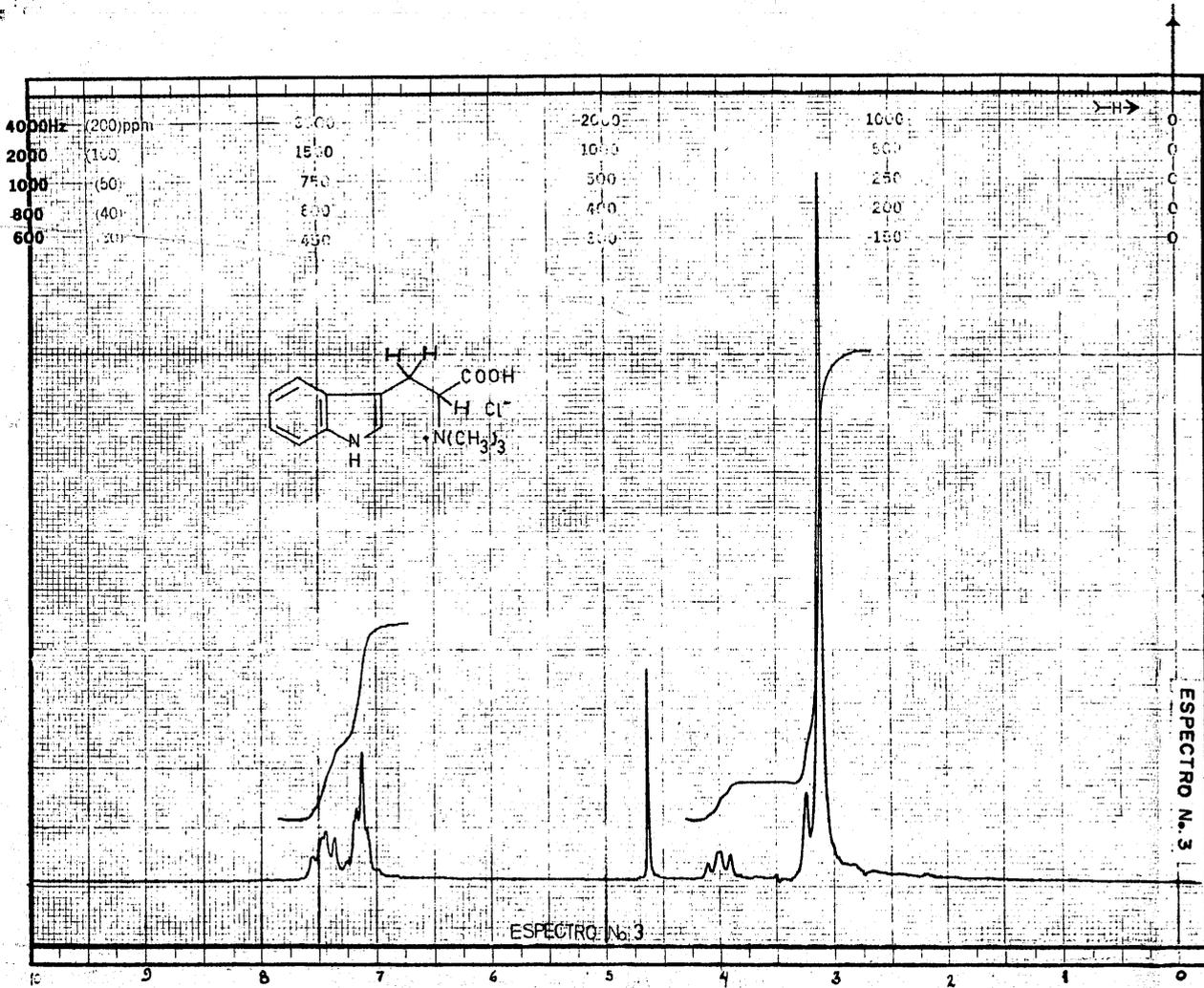
ESPECTRO No. 2

ESPECTRO No. 2

EXPERIMENTAL DATA	DATE	SCANNING RATE	SCAN TIME	REP. SCANS	SINGLE
15274		AB5	1.2		
SAMPLE NAME	REMARKS	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE
Nipostolina-HCl	prepn	H ₂ O		cm	
EXP. NO. 15274					
DATE 9-2-61					
ANALYST J. L. ...					

SAMPLE

REF. NO.



FT-80A SPECTRUM NO. 5301
 OPERATOR JC DATE 2/10/67
 NUCLEUS ¹H FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME WEFT
 FILE NAME _____
 SAMPLE MJE

NI-1-61
(PD-180-E-90-A)
30 mg

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL D₂O
 SPIN RATE _____ rps. TEMP _____ °C
 INSERT _____ mm

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 1000 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) 30
 ACQUISITION TIME (AT) 3 sec.
 PULSE WIDTH (PW) 60 μsec.
 PULSE DELAY (PD) 60 sec.
 DATA POINTS (DP) 6K

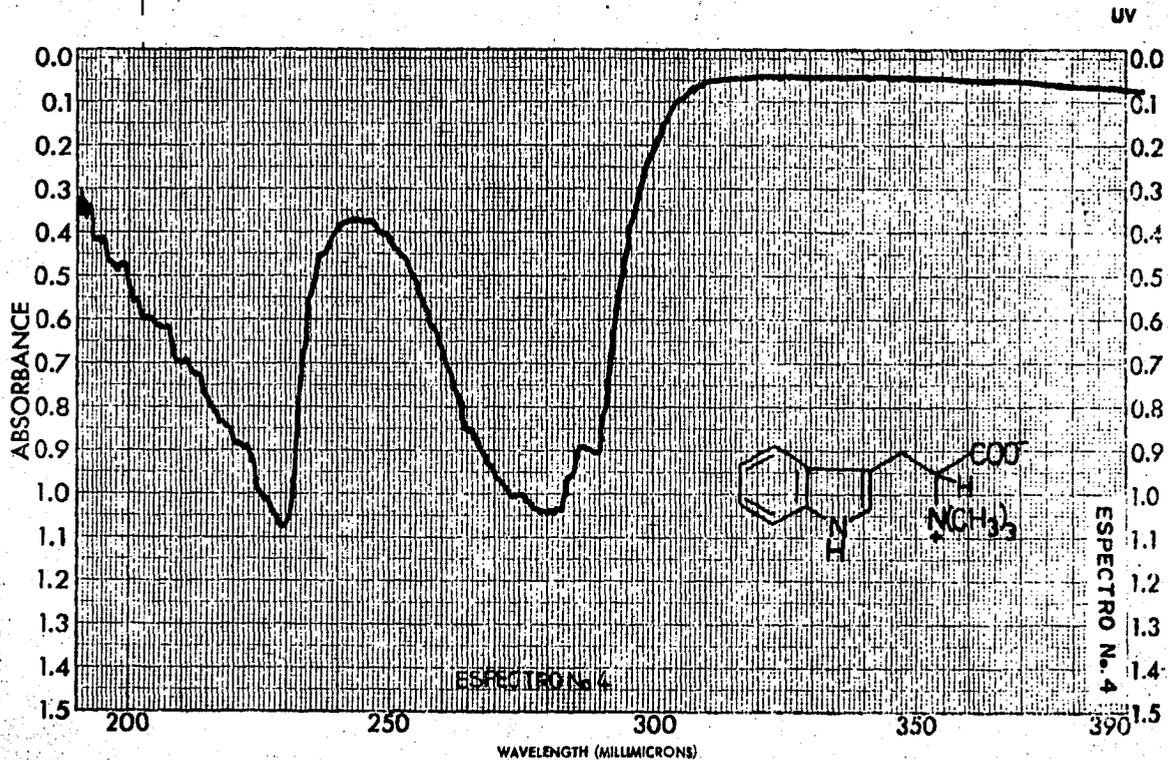
TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) 3

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) 800 Hz
 END OF CHART (EC) 0 Hz
 VERTICAL SCALE (VS) 120
 REFERENCE LINE (RL) 370.4 Hz

ESPECTRO N. 3

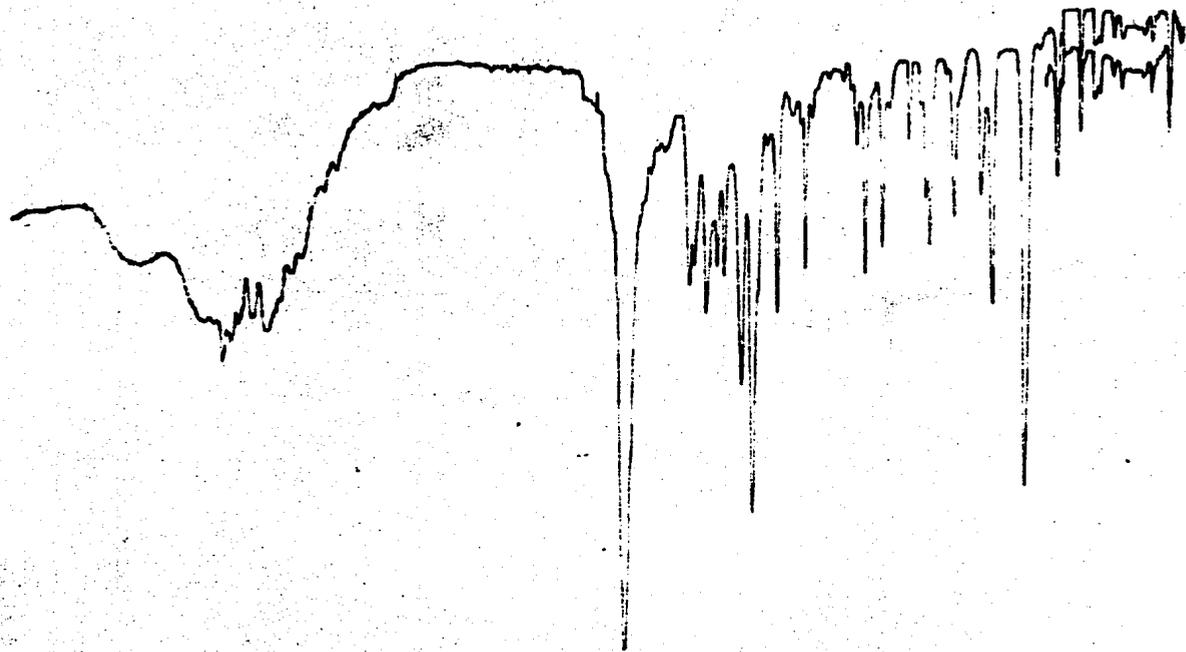
ESPECTRO No. 3



SAMPLE <u>PR-14-1</u>	CURVE NO. <u>1568</u>	SCAN SPEED <u>E</u>	OPERATOR <u>Silva</u>
<u>Hipafarina Libre</u>	CONC. <u>-</u>	SLIT <u>25</u>	DATE <u>12/1/80</u>
ORIGIN <u>Pedra Branca</u>	CELL PATH <u>1cm</u>	REMARKS	
SOLVENT <u>H₂O</u>	REFERENCE <u>H₂O</u>		

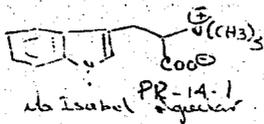
PART NO. 202-1511

PERKIN-ELMER



ESPECTRO No 5

ESPECTRO N. 5



KBr
 -
 Aire

12
 N
 Harisela
 22.X.85

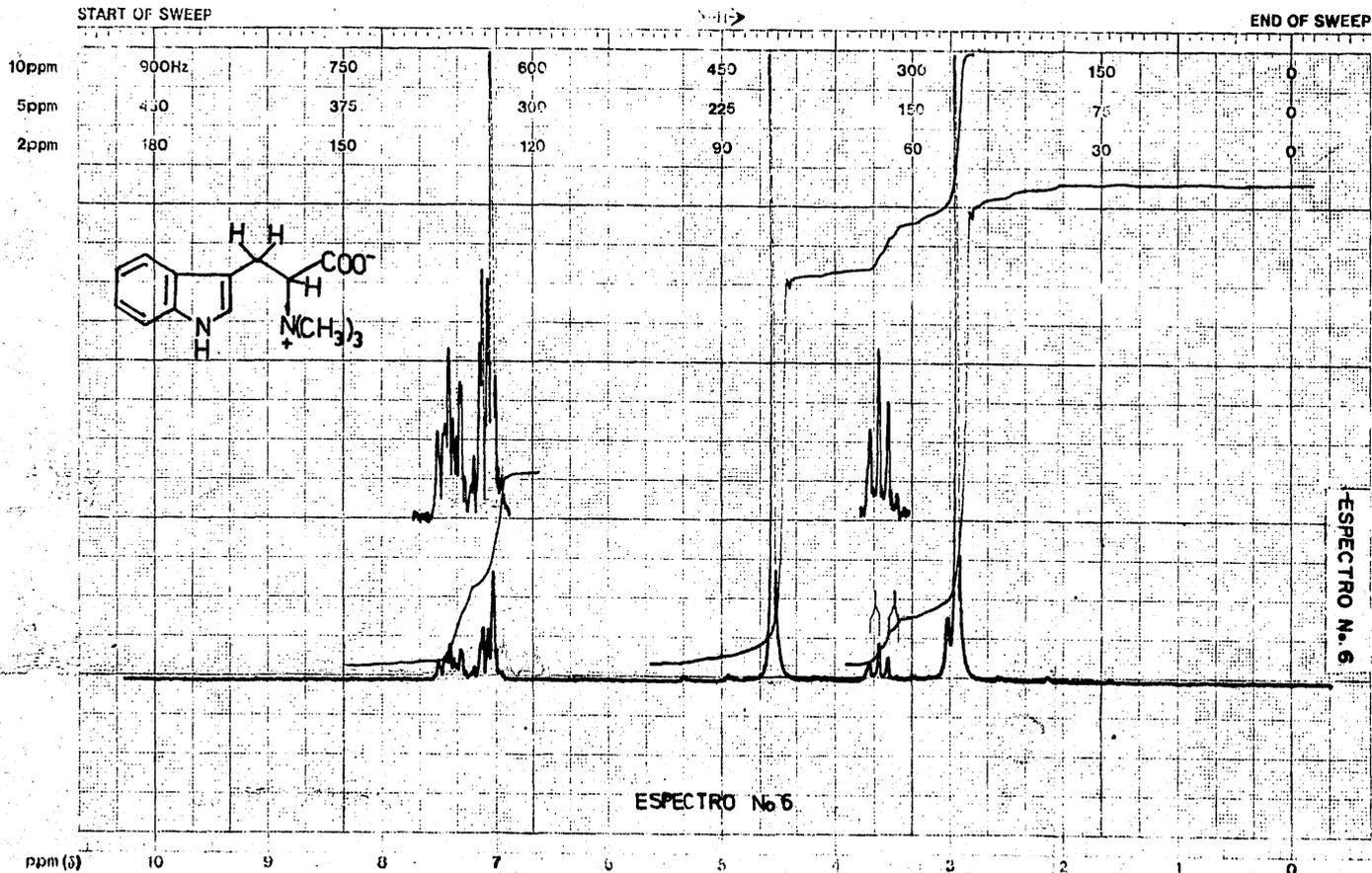
pastilla

1257



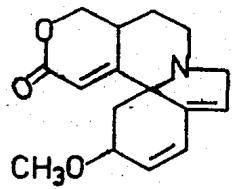
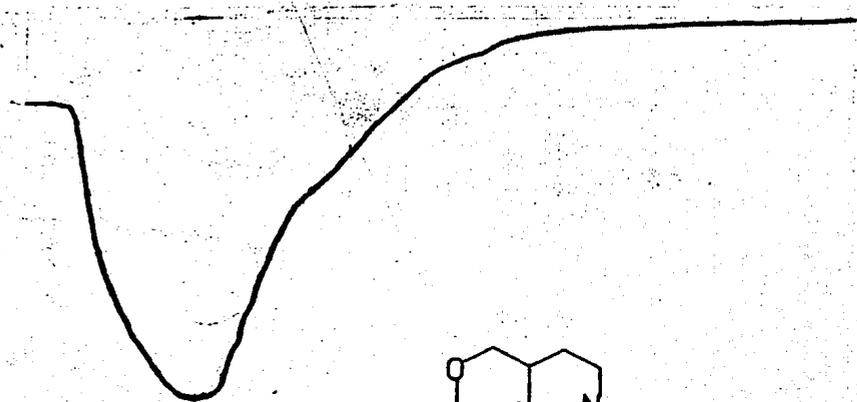
varian instrument division

palo alto, california



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS.	ppm	SPECTRUM AMPL: 4.1 x 100	SWEEP TIME: 5	min	NUCLEUS: H	SAMPLE: 5-methyl	OPERATOR: <i>Alfonso</i>
LOCK POWER	mG	FILTER: 6.0 sec	SWEEP WIDTH: 10	ppm	ZERO REF.	P2-14-1	DATE: 20-V-86
DECOUPLE POS.	ppm	RF POWER: 6.10 mG	END OF SWEEP: 0	ppm	SAMPLE TEMP: 9	C	SOLVENT: D ₂ O
DECOUPLING POWER	mG						SPECTRUM NO. 11 134

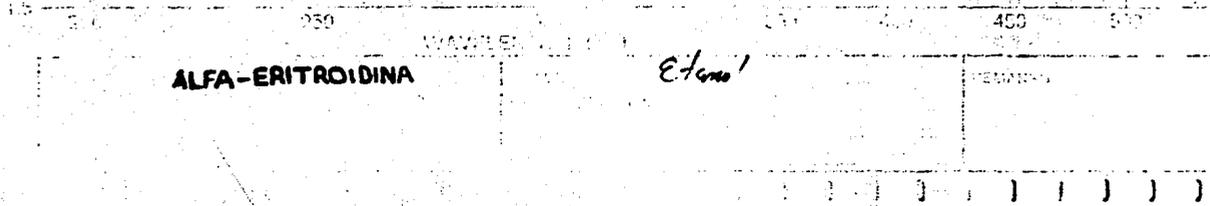


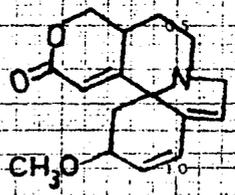
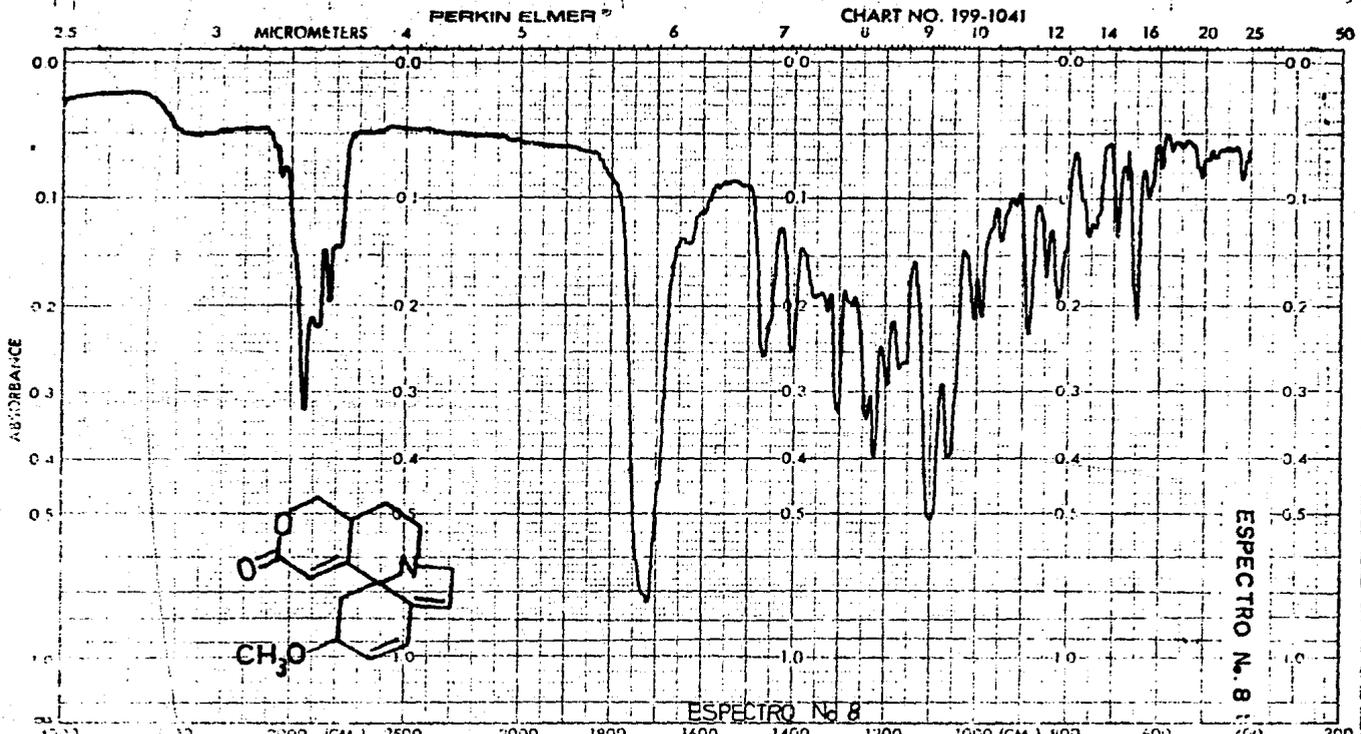
ESPECTRO No 7

ESPECTRO N.º 7

ALFA-ERITROIDINA

Eritro!





ARSCISSA		ORDINATE	SCAN TIME	REP. SCAN	SINGLE BEAM
EXPANSION	EXPANSION	% T	MULTIPLIER	TIME DRIVE	12
	ABS		SLIT PROGRAM	OPERATOR	Slava Morsch DATE 02/25
REMARKS	falsum		SOLVENT	CELL PATH	
			CONCENTRATION	REFERENCE	

SAMPLE REF. NO.

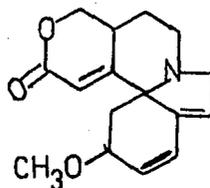
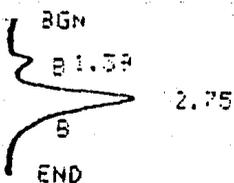
C R O M A T O G R A M A S

1. Estándar de Alfa-eritroidina
2. Estándar de Beta-eritroidina
3. Extracto purificado
4. Extracto purificado adicionado de
Beta-eritroidina.

INST 1 METH 1 FILE 15

RUN 9 ALFA-ERITROIDINA, PURA 16 : 11.7 5 / 28 / 86

SENSITIVITIES 50 4

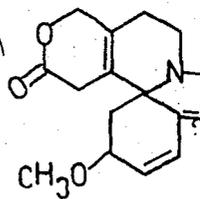
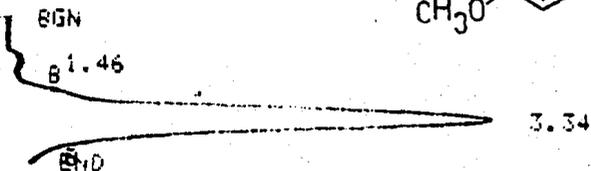


CROMATOGRAMA No. 1

INST 1 METH 1 FILE 9

RUN 2 BETA-ERITROIDINA, PURA

SENSITIVITIES 50 4

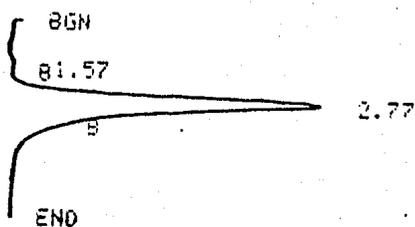


CROMATOGRAMA No. 2

INST 1 METH 1 FILE 15

RUN 9 EXTRACTO PURO 15 : 35.0 5 / 28 / 82

SENSITIVITIES 50 4

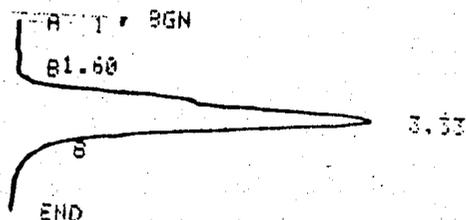


CROMATOGRAMA No. 3

INST 1 METH 1 FILE 17

RUN 11 EXTRACTO PURO + BETA-ERITROIDINA

SENSITIVITIES 50 4



CROMATOGRAMA No. 4

V. CONCLUSIONES

- De 2.016 Kg de semillas de E. breviflora, se aislaron dos productos que se identificaron como hipaforina y alfa-eritroidina, de acuerdo a las constantes físicas que presentaron la betaína libre y su clorhidrato del primer compuesto y la base libre del segundo, así como por análisis de sus respectivos espectros de ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética protónica. Los rendimientos obtenidos fueron 0.9% y 0.18% respectivamente por peso de semilla.

- A diferencia de las semillas de otras especies de Erythrina, no se encontró beta-eritroidina ni alcaloides liberados en esta especie.

- Por análisis preliminares analíticos de cromatografía de líquidos de alta resolución, se comprobaron los resultados obtenidos en la separación por columna cromatográfica.

- Un estudio más a fondo sobre la separación de estos alcaloides por cromatografía de líquidos de alta resolución, tiene gran valor potencial tanto para estudios analíticos como en escala preparativa, ya que es posible separar compuestos que por otros métodos (cromatografía en placa preparativa y de gases) es imposible separar. Tal es el caso de alfa y beta-eritroidina; además se disminuye el tiempo de análisis, ya que por técnicas convencionales para aislamiento de alcaloides involucra procesos de extracción, cromatografía y cristalización que son más tardados que por el método de cromatografía de líquidos, además de que se disminuye el gasto de disolventes y reactivos.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Raven, P.H., Lloydia, 40, 401(1977)
2. Graham, A. y Spencer, T.A., Lloydia, 40, 413(1977)
3. Información obtenida del Herbario Nacional de México, Instituto - de Biología (INXU) UNAM, Ciudad Universitaria.
4. Barneby, R.C. Y Krukoff, B.A., Allertonia, 3(1), (1982)
5. Krukoff, B.A. y Barneby, R.C., Lloydia, 37, 332-459(1974)
6. Chewla, A.S., Chunchatprasert, S. y Jackson, A.H., Organic Magnec-
tic Lawrence, 21, 39(1983)
7. Pelletier, S.W., Chemistry of the Alkaloids, Van Nostrand Reinhold Co. N.Y. (1970), pp. 173-197.
8. Hargreaves, R.T., Johnson, R.D., Millington, D.S., Mondal, M.H., - Beavers, W., Becker, L., Young, C. y Rinehart Jr. K.L., Lloydia, - 37, 569(1974)
9. Hansen, H.D., Lynn, G.D., Fellows, E.L. y Hallwachs, W., Phytoche-
mistry, 21(5). 1035(1982)
10. Folkers, K., Shavel, J. y Koniuszy, F., J. Chem. Soc., 63, 1544(1941)
11. Barton, D.H.R., Gunatilaka, A.A., Letcher, R.M., Lobo, A.M. y Widdow- son, D.A., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 874(1973)
12. Folkers, K. y Unna, K., J. Am. Pharm. Assoc., 1019 (1939)
13. Folkers, K., Koniuszy, F. y Shavel, J., J. Am. Chem. Soc., 63, 1544 (1941).
14. Folkers, K. y Koniuszy, F., J. Am. Chem. Soc., 62, 1677(1940)

15. Folkers, K. y Koniuszy, F. U.S. Pat., 2,391, 013, Dic. 18, 1945 ---
Chem. Abstract, 40, 1283(1946)
- 15bis. Miara, G.A., Ikram, M., Sultana, F. y Khan, M.I., Lloydia, 35, 92
(1972)
16. Domínguez y Altamirano, F., 1877, Gac. Méd. México, 12:77
17. Folkers, K y Major, R.T., J. Am. Chem. Soc., 59, 1580(1937)
18. Giral, F. y Placencia, M., Revista de la Asociación Farmacéutica Mexicana, 2, 65(1970)
19. Carmack, M., McKusick, B.C. y Prelog, V., Helv. Chem. Acta., 34, --
1601(1951)
20. Cordeil, G.A., Introduction to Alkaloids., A Wiley-Interscience Publication., USA(1976) pp. 450-461
21. Sauvage, G.L. y Boekelheide, V., J. Am. Chem. Soc., 72, 2062(1950)
22. Boekelheide, V. y Agnello, E., J. Am. Chem. Soc., 73, 2286(1951)
23. Boekelheide, V. y Grundon, M.F., J. Am. Chem. Soc., 75., 2563(1951)
24. Boekelheide, V. y Morrison, G.G., J. Am. Chem. Soc., 80, 3905(1953)
25. Boekelheide, V. y Wenzinger, R., J. Org. Chem., 29, 1307(1958)
26. Hanson, A.W., Proc. Chem. Soc., 52(1963)
27. Hill, R.K. y Shearer, W.R., J. Org. Chem., 27, 921(1962)
28. Sauvage, G.L., Berger, F.M. y Boekelheide, V., Science, 109, 627(1949)
29. Megirian, D., Leary, D.E. y Slater, I.H., J. Pharmacol. Exptl. Therap.
113, 212(1955).

30. Craig, L.E. en "The Alkaloids", Vol. 5, Manske, R.H., Ed. Academic Press, New York, N.Y. (1950)
31. Unna, K., Kniazuck, M. y Grelin, J.G., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 80, 39(1943)
32. Marian, L. en "The Alkaloids", Manske, R.H.F. y Holmes, H.L., Vol. II., Academic Press, New York (1952) pp. 499
33. Hanna, C., McMillan, W.H. y McHugo, P.R., Arch. Int. Pharmacodyn. - 124, 445(1960)
34. McLaughlin, J.L. and A.G. Paul., Lloydia, 29, 315(1966)
35. Leete, E. y Ahmad, A., J. Am. Chem. Soc., 88(20), 4722(1966)
36. Games, D.E., Jackson, A.H., Khan, N.A. y Millington, D.S., Lloydia, 37(4), 581(1974)
37. "The Merck Index", 10th Edition, Published by Merck & Co., Inc., - Rahway, N.J. USA. (1983), pp. 4783.