

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS GLUCOSIDOS
DE DIOSCOREA COMPOSITA

186

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
H E L G I J U N G C O O K

- 1975 -



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CLAS. Tesis
ADQ. 1925
FECHA
PROC. M-1-120 179



QUÍMICA

A MIS PADRES CON MUCHO CARINO

A MIS HERMANAS

A MI MAESTRA

Dra. Ofelia Espejo
por su valiosa ayuda
y apreciables consejos

Agradezco la colaboración
de Jesús Campos Llavot en
el desarrollo de este trabajo

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr.	Francisco Sánchez Viesca
VOCAL:	Q.F.B.	Ma. Luisa García Padilla
SECRETARIO:	Dra.	Ofelía Espejo de Ochoa
1er. SUPLENTE:	Dra.	Carmen Rivera de Reyes
2do. SUPLENTE:	Dr.	Jorge Reyes López

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Laboratorio de Fitoquímica
de la Facultad de Química
U. N. A. M.

SUSTENTANTE: HELGI JUNG COOK
ASESOR DEL TEMA: DRA. OFELIA ESPEJO DE OCHOA

I N D I C E

INTRODUCCION

GENERALIDADES

PARTE TEORICA

PARTE EXPERIMENTAL

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

La familia Dioscoreaceae está constituida por el -- género grande Dioscorea y por 7 u 8 géneros de pocas especies. La Dioscorea misma contiene entre 600 y 600 especies que se - distribuyen por el mundo, principalmente en las zonas tropi-- cales.

Con pocas excepciones son bejuco trepadores. Todas las especies desarrollan órganos de almacenamiento: tubércu-- los. El tubérculo puede vivir por años creciendo en tamaño y extendiéndose por todos lados o bien puede morir anualmente - durante el proceso de germinación del tubérculo. Generalmente las Dioscoreas del continente americano tienen tubérculos --- verdaderamente perennes.

Los tubérculos sirven como reserva de alimento para la planta, con el fin de que pueda sobrevivir en tiempos de - sequía o bien en el invierno. Son atractivas para animales - que cavan y comen tubérculos, ya que son suculentas fuentes - de almidón; sin embargo, durante su evolución, las Dioscoreas han adquirido características especiales que las protegen -- contra animales. Entre estas características tenemos que al-- gunas han desarrollado tubérculos muy hondos, otras poseen - espinas, algunas contienen sabores desagradables o bien con--

tienen venenos que pueden ser de dos tipos: alcaloides o saponinas. Hasta ahora no hay evidencia alguna de que las saponinas juegen otro papel en la planta viviente.

Dioscorea composita Hemsl:

Planta robusta, alta, trepadora, tallo liso, sin espinas, inflorescencia robusta, filamentos desiguales, anteras en lóculos separados, brácteas agudas, anchamente lanceoladas periantios carnosos de 3 mm de longitud, rizoma grande, sub--tuberoso, hipógeo, flores pequeñas unisexuales. La inflores--cencia masculina es robusta, la femenina es alargada. Se multiplica asexualmente por bulbillos axilares. Estos bulbillos son las yemas, que en su parte inferior se atrofian.

Nombre local: "Barbasco"

Distribución: Veracruz, Puebla, Tabasco, Oaxaca y Chiapas.

GENERALIDADES

GLUCOSIDOS.-

Los glucósidos pueden definirse como derivados cetálicos de formas cíclicas de azúcares (generalmente furanosas y piranosas), en las cuales, los hidrógenos de los oxhidrilos -- hemiacetálicos han sido reemplazados por grupos alcohilo o a--rilo y que por hidrólisis completa, producen alcoholes y uno o más monosacáridos. (3)

SAPONINAS.-

Las saponinas son una clase importante de glucósidos ampliamente distribuidos en plantas. Son poco solubles en agua y poseen la propiedad de ser detergentes ya que forman espuma jabonosa con el agua por disminuir la tensión superficial de la misma.

Son venenos eficaces para animales de sangre fría. Esta toxicidad está relacionada con la propiedad de disminuir la tensión superficial, de esta manera baja la solubilidad del oxígeno en el agua y los peces mueren por asfixia.

Por regla general, en animales de sangre caliente, no son tóxicas al administrarse por vía oral, debido a que no se absorben en el intestino, sin embargo, cuando se adminis---

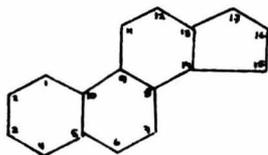
tran por vía intravenosa, hemolizan a los glóbulos rojos, ya que se combinan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos.

La hidrólisis de una saponina da como resultado uno o varios azúcares y un aglucón denominado sapogenina. Las sapogeninas son inactivas fisiológicamente o mucho menos activas que las saponinas de las que forman parte.

De acuerdo al aglucón, las saponinas se dividen en:

a) Saponinas neutras.-

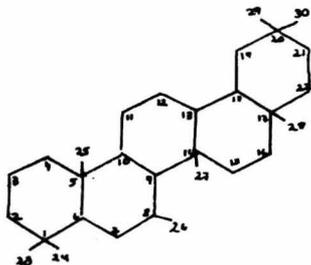
Sus aglucones derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno:



Son usadas en la fabricación de hormonas esteroides.

b) Saponinas ácidas.-

Sus aglucones derivan de un triterpeno:



Son usadas en la fabricación de ladrillo acústico, placas

y películas fotográficas, cerámica y preparados cosméticos. (5)

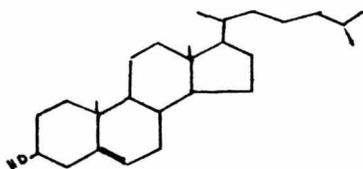
Las saponinas esteroides pueden diferenciarse de -- las triterpenoides por las siguientes características:

- a) Las saponinas esteroides provienen de monocotiledóneas, - con excepción de las que se extraen de la semilla de di-- gital, las triterpenoides provienen de dicotiledóneas.
- b) Las saponinas esteroides tienen carácter neutro, las ---- triterpenoides son ácidas.
- c) Las saponinas esteroides tienen puntos de fusión infe----- riores a 275° , las triterpenoides alrededor de 300° .
- d) Las sapogeninas esteroides que poseen un oxhidrilo beta - en C-3, precipitan con solución alcohólica de digitonina (6).

Las saponinas esteroides se encuentran generalmen-- te en forma de glucósidos de espirostanol, en los cuales los _ azúcares se encuentran unidos al C-3 del aglucón. En 1946, - Marker sugirió que las saponinas esteroidales naturales, sin-- tetizadas por plantas, pueden tener un azúcar en C-16 ó C-26, lo cual fué confirmado posteriormente por Tschesche y col., - quienes encontraron que la zarzaparrillosida, obtenida de - Radix zarzaparrillae, contiene 2 azúcares; uno en C-3 y otro _ en C-26. (7)

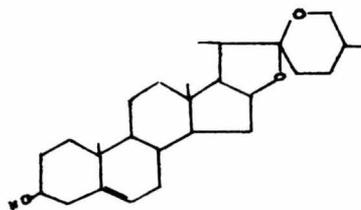
SAPOGENINAS ESTEROIDES.-(8)

Difieren de los esteroides por presentar una cadena espirocetálica, incrementándose de esta manera la polaridad - de la molécula.



ESTEROL:

Colesterol



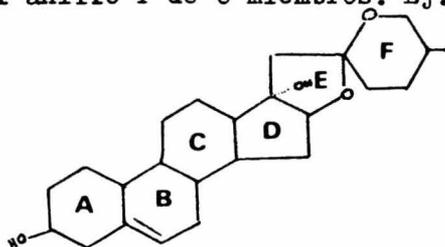
SAPOGENINA ESTEROIDE:

Diosgenina

Según la cadena lateral, las sapogeninas esteroides se dividen en:

1) Compuestos de cadena espirocetálica completa:

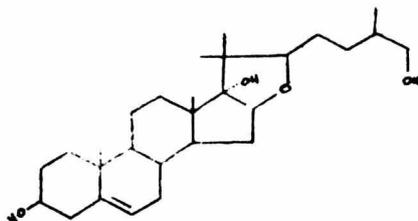
Son cetales internos de 16, 26 dihidroxi-cetoesteroides - con 27 átomos de carbono, contiene 2 anillos heterocíclicos con heteroátomo de oxígeno, el anillo E de 5 miembros y el anillo F de 6 miembros. Ej.



Pennogenina

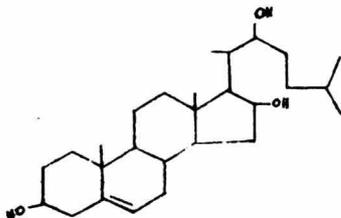
2) Compuestos de cadena lateral semiabierta:

Se sugiere el término furostano. En este grupo sólo se --
conoce una sapogenina natural, la Nologenina, que fué ---
aislada de un Trillium por Marker:



3) Compuestos de cadena lateral abierta:

O sea, derivados del colestano. Ej.

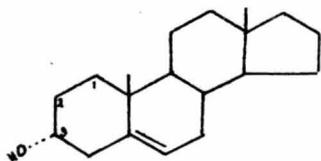
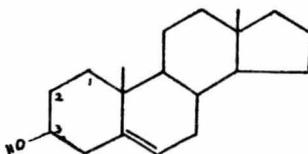


Calibagenina

ESTEREOQUIMICA.-

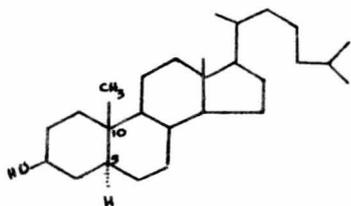
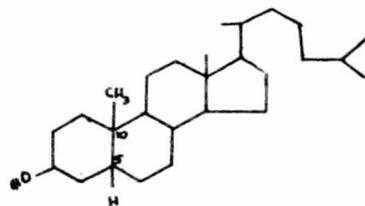
Existen 3 tipos de isomería en las sapogeninas es--
teroides:

- a) Cuando el grupo OH se proyecta hacia adelante del plano,
se dice que la unión es beta, si se proyecta hacia atrás,
se dice que la unión es alfa:

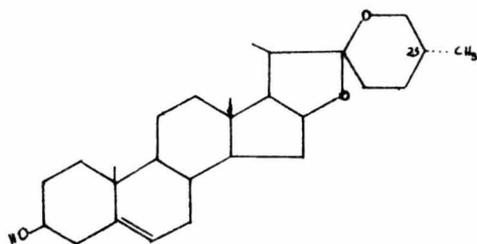
Unión alfaUnión beta

Los anillos A y B pueden tener unión cis ó normal, o bien trans ó alo. Cuando la unión es trans, el enlace que conecta la posición C-10 con el grupo metilo, se representa con trazo continuo y con línea punteada el enlace que conecta a el átomo de H con la posición C-5. De esta manera se indica que los substituyentes se hayan situados en lados opuestos de la molécula.

Cuando la unión es cis, ambas líneas se representan con - trazo continuo: (9)

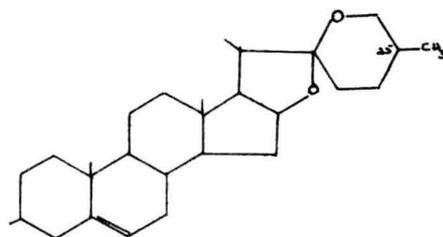
ColestanolA/B transCoprosterolA/B cis

- c) Cuando el grupo metilo del C-25 se encuentra en posición beta, da lugar a las neosapogeninas, si se encuentra en posición alfa, da lugar a las isosapogeninas:



Serie "iso"

Diosgenina



Serie "neo"

Yamogenina

TECNOLOGIA.-

La industria de hormonas esteroidales adquirió un nuevo aspecto con el descubrimiento de una sapogenina denominada Diosgenina y con el desarrollo de métodos eficaces para su degradación a intermediarios de C-21 y C-19.

La sapogenina fué aislada en 1936 de la raíz de una Dioscorea japonesa por Tsukamoto y colaboradores, que caracterizaron la substancia como un alcohol secundario de digitonina con fórmula: $C_{27}H_{42}O_3$. Otros trabajos japoneses llegaron a la conclusión de que la Diosgenina es un derivado Δ^5 colestano 3 ol. Los anillos A y B se encuentran en posición "cis" y la cadena lateral es "iso".

Existen otras sapogeninas que se encuentran en --- grandes cantidades, sin embargo, están completamente satura-- das y algunas de ellas contienen uno o más grupos oxhidrilo - adicionales.

En 1940, Marker desarrolló un proceso eficiente pa-- ra la degradación de la cadena lateral de la Diosgenina y su conversión a esteroides de C-21. En 1944, se trasladó a Mé-- xico a continuar sus actividades, debido a que encontró una - fuente abundante de Diosgenina en una especie de Dioscorea - conocida como "cabeza de negro"; en ese mismo año se produje-- ron algunos kilogramos de progesterona.

Posteriormente se comprobó que la Diosgenina es ma-- teria útil no sólo para la producción de progesterona sino -- también de hormonas andrógenas y estrógenas.

En 1949 se encontró otra Dioscorea, usada por los - indios como veneno de peces y denominada "barbasco". Esta --- Dioscorea contenía de 3 a 10 veces más Diosgenina que la "ca-- beza de negro".⁽¹⁰⁾

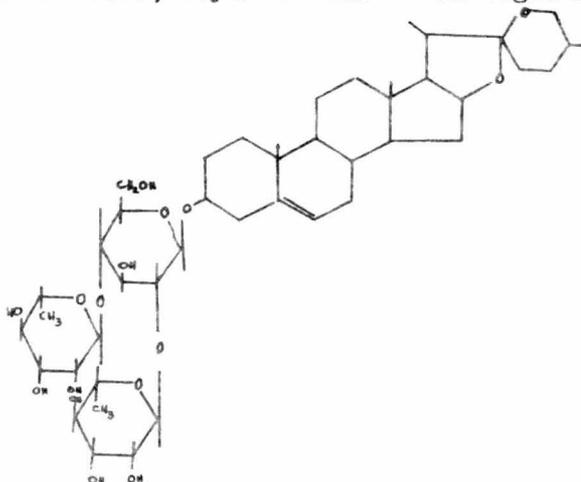
Las Dioscoreas usadas en México para la obtención - de Diosgenina son: D. mexicana, D. composita, D. floribunda y D. spiculiflora.⁽¹¹⁾ El rendimiento varía entre 1 y 5%, -- pero puede llegar hasta 8 y 10% de la raíz seca según la espe-- cie, la edad de la planta y la estación en que se cosechó.⁽¹²⁾

P A R T E T E O R I C A

La Dioscorea composita es una de las fuentes más --
ricas y solicitadas de sapogeninas esteroideas. La sapogenina
principal de estas plantas es la Diosgenina.

A pesar de que la Diosgenina sirve como punto de --
partida para la síntesis de hormonas esteroideas en México, --
se tiene muy poco conocimiento acerca de sus precursores y --
solamente, por extensión, se les considera semejantes a los --
glucósidos de Dioscorea tokoro, planta del mismo género que --
las usadas aquí para la obtención de Diosgenina, pero que e--
videntemente no tiene porqué ser igual a Dioscorea composita,
perteneciente a otra especie y con un habitat completamente --
diferente a la citada Dioscorea tokoro.

Los trabajos publicados a este respecto se deben a --
Kawasaki y colaboradores en Japón, quienes aislaron e identi-
ficaron la Dioscina, cuya fórmula es la siguiente:



El presente trabajo se enfocó al estudio de los --
glucósidos de Dioscorea composita.

El estudio de la planta Dioscorea composita, comúnmente denominada "barbasco", permitió el aislamiento de dos glucósidos diferentes, uno de ellos denominado glucósido A con p.f. 247°. La pequeña cantidad obtenida de esta sustancia, permitió únicamente la preparación de un acetato, con el fin de compararlo por cromatografía en placa fina con el acetato del monoglucósido auténtico, comprobándose de esta manera la presencia de monoglucósido de Diosgenina en el material original, probablemente como paso intermedio en la biogénesis de otros glucósidos.

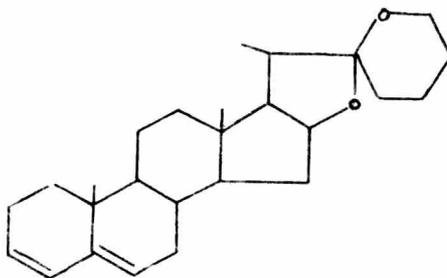
El segundo glucósido, denominado glucósido B, con p.f. 208°, muestra en IR una banda intensa a 3400 cm^{-1} , correspondiente a OH y dos bandas a 895 y 920 cm^{-1} , atribuibles a una sapogenina de la serie "iso", sin embargo, las intensidades relativas de estas 2 bandas no son tan diferentes como en el caso del monoglucósido o de la Diosgenina misma, sugiriendo la posibilidad de la presencia de Yamogenina, que pertenece a la serie "neo". El espectro de RMN no es muy significativo debido a la presencia de gran cantidad de grupos OH.

Análisis elemental. Calculado: %C: 62.515 %H: 8.894 %O: 28.462
Encontrado: %C: 62.06 %H: 8.68 %O: 29.17

Al preparar el acetato del glucósido B, se obtiene una substancia con p.f. 110° , que muestra en IR la banda característica del grupo acetilo a 1750 cm^{-1} , no se presenta la banda correspondiente a OH. El espectro de RMN en cloroformo presenta 4 señales de acetato entre 1.9 y 2.2 ppm. Debido a que una de las bandas integra para el triple que las otras 3, se pensó que eran 6 los acetatos existentes, esto se confirmó haciendo un espectro en benceno deuterado, en el cual se observan 5 señales de acetato entre 1.7 y 1.95 ppm., que parecen integrar para 18 protones, lo cual corresponde a 6 acetatos. - Esto nos hizo pensar que el glucósido B era un diglucósido.
Análisis elemental: Calculado: %C: 62.83 %H: 7.59 %O: 29.54 -
Encontrado: %C: 62.85 %H: 7.62

El precipitado de la hidrólisis del glucósido B, produce como aglucón una sapogenina que fué aislada e identificada espectrográficamente como Diosgenina por comparación con una muestra auténtica. Por cromatografía en placa fina se observa que la Diosgenina está acompañada por una substancia de R_f mayor, la cual fué aislada por cromatografía en placa preparativa e identificada como un dieno de Diosgenina, cuya absorbancia al UV es a 247 milimicras y que en IR presenta una banda a 1650 cm^{-1} , correspondiente a dobles ligaduras.

La posible fórmula de esta estructura es la siguiente:



En la fracción acuosa, obtenida del producto de la hidrólisis, se identificaron, por cromatografía en placa fina, 2 azúcares: glucosa y ramnosa. La valoración de azúcares utilizando 2 métodos diferentes, dió los siguientes resultados:

Método 1:

Valor promedio encontrado:

45.6 mg/100 mg de muestra

Calculado para un glucósido de Diosgenina con:

- a) Una mol de glucosa: 30.0 mg.
- b) Dos moles de glucosa: 47.6 mg.
- c) Tres moles de glucosa: 56.0 mg.

Método 2:

Valor promedio encontrado:

41.8 mg/100 mg de muestra

Calculado para un glucósido de Diosgenina con:

- a) Una mol de glucosa: 31.23 mg.
- b) Dos moles de glucosa: 48.50 mg.
- c) Tres moles de glucosa: 60.09 mg.

Con estos resultados y los datos espectroscópicos, se asignó a este compuesto una estructura tentativa de:

Diosgenina - glucosa - rhamnosa

o

Diosgenina - rhamnosa - glucosa

Sin embargo, debido a que el compuesto identificado _ como monoglucósido se encuentra también en forma natural en la planta, la estructura lógica es:

Diosgenina - glucosa - rhamnosa

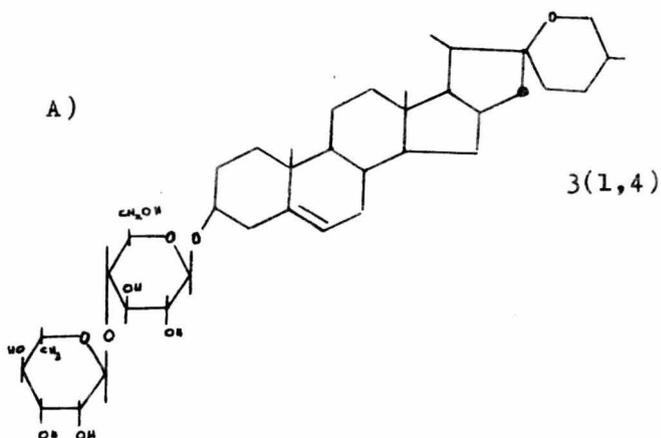
Esto se ha comprobado al efectuarse la hidrólisis -- parcial de este glucósido, que por cromatografía en placa fina da como resultado 3 substancias:

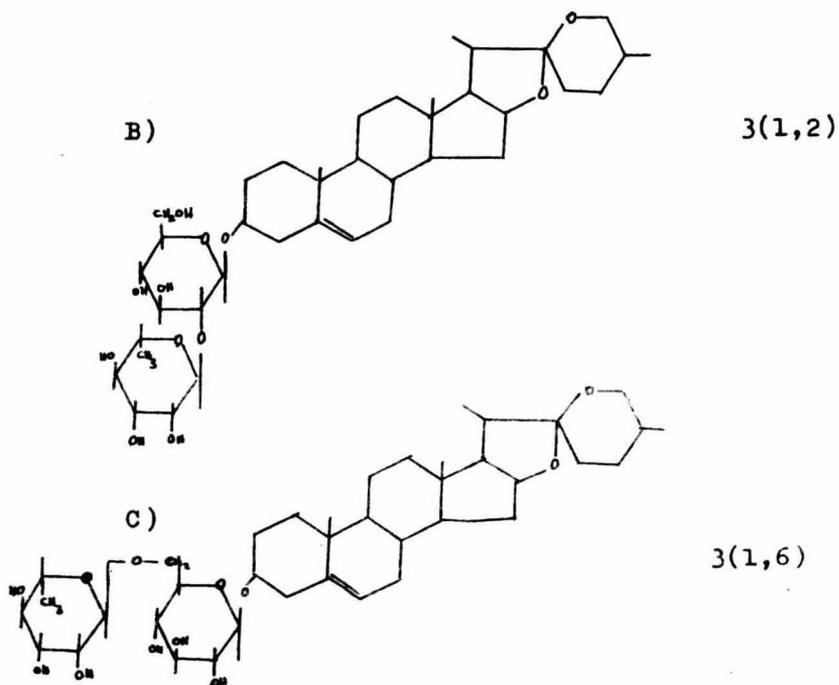
- a) Diosgenina
- b) monoglucósido de Diosgenina
- c) Sustancia original (glucósido B)

Estas tres sustancias fueron aisladas por cromatografía en columna y comparadas por sus puntos de fusión con muestras auténticas.

A pesar de que la Pennogenina se encuentra presente al efectuarse la hidrólisis directa del rizoma, la hidrólisis de los glucósidos, no muestra, en ningún caso, la presencia de esta sapogenina.

Por lo tanto, las posibilidades de estructura de este glucósido son las siguientes:





Se está realizando ya un trabajo enfocado a la determinación de la estructura terciaria de este glucósido mediante permetilación, hidrólisis y espectroscopía.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

- 1.- Los puntos de fusión se tomaron en un aparato Fisher - Jones. (las lecturas se dan en grados Centígrados)
- 2.- Los espectros de Infrarrojo se determinaron en un aparato Perkin - Elmer modelo 337.
- 3.- Las determinaciones de Análisis Elemental fueron realizadas por el Dr. A. Bernhardt de Mülheim - Ruhr (Alemania).
- 4.- Los espectros de RMN se determinaron en un espectrómetro analítico Varian A-60.
- 5.- El espectrofotómetro usado fué un EF. UV-Visible --- Perkin - Elmer modelo 202.

Desengrasado de la planta.-

Dos porciones de 1.5 Kg de rizoma de barbasco seco y molido (sin número de lote. Del 15 de Septiembre de 1972), se desengrasaron con 3 porciones de 3 l de hexano cada una.

Esto se hizo de la siguiente manera: Se añadieron 3 l de hexano, se calentó a ebullición durante media hora, - se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente agitando continuamente, se decantó, se le añadió otra porción de 3 l de hexano, se calentó a ebullición decantándose después de media hora y se repitió nuevamente esta operación.

Las porciones fueron denominadas: Fracción I y -- Fracción II respectivamente.

Extracción de los glucósidos.-

La extracción en cada una de las fracciones se hizo con 3 porciones de 2 l de metanol caliente. La primera porción se dejó en contacto con el disolvente durante 8 horas y las 2 restantes durante una hora. La filtración, después de cada adición se hizo en embudo caliente, ya que al enfriarse el metanol, los glucósidos cristalizan rápidamente.

Las 3 porciones con las cuales se hizo la extracción se unieron y se colocaron en el refrigerador, con el --

fin de que precipitara la mayor cantidad posible de glucósi-- dos. El extracto se decantó y el sólido se recrystalizó de - metanol caliente, obteniéndose así las fracciones: I (prove-- niente de el filtrado I) y II (proveniente de el filtrado II) Ver cuadro no. 1

Los filtrados se concentraron a la mitad de su vo-- lumen colocándose en el refrigerador, posteriormente se fil-- traron y así se obtuvieron las fracciones: III (proveniente - de el filtrado I) y IV (proveniente de el filtrado II), los - cuales se recrystalizaron de metanol caliente y las aguas ma-- dres de la cristalización fueron evaporadas.

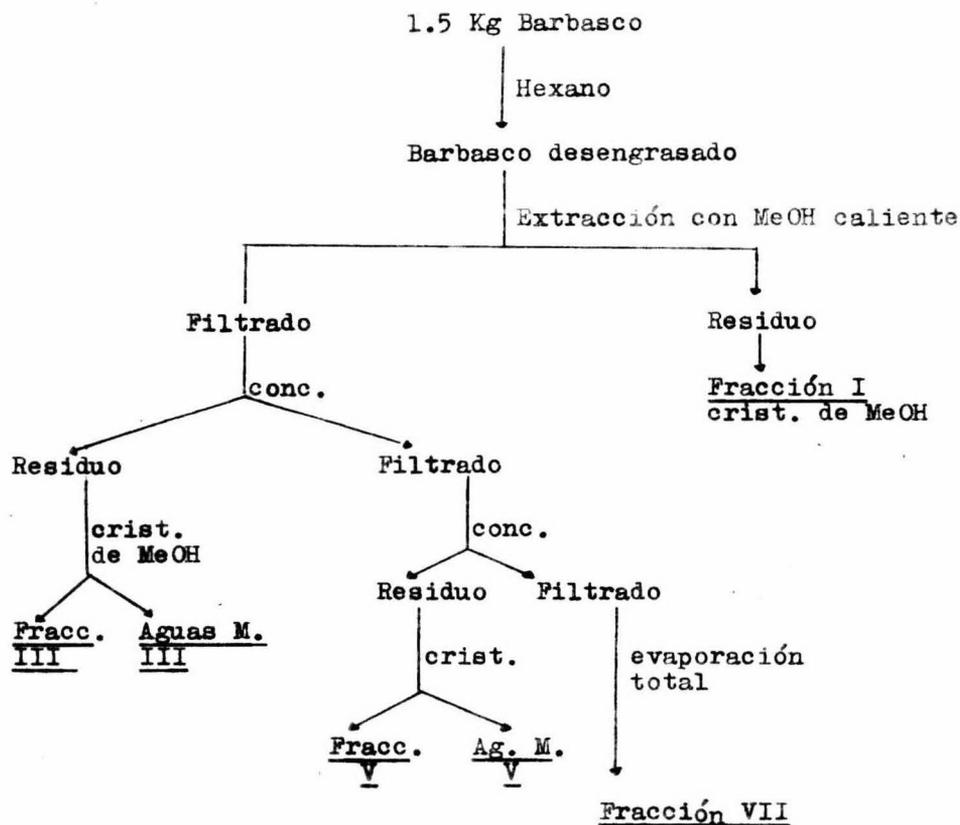
Se volvió a concentrar el filtrado a la mitad de su volumen, obteniéndose así las fracciones: V (proveniente de - el filtrado I) y VI (proveniente de el filtrado II), las cua-- les se recrystalizaron de metanol caliente y las aguas madres de la cristalización fueron evaporadas.

Los filtrados restantes se evaporaron a sequedad, - y así se obtuvieron las fracciones VII (proveniente de el -- filtrado I) y VIII (proveniente de el filtrado II). La eva-- poración fué difícil, ya que espumaban mucho y hubo de secar-- los a bomba de vacío.

RESULTADOS :

<u>Fracciones :</u>	<u>Peso :</u>	<u>Punto de Fusión :</u>	<u>Aspecto :</u>
I	19.0 g	210-215 ^o	Polvo blanco
II	10.7 g	205-212 ^o	Polvo pardo
III	21.1 g	195-202 ^o	Polvo pardo
IV	12.0 g	202-207 ^o	Polvo blanco
V	13.7 g	203-205 ^o	Polvo pardo
VI	8.4 g	205-208 ^o	Polvo pardo
Aguas Madres III	4.4 g	200-205 ^o	Polvo pardo
Aguas Madres IV	1.5 g	200-204 ^o	Polvo pardo
Aguas Madres V	4.3 g	198-203 ^o	Polvo pardo
Aguas Madres VI	2.4 g	200-205 ^o	Polvo pardo
VII	21.0 g		Chicle obscuro
VIII	19.9 g		Chicle obscuro

Peso total de los glucósidos obtenidos : 138.4 g

Cuadro no. 1:

Una vez obtenidos los productos secos, se hizo un estudio de solubilidad, observándose que la solubilidad de los productos I-VI es la misma.

Solubles en: metanol caliente, piridina y mezcla de cloroformo-metanol.

Insolubles en: agua, metanol frío, etanol, propanol, butanol, acetona, éter, cloroformo, benceno y tolueno.

Los productos VII y VIII son solubles en metanol -- caliente, poco solubles en metanol frío, cloroformo, acetona y mezcla de cloroformo-metanol e insolubles en agua, etanol, propanol, éter, benceno y tolueno.

Se prosiguió a hacer cromatografía en placa delgada de todas las fracciones. Los eluyentes utilizados fueron:

- 1) agua-butanol-benceno (60:20:20)
- 2) cloroformo-acetona-metanol (45:35:20)
- 3) cloroformo-isobutanol-metanol (60:20:20)
- 4) cloroformo-metanol (70:30)
- 5) cloroformo-metanol (60:40)
- 6) cloroformo-metanol (75:25)
- 7) cloroformo-butanol (60:40)
- 8) cloroformo-metanol-butanol (75:15:15)

Se encontró que el eluyente apropiado es el no. 8, ya que en los demás se observan únicamente 2 ó 3 manchas y en algunos casos, como en el (6), no se observa separación, en cambio, en el medio no. 8 se observan 5 manchas.

Los R_f obtenidos fueron:

R_f

Glucósido A: 79.1

	<u>R_f</u>
Glucósido B:	69.3
Glucósido C:	43.0
Glucósido D:	36.0
Glucósido E:	18.0

Se observó que los glucósidos C y D se encuentran - tan juntos, que algunas veces fué imposible observar la diferencia entre ambos cuando se corría la placa una vez, por lo tanto fué necesario correrlas 2 veces con el fin de comprobar que eran dos los glucósidos.

Se encontró que las fracciones I-VI contienen los - mismos glucósidos, sin embargo, en las fracciones VII y VIII, a pesar de que se obtienen R_f iguales, la coloración de las - manchas varía al revelarlas con ácido sulfúrico 5 N

En el caso de los glucósidos C y D, esta coloración que en las fracciones I - VI es rosa, en las fracciones VII y VIII es amarilla.

Aislamiento de los glucósidos.-

Las fracciones usadas para la separación en columna fueron: fracción I y fracción IV, ya que eran las que presentaban mejor aspecto. El adsorbente usado fué: Gel de Sílice

60; 0.063-0.22 mm (70-230 Mesh ASTM). La proporción usada -
fué: 1 g de muestra por 100 g de adsorbente. Como eluyente se
utilizó la mezcla no. 8.

De los 5 glucósidos de que constan las fracciones -
denominados: A, B, C, D y E respectivamente, fueron aislados -
el A y el B. Se aislaron 15 mg. del glucósido A y 180 mg. --
del glucósido B.

Se encontró que el glucósido B se encuentra en ma--
yor proporción, aproximadamente en un 55%, además de una mez-
cla de glucósidos C y D, que se encuentran en proporción de -
un 35% aproximadamente; el glucósido E en un 5% y el glucósi-
do A en un 5%. La recuperación que se obtuvo fué de un 90% -
aproximadamente.

Los glucósidos A y B son fáciles de separar, sin --
embargo, los glucósidos C, D y E, a pesar de diversos inten--
tos, no han podido ser separados por columna, quizás esto se -
deba a que los R_f de C y D son muy semejantes y en el caso de
E probablemente por encontrarse en una proporción mínima.

Las fracciones obtenidas de la cromatografía fue---
ron concentradas a rotavapor y posteriormente secadas a pre--
sión reducida (0.5 mm), con el fin de eliminar el butanol.

La mezcla de los glucósidos C y D, trató de sepa---
rarse utilizando los siguientes sistemas, sin obtenerse resul-

tados adecuados:

- a) hexano-acetato de etilo (50:50)
- b) metanol-acetona-agua (90:10:10)
- c) isopropanol-agua-ácido fórmico (70:24:6)

Determinación de la estructura de los glucósidos aislados:

Una vez aislados los glucósidos A y B, se prosiguió a hacer las siguientes determinaciones:

Glucósido A:

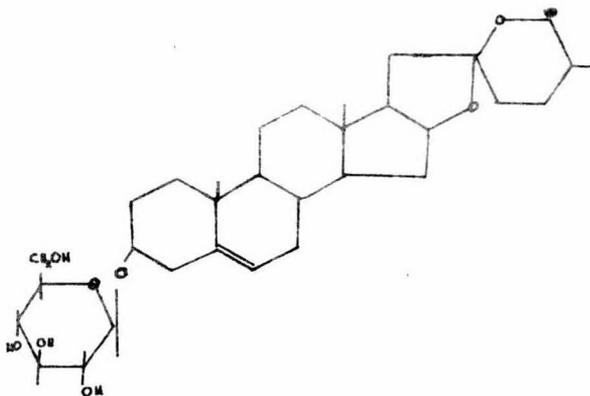
Aislado como un polvo de color pardo, con p.f. 247°
Por cromatografía en capa fina, utilizando gel de sílice G -- como adsorbente y como eluyente la mezcla no. 8, tiene una coloración al revelarse igual al monoglucósido de Diosgenina_ procedente de una Diosgenina comercial y que había sido aislado e identificado en un trabajo anterior.⁽¹³⁾ (experimentalmente se ha demostrado que puede establecerse la identidad entre dos sapogeninas esteroides por cromatografía en capa -- fina si tanto la sapogenina libre como su derivado, coinciden en R_f y en las características de las manchas).

Acetilación del Glucósido A:

Se fundieron 75 mg de acetato de sodio, se añadieron 1.5 ml de anhídrido acético y posteriormente se añadieron 15 mg de glucósido. Se hirvió a reflujo durante 6 horas. El producto de la reacción se vertió en agua con hielo, se lavó con agua y se secó. La recristalización se hizo de metanol.

Comparación con el acetato de monoglucósido de Diosgenina auténtico:

Una vez obtenido el producto acetilado, se corrió una placa utilizando como eluyente: cloroformo-metanol (80:20) observándose que ambos R_f coincidían. De esta manera, se pudo concluir que el producto A era el monoglucósido de Diosgenina, cuya fórmula es la siguiente:



Glucósido B:

Se aislaron inicialmente 180 mg de un polvo cristallino blanco, soluble en metanol, piridina y mezcla de cloroformo-metanol e insoluble en los demás disolventes. Este producto presenta las siguientes características:

p.f. : 210°

$[\alpha]_D^{20}$: 81°

El espectro de IR (espectro no. I), muestra banda - intensa de OH a 3400 cm^{-1} y una banda de poca intensidad correspondiente a un doble enlace a 1650 cm^{-1} ; presenta, además 2 bandas a 900 y 920 cm^{-1} , correspondientes a una sapogenina de la serie "iso".

El espectro de RMN no es muy significativo por la - presencia de gran cantidad de oxhidrilos, sólo es posible observar el perfil característico de una sapogenina esteroide.

Análisis elemental para el glucósido libre (con 2 - moléculas de metanol de cristalización):

Calculado para: %C: 62.515 %H: 8.894 %O: 28.462

Encontrado: %C: 62.06 %H: 8.68 %O: 29.17

Acetilación del glucósido B:

Se fundieron 150 mg de acetato de sodio, se añadieron 3 ml de anhídrido acético y posteriormente 40 mg de glucósido, se hirvió a reflujo durante 6 horas. El producto de la reacción se virtió en agua con hielo, se lavó con agua y se recristalizó de metanol.

Se obtuvieron 35 mg de polvo blanco con p.f. 110° . Este producto es soluble en cloroformo, benceno y otros disolventes orgánicos.

El espectro de IR (espectro no. 2), presenta una banda a 1750 cm^{-1} , correspondiente a acetato y una banda a 1650 cm^{-1} , correspondiente a dobles ligaduras. No se presenta banda de OH.

El espectro de RMN en cloroformo (espectro no. 3), presenta 4 señales de acetato entre 1.9 y 2.2 ppm. Una de estas bandas integra para el triple que las otras 3, por lo que se podría pensar en la presencia de 6 acetatos.

Para comprobar lo anterior, se hizo otro espectro en benceno deuterado (espectro no. 4), en el cual se pueden observar 5 señales de acetato entre 1.7 y 1.95 ppm. y que parecen integrar para 18 protones, lo cual corresponde a 6 acetatos, tomando como punto de referencia la integración de uno de los metilos angulares del aglucón.

Análisis elemental para el glucósido acetilado:

Calculado para: %C: 62.83 %H: 7.59 %O: 29.54

Encontrado: %C: 62.85 %H: 7.62

Hidrólisis ácida: (total)

15 mg de glucósido en 1 ml de etanol se dejaron - hervir en tubo con 0.1 ml de HCl concentrado durante 3 horas.

El producto de hidrólisis muestra, por cromatografía en placa fina, una mancha (a) en gran proporción que corresponde a Diosgenina y otra (b) correspondiente al dieno - obtenido de las condiciones de reacción.

Para demostrar la identidad de ambas sustancias, - estas fueron aisladas por cromatografía en placa preparativa. Producto (a): Fue identificado espectrográficamente por comparación con una muestra auténtica como Diosgenina. (espectro no. 5)

Producto (b): Fue identificado espectrográficamente como un dieno de Diosgenina, cuya absorbancia al UV es a 247 m μ (espectro no. 6) y en IR presenta banda de C=C a 1650 cm⁻¹ (espectro no. 7)

En las aguas de hidrólisis se identificaron por --- cromatografía en placa fina por comparación, dos azúcares: -

glucosa y rhammosa. El adsorbente usado fué Kieselgur G, --- preparado con ácido bórico 0.01 N. Como eluyente se utilizó: cloroformo-acetona-agua (65:35:5)

Valoración de los azúcares:

Los azúcares presentes se valoraron por dos métodos

a) Oxidación por dicromato de potasio y valoración del dicromato residual con tiosulfato de sodio:

El producto de la hidrólisis fué filtrado y el líquido filtrado se aforó con agua a 10 ml.

Se tomó una alícuota de 1 ml, se añadieron 25 ml de dicromato de potasio 0.01 N y 5 ml de ácido sulfúrico al 7%, se calentó a baño maría durante una hora. Cuando la mezcla se enfrió, se añadieron 20 ml de agua y 5 ml de yoduro de potasio al 5%; después de exactamente 20 minutos, se tituló el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.01 N.

Al mismo tiempo, fué preparada una curva estandar de glucosa con valores comprendidos entre 1 y 3 mg.

De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados:

Valor promedio encontrado:

45.6 mg/100 mg de muestra

Calculado para un glucósido de Diosgenina con:

- a) Una mol de glucosa: 30.0 mg.
- b) Dos moles de glucosa: 47.6 mg.
- c) Tres moles de glucosa: 56.0 mg.

El resultado de este análisis concuerda con el de un glucósido con 2 restos de azúcar.

b) Variante del método de Nelson Somogy:

Se hidrolizaron 15 mg de glucósido puro mediante la técnica antes mencionada. De las aguas de hidrólisis se tomó una alícuota de 0.1 ml, se aforó a 1 ml con agua, se le añadieron 2 ml de "reactivo de cobre" (sulfato cúprico - tartrato doble de sodio y potasio), se calentó a baño maría durante 15 minutos, se enfrió en agua a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de "reactivo de Nelson" (arsenomolibdato de amonio - arseniato de sodio), se agitó y después de 2 minutos se aforó con agua a 10 ml. Se leyó a 430 milimicras.

Los resultados se interpolaron en una curva estandar con valores comprendidos entre 10 y 100 mg, obteniéndose así los siguientes resultados:

Valor promedio encontrado:

41.8 mg/100 mg de muestra

Calculado para un glucósido de Diosgenina con:

- a) Una mol de glucosa: 31.23 mg.
- b) Dos moles de glucosa: 48.50 mg.
- c) Tres moles de glucosa: 60.09 mg.

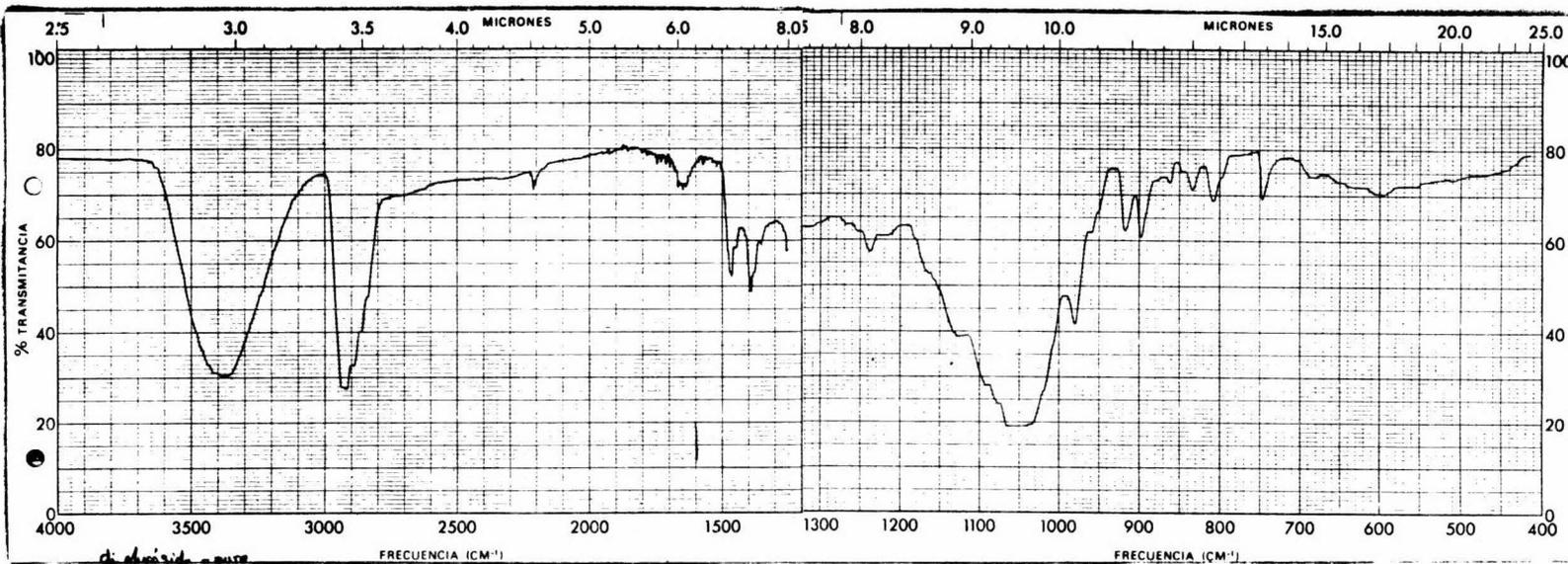
Hidrólisis parcial:

130 mg de glucósido se pusieron a hervir a reflujo con ácido sulfúrico al 1% durante 45 minutos.

El producto de hidrólisis muestra, por cromatografía en placa fina utilizando como eluyente: tolueno-acetato de etilo (80:20), 3 sustancias que corresponden a:

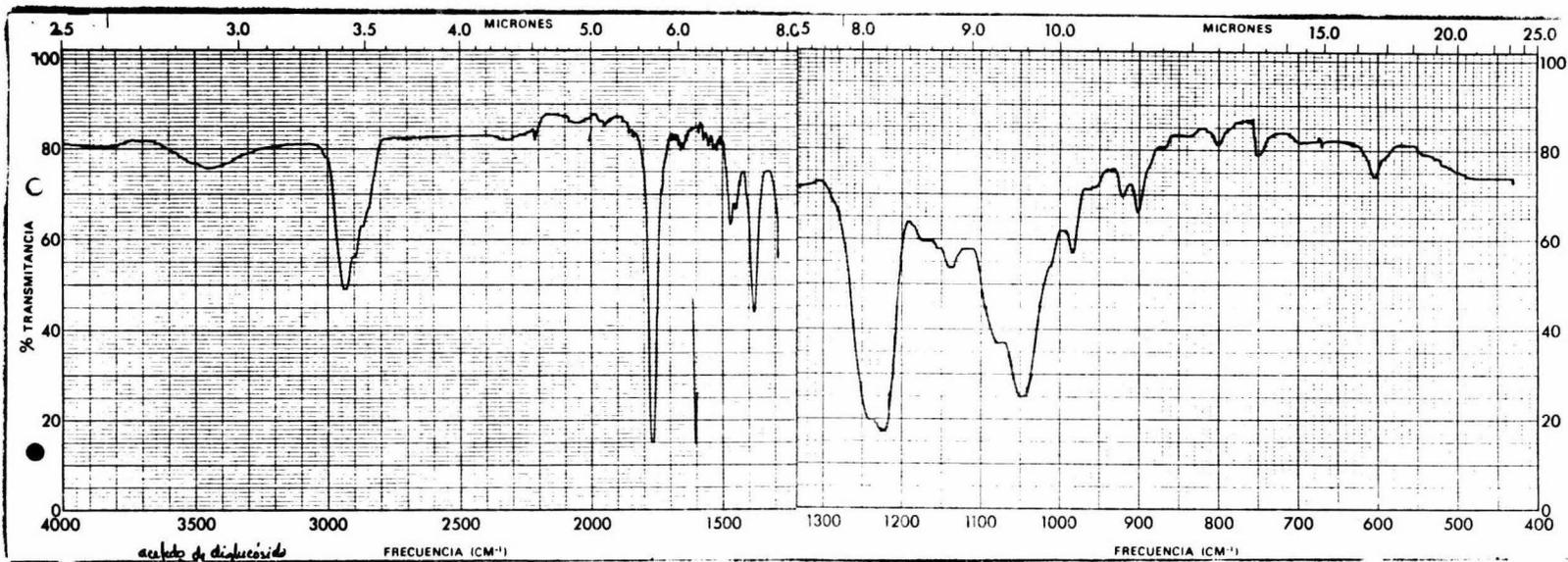
- a) Diosgenina
- b) monoglucósido de Diosgenina
- c) Sustancia original (glucósido B)

Estas 3 sustancias fueron aisladas por cromatografía en columna y comparadas por sus puntos de fusión con muestras auténticas, comprobándose de esta manera, que la glucosa está directamente unida a la Diosgenina.

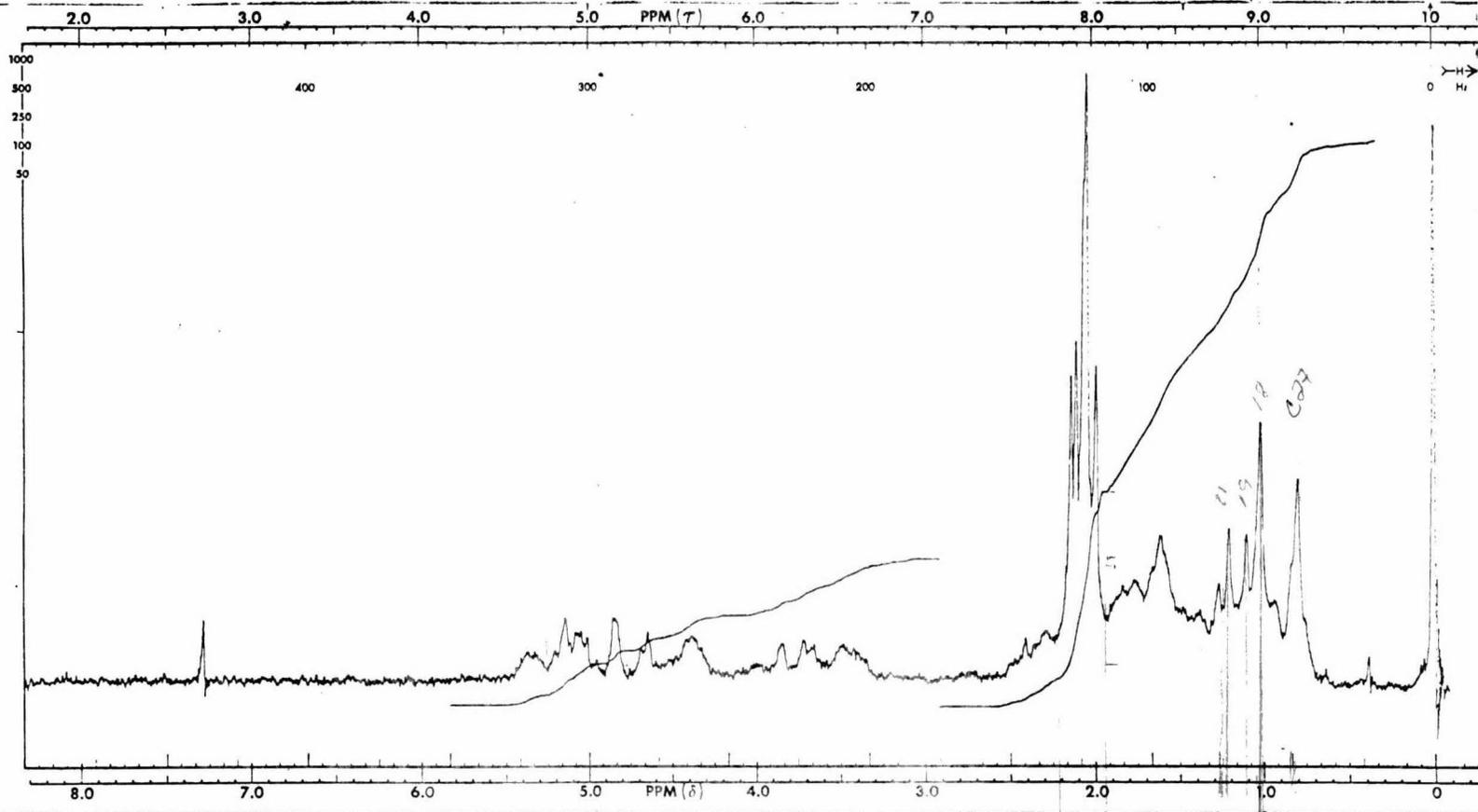


dióxido de nitrógeno

Espectro Nr. 1

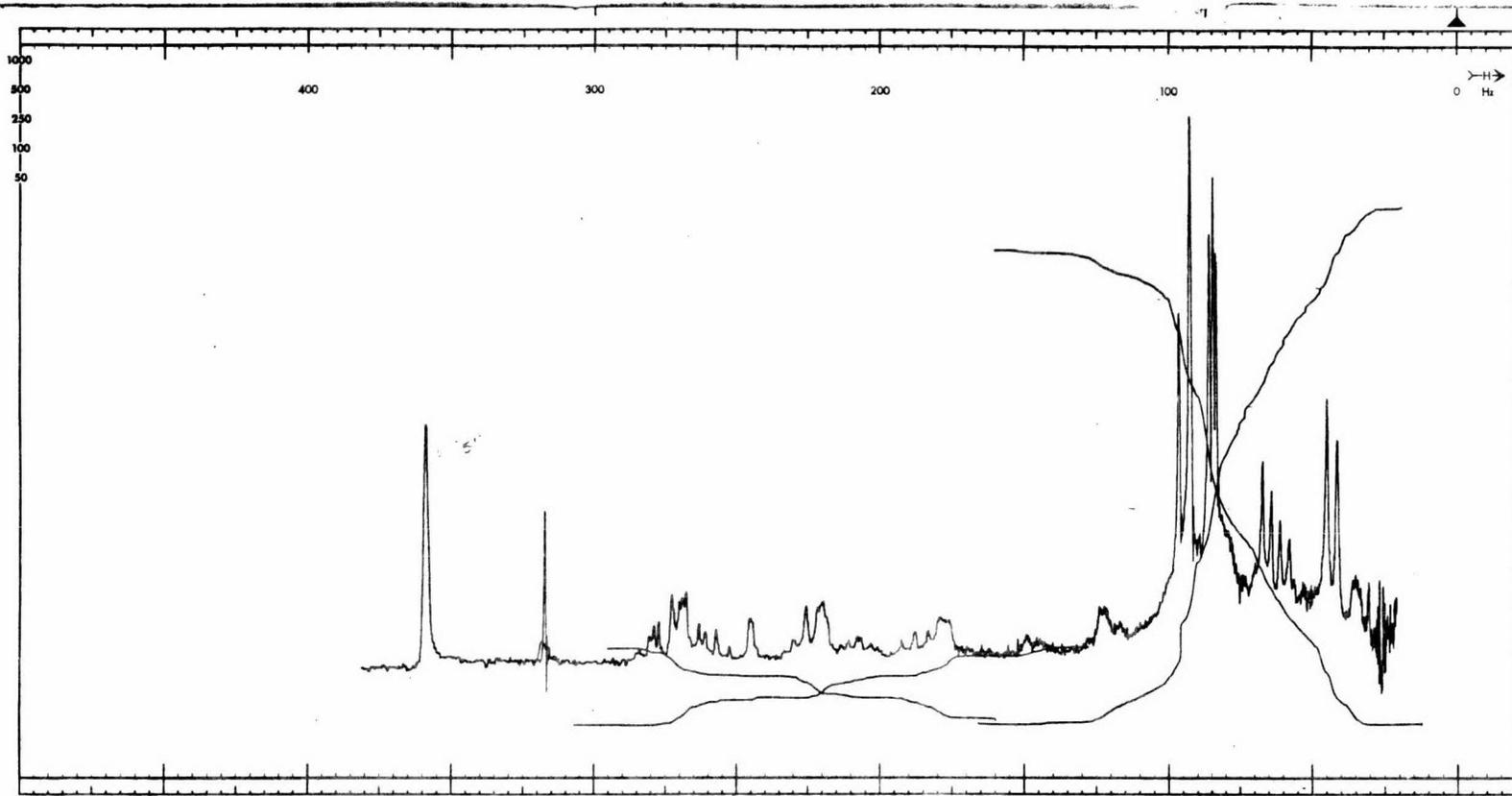


Espectro Nr II

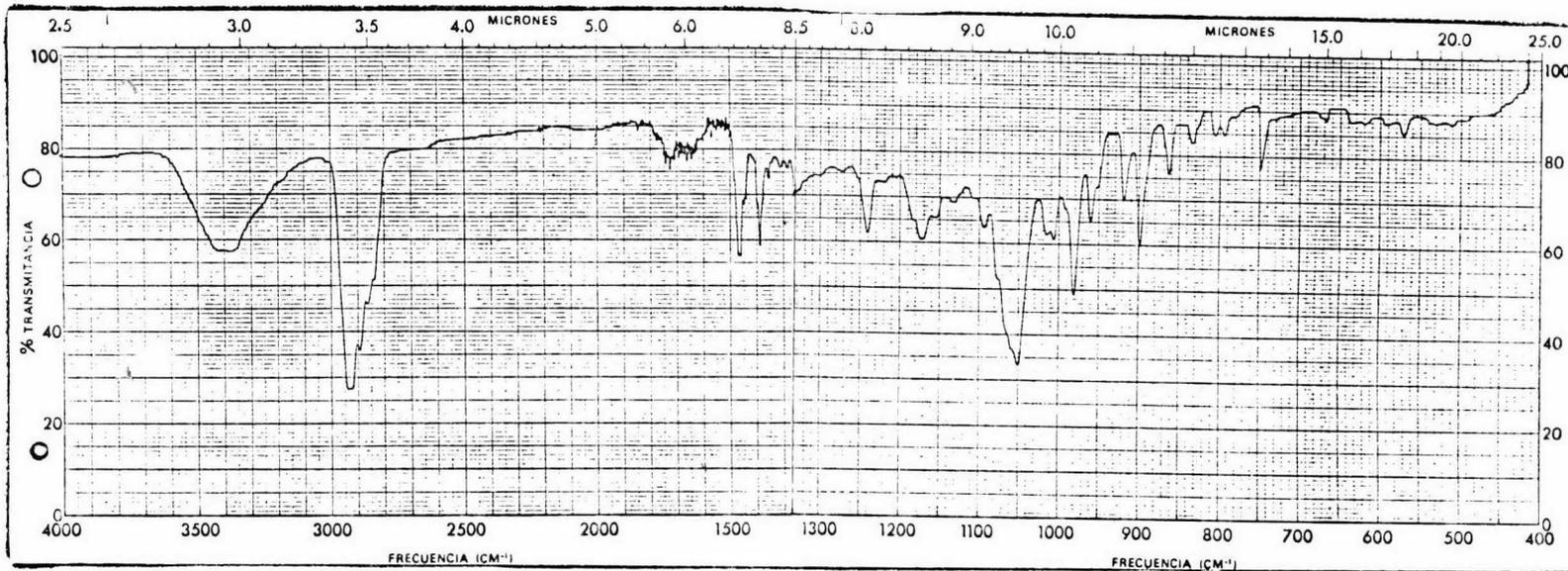


Espectro Nr III

1.27
1.1
1.03
1.9

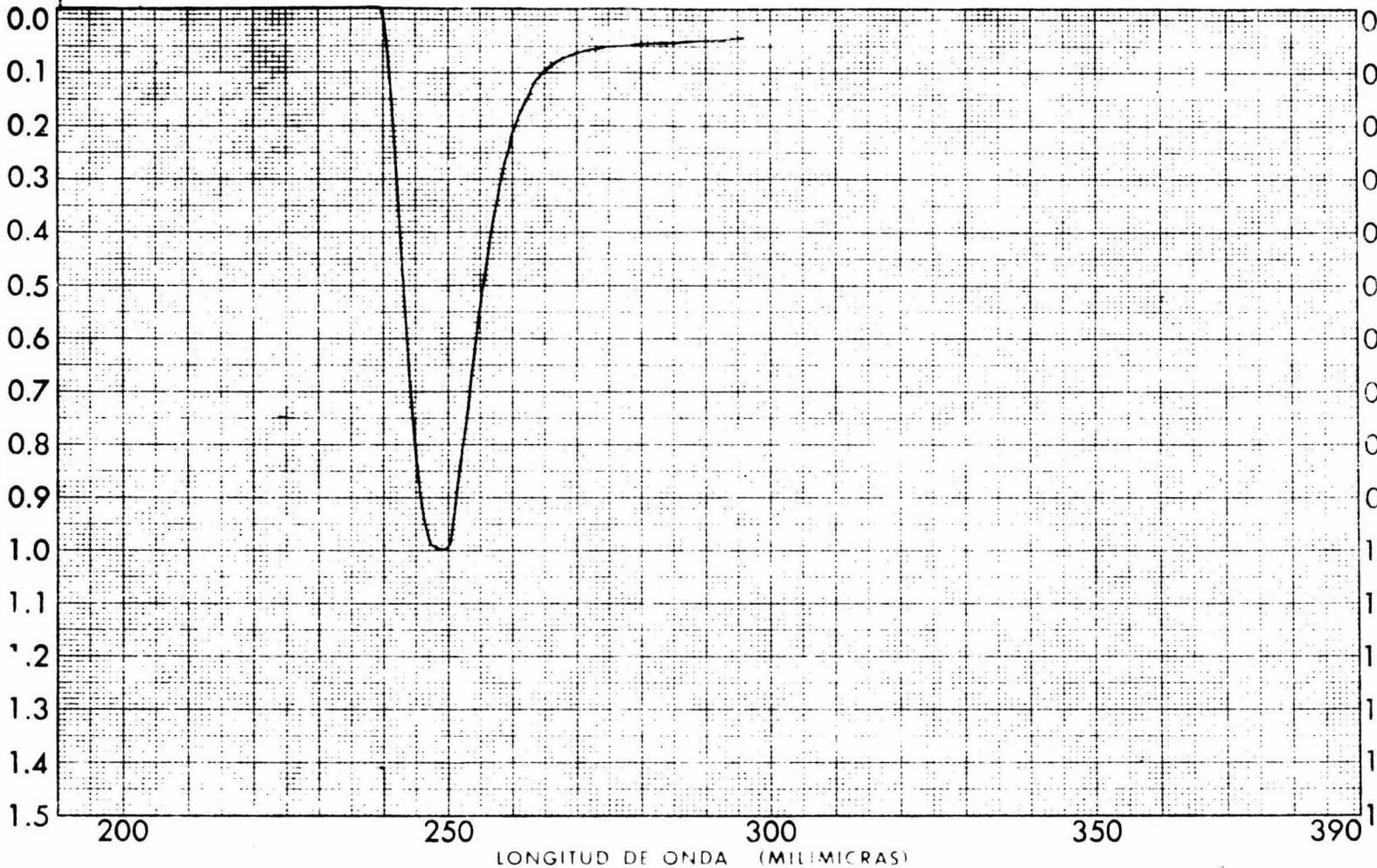


ESPECTRO NR 4



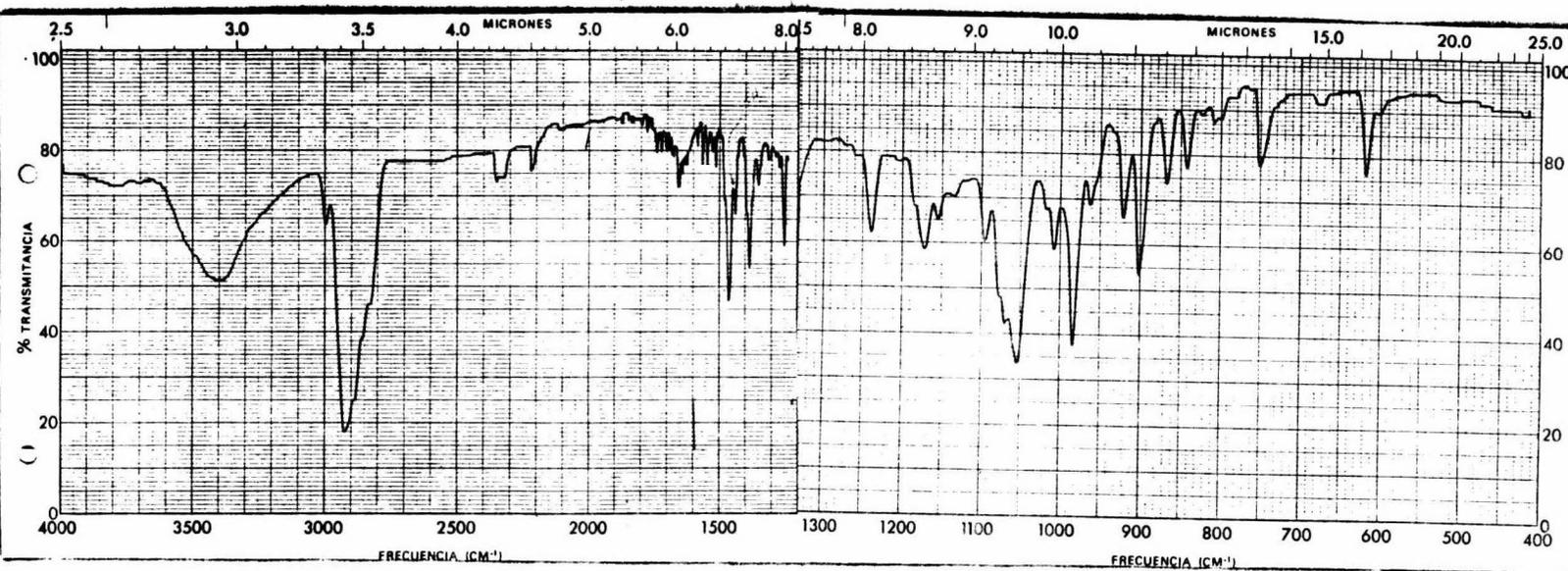
Espectro Nr. 5

ABSORBANCIA



LONGITUD DE ONDA (MILIMICRAS)

Espectro Nr. 6



Espectro Nr. 7

CONCLUSIONES

Del extracto metanólico de Dioscorea composita se aislaron por cromatografía en columna, dos glucósidos.

Uno de ellos fué identificado fácilmente como monoglucósido de Diosgenina.

El segundo glucósido fué caracterizado por acetilación, hidrólisis, espectroscopía de absorción infrarroja, resonancia magnética nuclear y análisis elemental, como un diglucósido de Diosgenina.

Dicha saponina tiene la siguiente estructura:

Diosgenina - glucosa - rhamosa

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Primer Simposio Internacional sobre Dioscoreas, SAG., México, 1970 .
- 2.- E. Matuda, Anal. del Inst. de Biología, 24, 320-322 -- 1953
- 3.- W. Pigman, "The Carbohydrates", Academic Press, N.Y. - 1957
- 4.- M. Pinkas, "Produits et Problemes Pharmaceutiques", -- Masson, Paris, 1970.
- 5.- K. Macek, "Pharmaceutical applications of thin layer - chromatography", Elsevier, 1964
- 6.- R.J. Mellroy, "The plant glycosides", Edward Arnold, - London, 1951.
- 7.- R.E. Marker, J. Am. Chem. Soc. 62, 2543 (1940)
- 8.- L. Fieser, "Steroids", Reinhold Publ. Corp. N.Y., 1949
- 9.- L. Fieser, "Natural Products related to Phenantrene", Reinhold Publ. Corp., N.Y., 1949
- 10.- L. Fieser, "Química Orgánica", Grijalbo, México, 1968.
- 11.- T. Tsukamoto, Pharm. Bull., 4, 35 (1956)
- 12.- R.E. Marker, J. Am. Chem. Soc., 62, 5542 (1940)
- 13.- Tesis.- Castillo Bocanegra Rafael, "Aislamiento e identificación de un acompañante de Diosgenina", 1970
- 14.- T. Tsukamoto, J. Am. Chem. Soc., 61, 3592 (1939)

- 15.- M.O. Crow, Anal. Chem., 13, 845 (1941)
- 16.- R.E. Marker, J. Am. Chem. Soc., 61, 3592 (1939)
- 17.- A. Heftmann, Lloydia, 30, 211-213, (1967)
- 18.- E. Stahl, "Thin Layer Chromatography", Academic -----
Press, N.Y. 1965
- 19.- F. Giral, A.C. Rejahn, "Productos Químicos y Farma-----
céuticos", Atlante, México 1946.
- 20.- W. Grove, J. Am. Pharm. Assoc., 27, 457 (1938)
- 21.- Z. Dische, "Methods of Biochemical Analysis", V. II -
Interscience, N.Y. 1967.
- 22.- N. Jones, J. Am. Chem. Soc., 75, 258-166 (1953)