



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento y transformación de iridoides
glicosídicos de *Lamourouxia dasyantha*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A:

Norma Mónica López Villa.

México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profa. Rocío Pozas Horcasitas.

Vocal: Prof. Arturo Navarro Ocaña.

Secretario: Prof. Manuel Jiménez Estrada.

1er suplente: Prof. José Gustavo Ávila Zárraga.

2do suplente: Prof. Blas Flores Pérez.

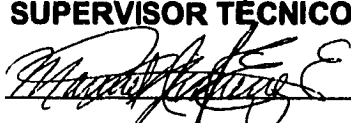
Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



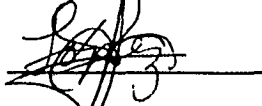
M. en C. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TÉCNICO



Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

SUSTENTANTE



NORMA MÓNICA LÓPEZ VILLA

AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá Esther por su ejemplo de rectitud ante la vida. Con todo mi amor para usted Señora bonita.

A mis padres (Marcos y Norma) y hermanos (Antonio y Teté) porque pacientemente han compartido conmigo la ilusión por llegar a este momento.

A mis tíos Malú y Pale por aceptarme en su casa como una hija más.

A toda mi familia por hacerme tan presente su cariño.



A Raúl Ramón Del Río porque su amor, respeto y cercanía me siguen motivando a dar mi mejor esfuerzo.



A mis amigos todos porque su compañía me ha hecho más comfortable la estancia en esta maravillosa Facultad.



Especialmente en memoria de Salvador Domínguez Sáyago porque su cariño y alegría me siguen fortaleciendo el alma.



AGRADECIMIENTOS

A las maestras Gisela Hernández Millán y Pilar Montagut Bosque porque en el momento justo confiaron en mí y me ayudaron a formarme en la Docencia guiándome con su ejemplo.

A mis alumnos de los cursos de Laboratorio de Química General por su comprensión, paciencia y afecto, por contagiarme sus ganas de aprender y por no dejar que se extinga en mí la emoción que da el dejarse seducir por la Química.



A Arturo Navarro y al Dr. Manuel Jiménez por su apoyo incondicional en la realización de esta tesis, por todo lo que les aprendí y que no quedó escrito en ella.



Al personal del Instituto de Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.



"No te he dado ni rostro, ni lugar alguno que sea propiamente tuyo, ni tampoco ningún don que te sea particular, ¡oh Adán!, con el fin de que tu rostro, tu lugar y tus dones seas tú quien los desee, los conquiste y de ese modo los poseas por ti mismo.

... Te coloqué en medio del mundo para que pudieras contemplar mejor lo que el mundo contiene. No te he hecho ni celeste, ni terrestre, ni mortal, ni inmortal, a fin de que tú mismo, libremente, a la manera de un buen pintor o de un hábil escultor, remates tu propia forma."

"- Hermano Zenón- dijo el capitán-, os encuentro flaco, extenuado, de mal humor y ataviado con un blusón que ni mi criado querría ponerse. ¿Vale la pena afanarse durante veinte años para llegar a la duda, que crece por sí misma en todas las cabezas inteligentes?

- Sin discusión - contestó Zenón-. Vuestras dudas y vuestra fe son como pompas de jabón en la superficie, pero la verdad que se deposita en nosotros como la sal en la retorta, cuando hacemos una destilación arriesgada, se halla de este lado de la explicación y de la forma, demasiado caliente o demasiado fría para la boca humana, demasiado sutil para la letra escrita y más valiosa que ella."

Opus nigrum.
Marguerite Yourcenar.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	
Iridoides glicosídicos	6
Reacciones generales de los iridoides	7
Biosíntesis de iridoides	16
Actividad biológica	18
Metabolismo	22
Iridoides en Química Orgánica Preparativa	23
Métodos de hidrólisis	24
Alcaloides monoterpeno-piridínicos	26
Obtención de alcaloides monoterpeno-piridínicos	29
OBJETIVOS	33
PARTE EXPERIMENTAL	34
Estructuras de los compuestos obtenidos	40
Espectros	42
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
CONCLUSIONES	70
<i>Lamourouxia dasyantha</i> (esquema)	71
ANEXOS	72
BIBLIOGRAFÍA	78

INTRODUCCION.

Uno de los atractivos que tuvo el desarrollar éste tema, fue el aprovechar los compuestos químicos sintetizados por la Naturaleza como una de las opciones dentro de lo que se puede llamar una Química "más limpia". Es posible evitarse algunos pasos de síntesis para llegar a un compuesto que tenga una funcionalización y estereoquímica determinadas (a veces difíciles de conseguir en el laboratorio), cuando se le encuentra como producto natural.

El objetivo de este trabajo fue aislar los iridoides glicosídicos de la especie vegetal *Lamourouxia dasyantha*, cuantificarlos y utilizarlos como intermediarios quirales en la síntesis de un alcaloide monoterpenicopiridínico.

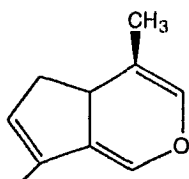
La familia *Scrophulariaceae* es taxonómicamente muy compleja debido a la gran semejanza que existe entre la mayoría de sus géneros y también por la cantidad de especies y subespecies que hay dentro de algunos géneros. Esta familia es extremadamente diversa y está bien representada en México, ya que de los 200 géneros que se mencionan a nivel mundial, aproximadamente 65 (el 32.5 %) se encuentran en nuestro país.

La familia de las Scrophulariaceas se divide en tres subfamilias, en una de ellas, la de las Rinantoideas, se incluye el género de las Lamourouxias y entre sus especies está la *dasyantha*.

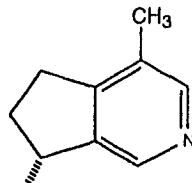
Las especies del género *Lamourouxia* se encuentran distribuidas en Chiapas, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas¹.

En años recientes, se ha aislado un importante número de productos naturales, que pertenecen al grupo de compuestos que contienen un esqueleto ciclopentapiranoide. Una buena cantidad de éstos han demostrado tener actividad biológica de interés industrial (por ejemplo, insecticidas, perfumes) o farmacológico (prostaglandinas). Esto estimuló el interés por prepararlos sintéticamente y por encontrar los métodos para funcionalizarlos, modificar o conservar su quiralidad².

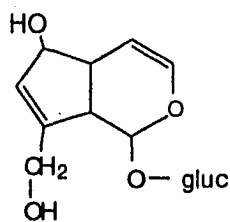
Compuestos con actividad biológica que presentan un esqueleto ciclopentapiranoide.



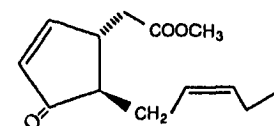
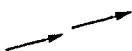
Plagiolactona



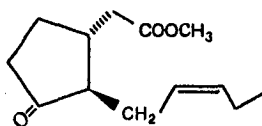
Actinidina



Aucubina



Dehidrojasmonato de metilo



Jasmonato de metilo

Los iridoides tienen un arreglo espacial definido (estereoquímica fija), lo cual los hace potencialmente valiosos ya que se conocen muchos ejemplos donde un estereoisómero es activo, pero no así su enantiómero que es inactivo y también donde dos enantiómeros de una molécula producen efectos diferentes en un organismo vivo, diferencias que se explican porque se necesita de cierta estereoespecificidad para la interacción correcta entre sustrato y receptor; por tal razón, la búsqueda de métodos novedosos, eficientes y, sobre todo, generales para la síntesis de compuestos orgánicos enantioméricamente puros se está intensificando ^{3,4}.

Quizás el recuerdo más doloroso de la importancia de la estereoquímica, haya sido la historia de la Talidomida: en los años 60's

se vendió la droga como la mezcla enantiomérica de sus formas (-) y (+); la primera es un tranquilizante poderoso y la segunda es capaz de frenar el desarrollo fetal ocasionando daños severos.

En la actualidad, una de las facetas de la Química Orgánica que muestra gran actividad y crecimiento es la síntesis asimétrica, que se refiere a la preparación de compuestos enantioméricamente puros.

El arte de la síntesis asimétrica consiste en poder controlar las reacciones de tal forma que se obtenga como producto único o mayoritario a uno de los enantiómeros o diastereoisómeros ³.

Se emplean tres técnicas básicas para cuando se desea introducir un centro asimétrico en una molécula: usar un reactivo que tenga un centro quiral auxiliar, esto es, un grupo cercano al sitio de reacción que controle la estereoquímica y que se remueva fácilmente después; usar un catalizador homoquiral que puede ser una enzima o un producto sintético, y por último, usar una molécula homoquiral, como bloque de construcción, que generalmente se obtiene de una fuente natural ³.

Una estrategia que ha dado muy buenos resultados en la obtención de compuestos enantioméricamente puros, es la que utiliza productos naturales ópticamente puros como materia prima. Éstos materiales, denominados "chiral pool" (literalmente "alberca quiral"), se pueden obtener directamente de plantas o insectos ^{5,9}.

El esqueleto básico de los glicósidos iridoidales, formado por un anillo de ciclopentapirano, uno o varios grupos funcionales y una quiralidad determinada, es muy útil como "bloque de construcción quiral" en la síntesis de compuestos ciclopentapiranoideos biológicamente activos.

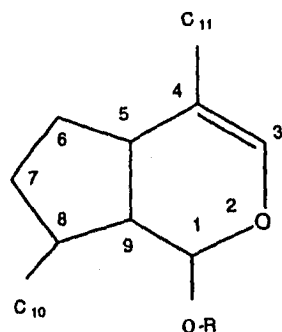
ANTECEDENTES

Hasta 1986 se habían aislado más de 300 iridoides glucosídicos⁶ y ya para 1993 se conocían más de 1000 como respuesta al gran interés que hay por este tipo de compuestos que sirven de intermediarios en diversas síntesis, ya que presentan un arreglo espacial definido y gracias a las nuevas técnicas de separación que permiten obtener cantidades suficientes para los ensayos sintéticos y pruebas de bioactividad.

Los iridoides representan un grupo numeroso y extenso de monoterpenoides, con un esqueleto básicamente formado por un anillo de ciclopentano y uno de pirano, que se encuentran como constituyentes naturales de un gran número de plantas, generalmente como glucósidos (es decir, unidos a una molécula de glucosa).

Aunque el nombre iridoide es ahora generalmente aceptado, también se les conoce por "pseudo-indikans", debido a la coloración azul que presentan algunos al ser hidrolizados en medios ácidos, o también se les conoce como glucósidos de aucubina⁷.

Fig. 1 Estructura base de un iridoide.



Iridoide glicosídico, cuando R=azúcar

Aglicón iridoideal, cuando R=H

Los iridoides glicosídicos* se caracterizan por tener una molécula de azúcar unida mediante un enlace acetálico al hidroxilo hemiacetálico en C1. (ver fig. 1) Sin embargo, hay iridoides que tienen una o más unidades adicionales de azúcar que pueden estar enlazadas a la molécula de azúcar que está en C1 o en alguno de los grupos -OH de la parte ciclopentanoide.

Los sustituyentes más comunes en el esqueleto iridoidal son los hidroxilos que están generalmente libres, o frecuentemente esterificados con un acetilo o con alguno de sus homólogos alifáticos, o con un residuo acilo aromático, como el cinnamoilo o el benzoilo (a veces sustituido también). Ver cuadro siguiente.

* Nos referiremos a iridoides glicosídicos cuando la(s) unidad(es) de azúcar unida(s) al iridoide sea(n) glucosa o cualquier otra.

ATOMO DE CARBONO	SUSTITUYENTES
# 1	O-β-D-glucosa
# 4	CO ₂ CH ₃ , COOH, CH ₃ , CH ₂ OH, CHO
# 5	OH, O-β-D-glucosa
# 6	OH, O-anillo lactónico
# 7	OH, =O
# 8	CH ₃ , OH (OAc, OR), CH ₂ OH(CH ₂ OAc, CH ₂ OR), =CH ₂

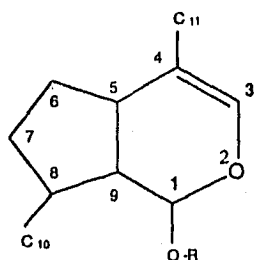
El anillo iridoidal de seis miembros siempre presenta un doble enlace en la posición 3-4, resultado de la propia biogénesis de los iridoides, y sólo en casos muy raros no aparece esa insaturación. Los carbonos C-10 y C-11 están presentes en diferentes estados de oxidación. Frecuentemente uno de ellos, rara vez ambos, no aparece. La unión entre los dos ciclos es *cis* con una configuración β para ambos sustituyentes; el residuo O-glicosídico en C-1 tiene también configuración β y por ello ese carbono (C-1) presenta una configuración absoluta S⁸.

REACCIONES GENERALES DE IRIDOIDES

El tipo de reacciones efectuadas con compuestos iridoidales, está condicionado a su peculiar sensibilidad frente a los ácidos.

En medio ácido.

En los glicósidos iridoidales, el C-1 y C-3 están en el estado de oxidación de un aldehído:

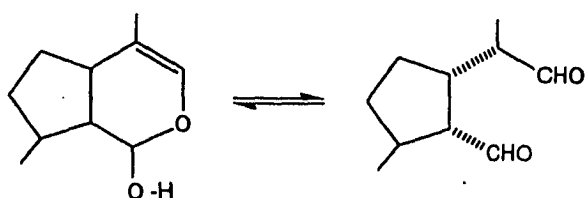


El anillo de dihidropirano se forma como resultado de la acetalización de la forma enólica del aldehído en C-3 con el aldehído en C-1, se tiene entonces un hidroxilo hemiacetalico en C-1 como resultado de la reacción anterior, la molécula es estable en tanto que esté unida a un residuo glicosídico.

Cuando se hace reaccionar un iridoide glicosídico con un ácido, generalmente se forman productos coloridos e incoloros que coexisten como resultado de la hidrólisis ácida del iridoide y que pueden ser el aglicón y/o varios compuestos resultantes de la degradación del esqueleto iridoidal. Depende de las condiciones experimentales, pero principalmente del número y tipo de sustituyentes presentes en el aglicón, para que se obtengan en mayor proporción uno u otro de dichos productos.

Los productos coloridos, resultantes de la hidrólisis, sirven para detectar iridoideas en extractos vegetales o animales, sin embargo estos compuestos generalmente son inestables y los colores intensos que se observan en medio ácido se ennegrecen más o menos rápido dependiendo de las condiciones de trabajo.

En un aglicón, la estructura dihidropiránica está en equilibrio con una estructura abierta 1,5-dialdehídica:



Lo primero que ocurre cuando se hidroliza un iridoide glicosídico es la

ruptura del enlace acetálico formado entre la unidad de azúcar y el aglicón (ver fig. 2).

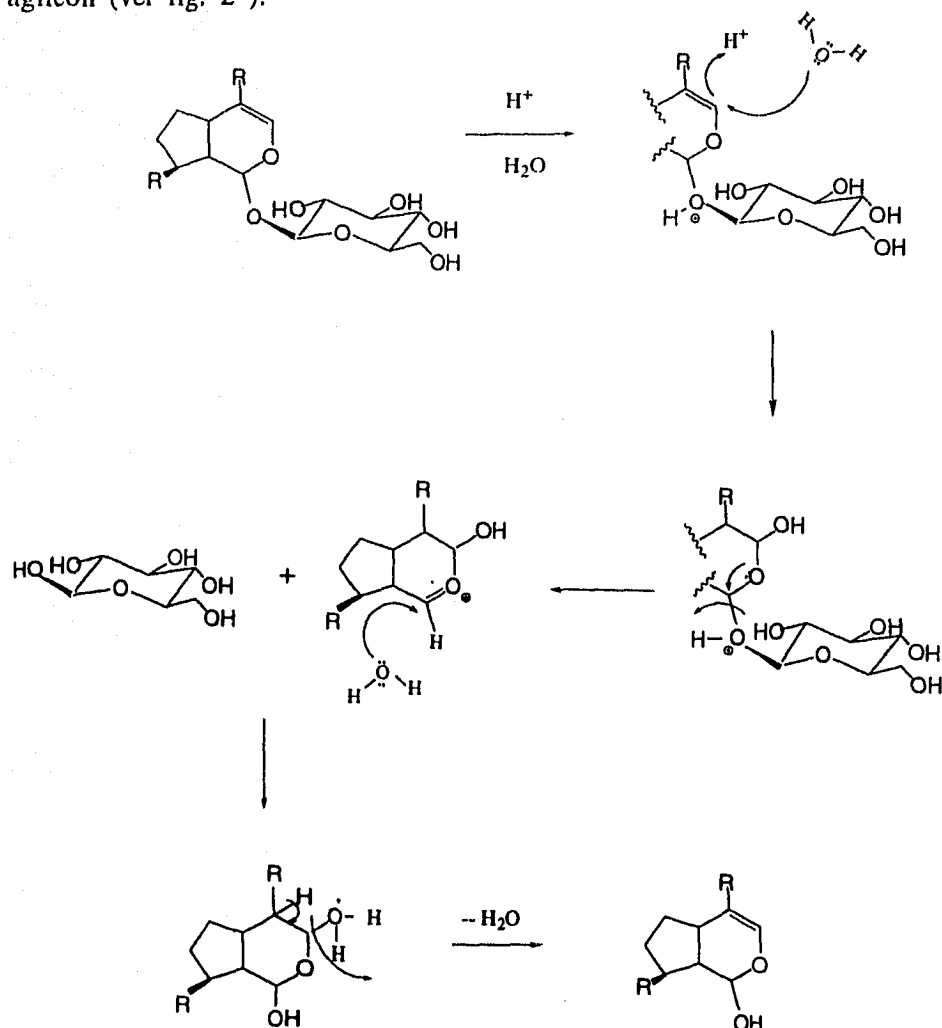


Figura 2 , hidrólisis ácida de un iridoide glucosídico.

La doble ligadura entre C-3 y C-4 es susceptible a los ataques electrofílicos, por eso, en medio ácido la hidratación de la función enol-eter iridoideal es una reacción paralela a la hidrólisis del enlace acetálico (ver fig. 3).

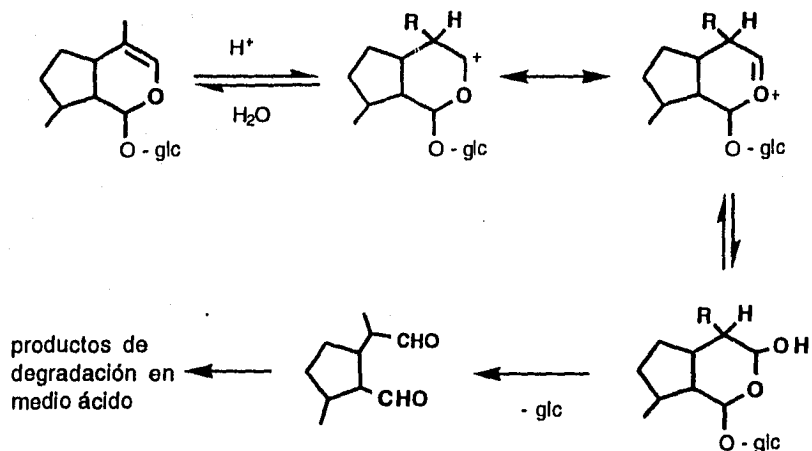


Figura 3 , hidratación de la función enol-eter.

La presencia de un grupo carbonilo en C-4 disminuye la reactividad del sistema enol-eter respecto al ataque electrofílico⁸.

Existen ciertas diferencias en la hidrólisis ácida de iridoides de acuerdo a su arreglo estructural.

Los iridoides con un C-5 no sustituido y sistema enol-eter conjugado, no se hidrolizan en HCl 2N a lo largo de varias horas a temperatura ambiente. Los que presentan un C-5 no sustituido y un sistema enol-eter no conjugado, se hidrolizan aproximadamente en una hora, bajo las mismas condiciones, que los del caso anterior.

Estas diferencias se explican porque en el segundo caso es más fácil la hidratación del sistema no conjugado enol-eter, porque éste es más susceptible al ataque electrofílico del H^+ .

Los productos de descomposición del aglicón se han usado en la preparación de pigmentos rojos y azules útiles en colorantes para alimentos, medicinas, cosméticos, etc. Esos compuestos son estabilizados haciéndolos reaccionar con un grupo amino primario^{15,16}.

Acetilación.

El derivado más empleado de los glicósidos iridoidales es, sin duda, el derivado acetilado útil para cuando se necesita purificar a un iridoide de una mezcla polar. La acetilación de grupos hidroxilo terciarios, como aquellos sobre C-5 y C-8, debe hacerse en condiciones severas como lo son la mezcla piridina-Ac₂O a 37°¹².

Interconversiones.

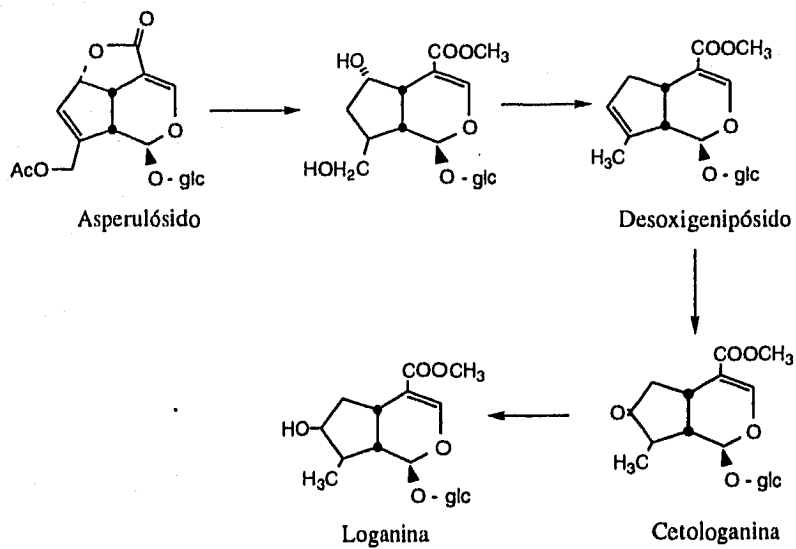
Frecuentemente los iridoides son extraídos sólo en pequeñas cantidades de sus fuentes naturales; una alternativa para obtenerlos es sintetizarlos partiendo de algún otro iridoide que esté presente en mayor cantidad y que sea relativamente fácil su obtención.

Las reacciones de interconversión de los iridoides glicosídicos pueden tener como producto final a otro iridoide, a un secoiridoide¹⁷, a un iridoide simple (aglicón) o a un precursor de algún compuesto natural (por ejemplo, prostaglandinas). En cualquiera de estos casos, se dice que los iridoides son usados como "materia prima quiral".

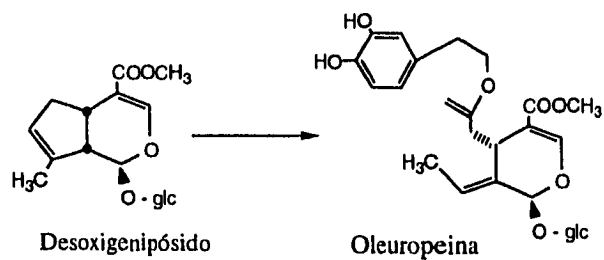
A continuación se presentan algunos ejemplos de cada caso.

Uno de los iridoides más fáciles de obtener, el asperulósido, se ha empleado como intermediario quiral en la síntesis parcial de prostaglandinas y también en la síntesis de otros iridoides glicosídicos:

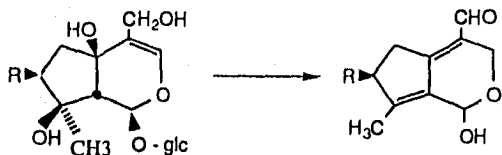
a) Iridoide glicosídico \rightleftharpoons Iridoide glicosídico



b) Iridoide glicosídico \rightleftharpoons Secoiridoide

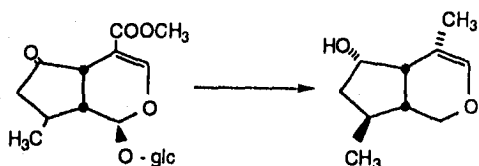


c) Iridoide glicosídico \Longrightarrow Iridoide simple (aglicón)



R=OH, Lamiidol.
R=H, Ipolamiidol.

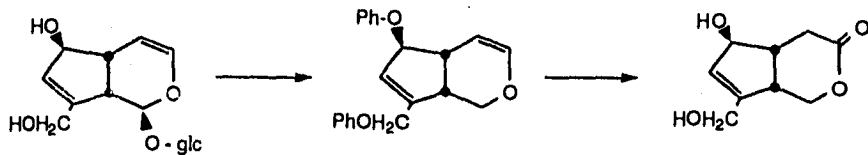
R=OH
R=H



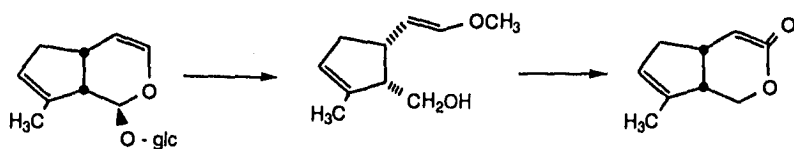
Verbenalina

6- α -hidroxiiridomirmecina

c) Iridoide glicosídico \Longrightarrow Iridoide simple (aglicón)

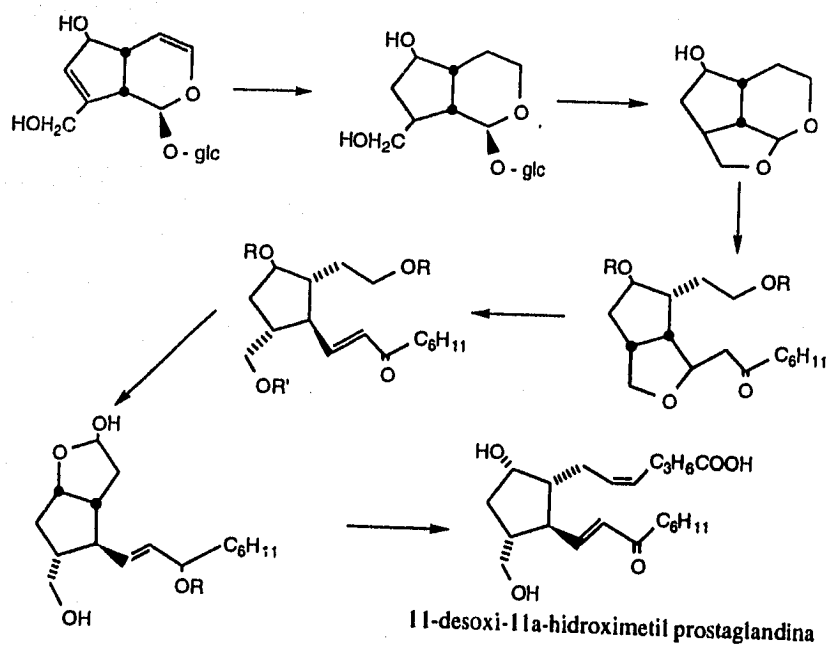


Aucubina

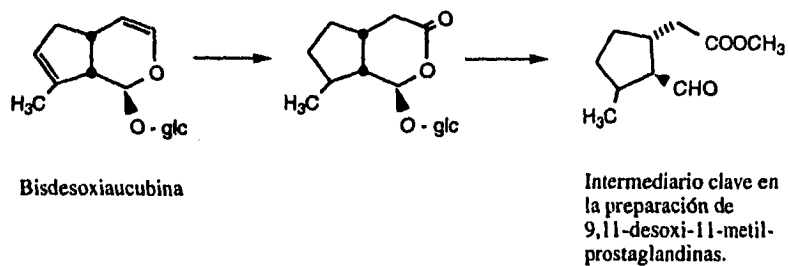
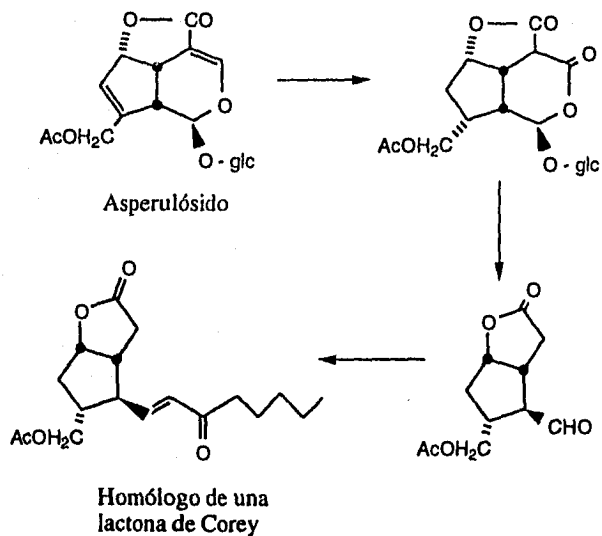


Bisdesoxiaucubina

d) Iridoide glicosídico \Rightarrow Precursores de Prostaglandinas



d) Iridoide glicosídico \Rightarrow Precursores de Prostaglandinas

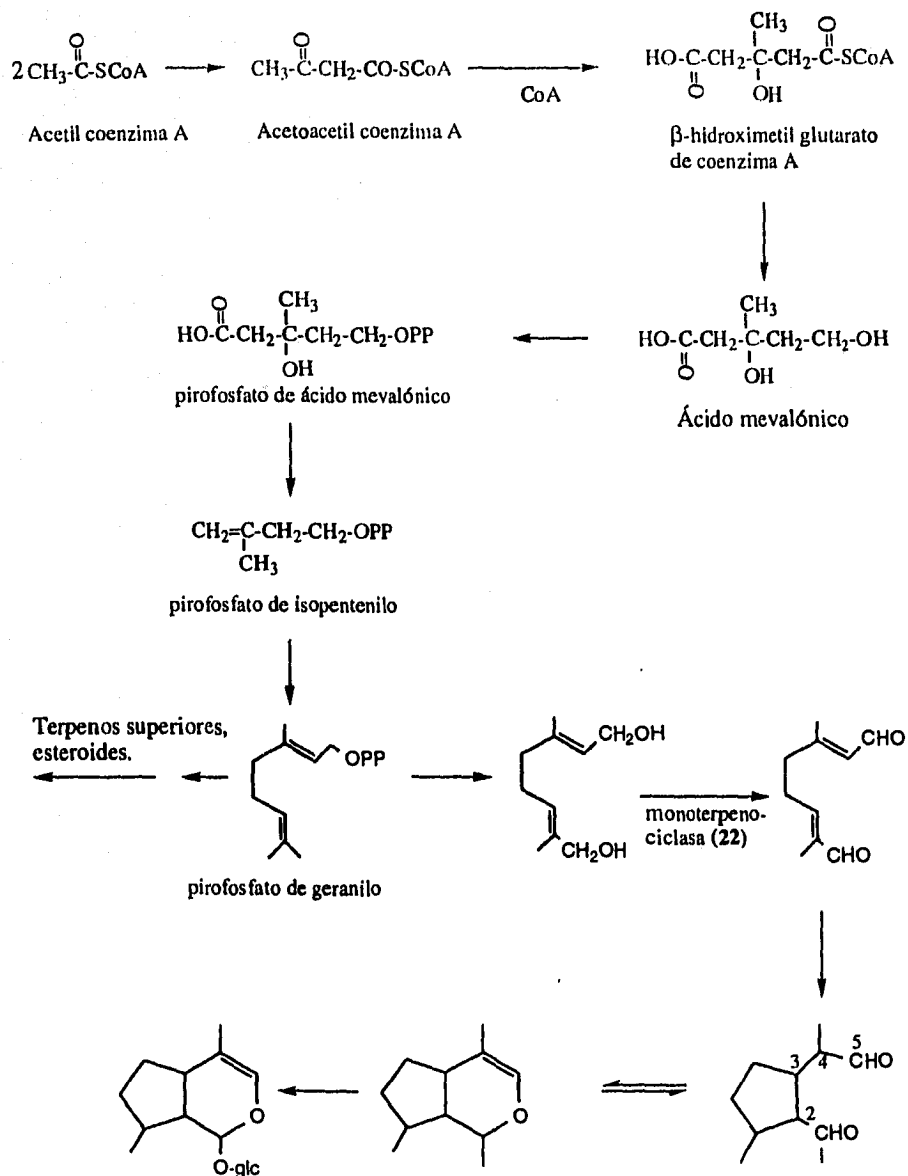


BIOSINTESIS DE IRIDOIDES

El punto clave en la ruta biosintética de los iridooides glicosídicos, es la ciclización del intermediario dialdehídico que proviene del pirofosfato de geranilo, el cual genera el anillo de ciclopentano. Después, se unen los grupos aldehído de C-1 y C-5 para cerrar lo que será el anillo de dihidropirano cuyo sistema hemiacetálico está estabilizado gracias a la glicosilación. Es evidente entonces, que el iridoide permanece estable sólo mientras exista el enlace glicosídico "bloqueando" al grupo hidroxilo hemiacetálico (ver fig. 4) ¹².

FIGURA 4 (18,19,20,21)

BIOSINTESIS DE IRIDOIDES GLICOSIDICOS



ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los productos naturales ciclopentanoides están distribuidos en plantas e insectos.

En plantas, los iridoides glucosídicos en particular, son de gran interés porque algunos presentan actividad farmacológica, mientras que otros son intermediarios, vía secoiridoides, en las rutas metabólicas que generan alcaloides.

Y en insectos, ciertos iridoides volátiles sirven como feromonas, otros producidos en glándulas de defensa, sirven como pegamentos, fijadores o fumigantes en las secreciones de defensa²³.

Son los ingredientes activos de un gran número de plantas usadas en la medicina popular como sedantes ligeros, febrífugos, hipotensivos, remedios contra la tos y contra infecciones en la piel. Sin embargo, la actividad encontrada en esas plantas no puede atribuírse únicamente a los iridoides.

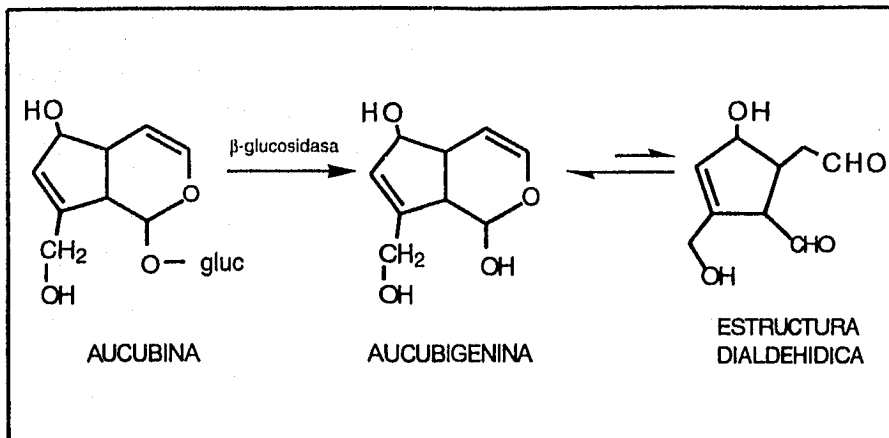
Hay experimentos que demuestran la actividad antialimentaria de ciertos iridoides, lo cual sugiere su presencia en las plantas como mecanismo de defensa contra insectos²⁴.

Ciertos iridoides glicosídicos presentan propiedades antibióticas, antioxidantes, inhibidoras del crecimiento vegetal o antitumorales, pero parece ser que éstas son principalmente propiedades del aglicón iridoideal, de acuerdo con experimentos en que tal actividad sólo se observa después de tratar a los iridoides con β -glucosidasa, con lo cual se libera la unidad de azúcar del iridoide glucosídico.

Hay investigaciones que señalan al aglicón del iridoide como el responsable de la actividad antibiótica, por ejemplo en el caso de la aucubigenina (aglicón de la aucubina) frente al *Staphylococcus aureus* : con 1 mL de una disolución acuosa de aucubina al 2% en presencia de β -glucosidasa se tiene el mismo efecto que con 600 u.i. de penicilina^{27,25}.

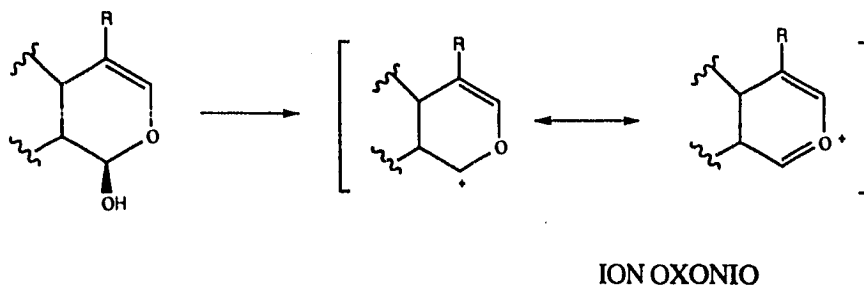
Proponen también que la estructura dialdehídica es la que ocasiona tal actividad (fig. 5), e incluso que los productos poliméricos poco solubles resultantes de la hidrólisis pudieran ser los causantes del efecto antimicrobial. Todas éstas son hipótesis todavía dada la extrema inestabilidad de los aglucones.

Figura 5²⁵



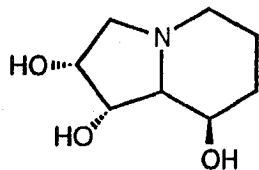
Las proporciones relativas del iridoide glicosídico respecto a su aglicón son difíciles de establecer porque probablemente con los procesos usuales de aislamiento y purificación se ocasiona la descomposición de los aglicones.

En las propiedades anteriormente descritas para los iridoides, los aglicones pueden no ser las especies activas. La actividad biológica podría provenir, en lugar del aglicón, de un derivado que es un ion oxonio altamente electrofílico:



Varios compuestos biológicamente activos presentan anillos sustituidos y fusionados en las posiciones 5,6 al igual que ciertos esqueletos iridoidales, como por ejemplo la Swainsonina que es un alcaloide tóxico, inhibidor de la α -manosidasa y responsable del "locoismo",

intoxicación en el ganado^{6,26}.



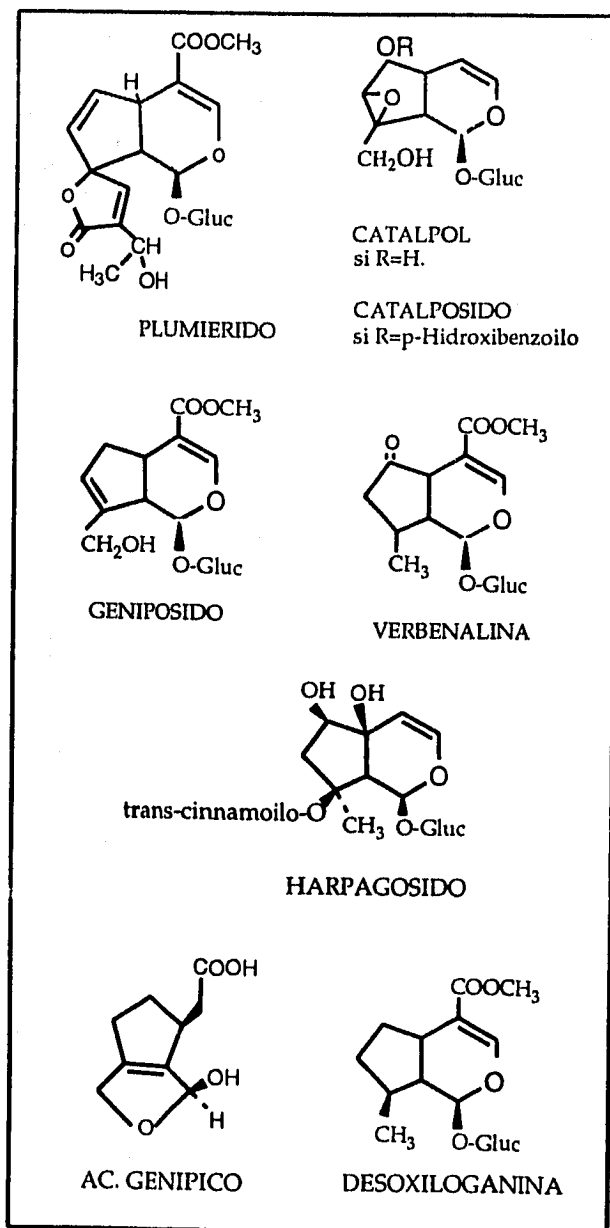
Swainsonina

Algunos iridoides puros estudiados son, por ejemplo, el harpagósido, que presenta propiedades analgésicas, espasmódicas y antiflogísticas; la desoxiloganina, el genipósido, plumiérido y verbenalina, como laxantes; el catalpol y el catalpósido, como diuréticos; la aucubina, como estimulante de la excreción de ácido úrico por los riñones y como antiestresante (figura 6)^{27,28}.

El glucósido de la verbenalina actúa específicamente sobre el útero (estimula la contracción uterina)^{29,57}.

Tanto el ácido genípico como el ácido genipínico (iridoides no-glicosídicos) son antibióticos que inhiben el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), de hongos, algas y protozoarios³⁰.

Figura 6. Iridoides glicosídicos y no-glicosídicos.



Se sabe además que los aglucones de la aucubina, del metil éster del escandósido, del genipósido, de la loganina, del swerosido, del gardenósido y del gentiopicrósido, presentan actividad antitumoral y sus respectivos iridoides glucosídicos no³¹.

La actividad antiinflamatoria de algunos iridoides, dosificados de manera local y de manera oral, puede relacionarse directamente con su estructura química. Se reporta que la hidroxil-sustitución en C-5, la insaturación entre C-7 y C-8, un grupo $-\text{COOCH}_3$ en C-4 o el anillo de ciclopentano íntegro, son factores que favorecen la actividad antiinflamatoria local (iridoides aplicados directamente sobre un edema), y la desfavorecen las hidroxil-sustituciones en C-8.

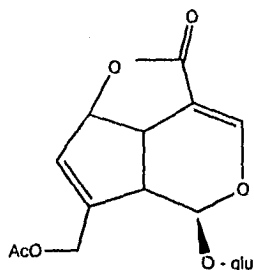
La actividad antiinflamatoria vía oral aumenta si hay un radical voluminoso unido a la unidad de azúcar del iridoide glicosídico, mientras que si dicho radical está unido al esqueleto monoterpenoide la actividad antiinflamatoria oral disminuye y la actividad antiinflamatoria local aumenta³².

METABOLISMO

El papel que juegan los iridoides en el metabolismo de las plantas todavía no está explicado del todo como para otros metabolitos secundarios. Algunas hipótesis afirman que los iridoides participan en el transporte y la acumulación de glucosa, o que son sólo productos finales. Sin embargo, su distribución en tejidos vegetales, frecuentemente localizada en tejidos jóvenes, sugiere una rápida utilización en el metabolismo de la planta¹².

Cuando los iridoides están en altas concentraciones en las plantas, son utilizados, por la misma planta, como materia prima para la síntesis de ciclopentanos sustituidos (por ejemplo, sintones de prostaglandinas).

En algunas familias vegetales, el anillo ciclopentanoide de los iridoides se rompe para generar secoiridoides del tipo de la secologanina, la cual es un precursor biosintético muy importante de los alcaloides indólicos y un "sinton" muy útil y comercialmente disponible:



Asperulósido

Los iridoides son tanto biosintética como sintéticamente transformables en alcaloides monoterpénicos piridínicos ^{6,34}. Pero en general, el uso extensivo de los iridoides como sintones quirales dependerá de la disponibilidad de esas especies de plantas, que crezcan fácilmente y que contengan el iridoide deseado como uno de los componentes mayoritarios.

Cuando el iridoide deseado no esté en una buena cantidad, la separación de los componentes individuales del extracto vegetal y de los azúcares "contaminantes" puede resultar tediosa y consumir mucho tiempo⁶.

Una vez que se aísla un iridoide de su fuente natural, hay que evaluar qué tan factible es su uso para síntesis químicas posteriores, considerando:

- a) Que debe estar entre un 0.1 y un 5 % de abundancia, respecto al peso seco de planta.
- b) Que su aislamiento comprenda pocos pasos.
- c) Su estructura (estereoquímica bien definida).
- d) Que sea una molécula estable.

OBTENCION DEL AGLICON IRIDOIDAL. METODOS DE HIDROLISIS.

Se habla de aglicones iridoidales cuando no hay unidad de azúcar sobre el C-1, es decir, que está ausente o bien que se encuentra unida a cualquiera de los otros átomos de carbono del esqueleto iridoidal ¹².

Cuando se comenzaron a realizar estudios de actividad biológica de

compuestos iridoidales, se descubrió que se generaban productos de rápida descomposición. Se pensó que estos productos podían ser el "principio activo" de los extractos vegetales que contienen iridoides, ya que en varios casos no había actividad biológica hasta después de ocasionar la ruptura de la unidad o unidades de azúcar del esqueleto iridoidal; entonces se propuso que los aglicones iridoidales son los responsables de la actividad biológica observada y surgió un gran interés por el aislamiento de este tipo de compuestos.

Además, el tener aislado al aglicón puede ser útil para elucidar las estructuras de sus glicósidos iridoidales de origen, para conocer los mecanismos de su degradación o síntesis o bien pueden ser usados como materia prima quiral en la síntesis de estructuras moleculares complejas en las que se logre una actividad biológica mayor o más selectiva (por ejemplo, aglicones usados en síntesis de flavonoides, prostaglandinas, alcaloides, etc).

Con los métodos encontrados en la bibliografía para obtener aglicones, puede hacerse una clasificación en vías enzimáticas y vías químicas de hidrólisis.

De manera general, la vía enzimática consiste en tener a un iridoide glicosídico disuelto en una disolución amortiguadora de acetatos, agregarle una solución acuosa de la enzima que rompa el enlace de la unidad de azúcar unida al iridoide, incubar y extraer al aglicón con el disolvente apropiado.

Por ejemplo, para los iridoide glucosídicos se emplea β -glucosidasa.

La vía química incluye un calentamiento a reflujo del iridoide glicosídico con un ácido inorgánico, la neutralización y finalmente la extracción, a una fase orgánica, del aglicón ^{35,36,37}.

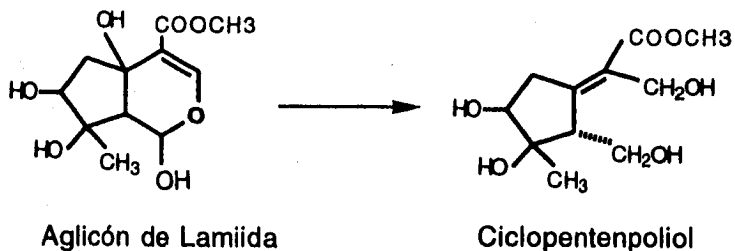
Las hidrólisis ácidas con ácidos minerales a veces no son convenientes pues se obtienen varios productos de descomposición. La hidrólisis enzimática es un método más selectivo y costeable para cantidades pequeñas de sustrato (iridoide) porque para obtener un aglicón en grandes cantidades ya hay que considerar que el costo se eleva bastante.

Con el propósito de obtener hidrólisis menos agresivas para no degradar por completo el esqueleto iridoidal, se siguen buscando otros

reactivos hidrolíticos.

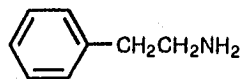
Por ejemplo, una variante de la vía química descrita, es la hidrólisis con peryodato de sodio (NaIO_4) y ácido clorhídrico diluido (HCl) a temperatura ambiente³⁸.

Sin embargo, para cualquiera de los métodos de obtención de aglicones es recomendable cerciorarse que no ocurran reacciones de degradación del aglicón con los reactivos hidrolíticos empleados; una reacción de este tipo sucede al realizar una hidrólisis enzimática y emplear NaBH_4 en el proceso de aislamiento del aglicón, se ocasiona su conversión en iridodiolos :

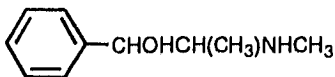


ALCALOIDES MONOTERPENO-PIRIDINICOS.

El término "alcaloide" (semejante a un álcali) se aplica a un vasto grupo de productos naturales de origen vegetal y animal que contienen nitrógeno, comúnmente formando parte de un anillo como en los pirroles, piridinas, pirrolidinas, quinolinas o isoquinolinas; aunque también aparece en cadenas alifáticas laterales (ver figura 7).



FENILETILAMINA

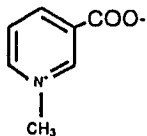


EFEDRINA

FARMACOLOGICAMENTE,
ACTUA COMO LA ADRENALINA
ES UN ESTIMULANTE DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

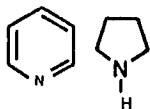


PIRIDINA

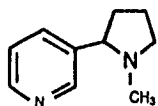


TRIGONELINA

SE USA EN INVESTIGACIONES
BIOQUIMICAS.

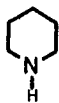


PIRIDINA-PIRROLIDINA

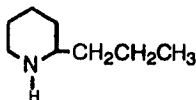


NICOTINA

USADA COMO ECTOPARASITICIDA
Y ANTIHELMINTICO, AUMENTA LA
PRESION SANGUINEA.



PIPERIDINA

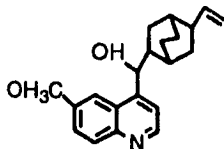


CONIINA

ALCALOIDE MUY VENENOSO.

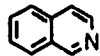


QUINOLINA

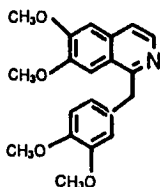


QUININA

SE USA EN EL TRATAMIENTO DE
LA MALARIA, ES UN VENENO
PROTOPLASMICO GENERAL,
SE USA EN REMEDIOS CONTRA
CATARRO, GRIPE Y CALAMBRES.



ISOQUINOLINA



PAPAVERINA

ES UN RELAJANTE MUSCULAR
Y VASODILATADOR CEREBRAL.

Figura 7. Alcaloides.

Cuando estos compuestos se derivan de un monoterpeno (C-10), se tienen alcaloides monoterpénicos, y si además en el alcaloide monoterpénico está aromatizado el heterociclo se dice que se tiene un alcaloide monoterpénico-piridínico. En los alcaloides monoterpénicos el átomo de oxígeno en la posición 2 de los iridoide de origen, se encuentra sustituido por un átomo de nitrógeno, conservándose el esqueleto bicíclico.

Como ha sucedido con otros compuestos, el interés original por las plantas de las cuales han sido aislados ciertos alcaloides, proviene del uso popular que se hace tradicionalmente de sus extractos vegetales.

R. Thomas y E. Wenker introdujeron sus teorías de la biosíntesis de los alcaloides indólicos a partir de un precursor iridoide en 1961, planteando que los alcaloides podían condensarse con amoníaco y generar series de alcaloides que contengan una unidad C-10, en lugar de condensarse con triptamina-triptofano³⁹.

La afirmación de que algunos o casi todos los alcaloides monoterpénicos son el resultado de la adición de amoníaco a un iridoide o secoiridoide durante su extracción, ha sido un tema muy discutido. De cualquier manera, la cantidad aislada de un alcaloide a veces no se ve afectada por el uso de Na_2CO_3 en lugar de amoníaco⁴⁰, en otros casos se han aislado compuestos que no son alcaloides en ausencia de amoníaco⁴⁰ y a veces el rendimiento se incrementa sólo usando amoníaco⁴¹.

Para su estudio, los alcaloides monoterpénico-piridínicos se dividen en dos grupos: aquellos relacionados con la estructura de la actinidina, principalmente los semejantes a la piridina, y aquellos de estructura semejante a la gentianina, los cuales generalmente tienen un anillo de lactona unido a la piridina⁴².

ALCALOIDES RELACIONADOS CON LA ACTINIDINA.	ALCALOIDES RELACIONADOS CON LA GENTIANINA.
Noractinidina	Gentianidina
Valerianina	Gentianadina
Tecostidina	Gentianamina
Indicaina	Gentioflavina
Plantagonina	Fontafilina
Venoterpina	Gentiatibetina
Cantleyina	Oliveridina
Pedicularidina	Oliverina
Pedicularina	Oliveramina
Pediculina	Jasminina
Pedculidina	
Pedculinina	

Generalmente, los alcaloides presentan una gran actividad fisiológica en los organismos animales, varios son venenosos. Debido a ello, son compuestos de gran importancia en Farmacología, Medicina y Toxicología^{43,44}.

ALCALOIDE	ACTIVIDAD FARMACOLOGICA
Actinidina	Atrayente de felinos ⁽⁴⁵⁾
Gentianadina	Hipotérmico Hipotensivo Antiinflamatorio Relajante muscular
Esquitanthina	Sedativo
Tecomina	Hipoglicémico

OBTENCION DE ALCALOIDES MONOTERPEÑO-PIRIDINICOS.

Existen cuatro vías básicas para sintetizar este tipo de alcaloides a partir de un iridoide glicosídico:

(a) Utilizando amoniac 46

Disolución etanólica
del compuesto iridoial
saturada con $\text{NH}_3(\text{g})$

- 1) HCl
- 2) NH_3
- 3) extraer con ACOEt

Alcaloide monoterpenico-piridfnico

(b) Con un complejo férrico-amoniacal 47

Disolución etanólica acidificada
del compuesto iridoial

- 1) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$
- 2) Alcalinizar
- 3) Extraer con éter

Alcaloide
monoterpénico-piridfnico

(c) Formando la correspondiente dinitrofenilhidrazona⁴⁸

Compuesto iridoial

2,4-dinitrofenilhidrazina

2,4-dinitrofenilhidrazona
del iridoide

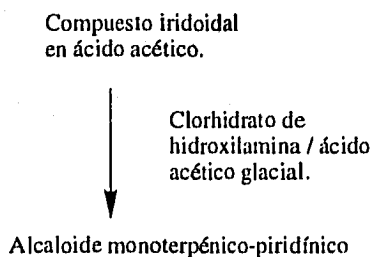
$\text{HCl} / \text{CH}_3\text{COOH}$

Ciclopentenopiridina

Alcaloide
monoterpénico- piridfnico

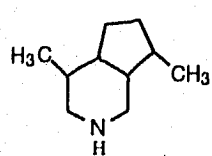
Picrato del
compuesto piridfnico

(d) O con hidroxilaminas⁴⁹

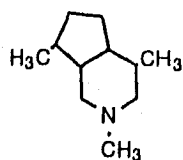


Encontrar métodos de síntesis eficaces para este tipo de alcaloides es importante porque teniendo cantidades suficientes será posible realizar pruebas de actividad biológica, sintetizar derivados o bien realizar estudios que nos permitan elucidar la relación (conexión) biosintética entre los alcaloides monoterpénico-piridínicos y los iridoides o entre los alcaloides monoterpénico-piridínicos y los demás metabolitos secundarios que diferencian químicamente al vasto Reino vegetal.

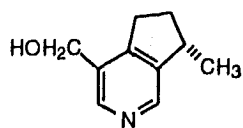
Figura 8. ALCALOIDES MONOTERPENO-PIRIDINICOS.



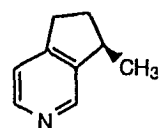
4-Noractinidina



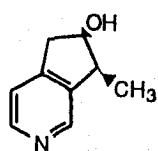
Esquitantina



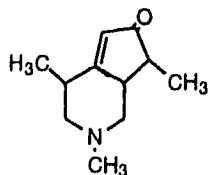
Tecostidina



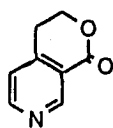
Cantleyina



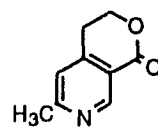
Venoterpina



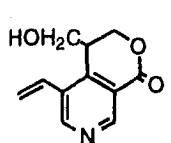
Tecomina



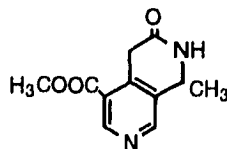
Gentianadina



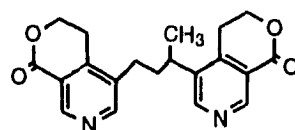
Gentianidina



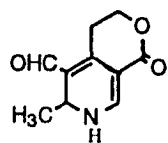
Gentianamina



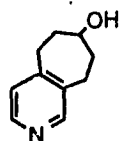
Jasminina



Oliveramina



Gentioflavina



Pediculinina

OBJETIVOS

- Aislar, caracterizar y cuantificar los iridoideos glicosídicos presentes en la especie *Lamourouxia dasyantha*, colectada en los estados de Hidalgo y Oaxaca.
- Obtener el aglucón del iridoide aislado en mayor cantidad y posteriormente usarlo como intermediario quirál en la síntesis del correspondiente alcaloide monoterpeno-piridínico.
- Sintetizar un alcaloide monoterpeno-piridínico a partir del iridoide aislado de *Lamourouxia dasyantha*, utilizando clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético glacial.

PARTE EXPERIMENTAL

Los procesos de separación y purificación y las reacciones químicas, fueron seguidas por cromatografía en placa fina usando cromatofolios ALUGRAM SIL G-UV₂₅₄ de 0.25 mm. de espesor.

Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta, solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, solución de vainillina en HCl.

Los productos fueron purificados por cristalización y por cromatografía. Las cromatografías en columnas fueron realizadas empleando gel de sílice 60 MERCK (35-70 mallas). Las cromatografías en placa preparativa se realizaron en cromatoplasmas de gel de sílice SIL G-200 UV₂₅₄ de 2 mm. de espesor. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Jones (no corregidos).

Los espectros de IR fueron realizados por la QFB Rocío Patiño M. y el Q. Arturo Zapien en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 283 y NICOLET FT-IR 55X.

Los espectros de RMN-H¹ fueron realizados por el Q. Atilano García y la M.C. Isabel Chávez en los espectrómetros Variant Gemini-200 y Varian VXR-300S.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard modelo 5945 A, con técnicas de impacto electrónico a 70 eV, por el I.Q. Luis Velasco.

Los desplazamientos químicos se dan en partes por millón (ppm) y las abreviaturas empleadas son: s=singulete, d=doblete, t=tripleto, m=multiplote; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz.

Otras abreviaturas usadas son: c.c.f.= cromatografía en capa fina, AcOEt=acetato de etilo, MeOH= metanol, p.f.=punto de fusión, IR=infrarrojo, RMN-H¹= resonancia magnética nuclear de hidrógeno, MS=espectrometría de masas.

PRIMERA PARTE. Aislamiento y caracterización de iridoides glicosídicos en *Lamourouxia dasyantha*.

Se ocuparon cuatro lotes de plantas del mismo género y especie pero de distinta procedencia .

A la planta *Lamourouxia dasyantha* ya seca y almacenada por varios meses colectada en Jigüingo, Hidalgo, la llamaremos L-1.

Las plantas frescas (*Lamourouxia dasyantha*) colectadas en Actopan y Jigüingo (zona de las pirámides), Hidalgo en noviembre de 1993, que denominaremos L-2 y L-3, respectivamente.

Y el extracto metanólico de *Lamourouxia dasyantha* colectada en Yanhuatlán, Oaxaca, en noviembre de 1984, la llamaremos L-4.

OBTENCION DEL EXTRACTO L-1

Con 413.7 g de planta seca y molida, del lote L-1, se realizaron maceraciones sucesivas con hexano, cloruro de metileno y metanol.

Se obtuvieron 52.5 g del extracto metanólico se le quitaron las clorofilas percolándolo por una cama de celita, precipitó aquí el manitol que se separó de la disolución filtrando al vacío los cristales verdosos y lavándolos con metanol.

OBTENCION DEL MANNITOL.

Los cristales verdosos se disolvieron en etanol caliente, se agregó carbón activado bajo agitación, se filtró por gravedad y en el filtrado se forman cristales blancos y amarillos. Se lavaron estos cristales con acetona a temperatura ambiente obteniéndose 4.14 g. (1%) de cristales blancos brillantes, con p.f.= 158-159^o, R_f = 0.73 (Metanol-etanol, 1:1).

IR (KBr,pastilla) ν = 3280 (O-H), 2940 (C-H), 1600 , 1460 (C-O), 1080 (C-C), 1020 (C-C) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO) δ 3.4 a 3.7(m,8H), 4.3(señal ancha,OH, intercambiables con D₂O).

MS (E.I. 70 eV) m/z (intensidades relativas) 73.1(100), 103(59.4), 61.1(56.9), 57.1(50).

Después se realizó con este extracto una cromatografía en columna semilíquida eluyendo con acetato de etilo-metanol (desde un 25% hasta

un 50% polar), en las primeras fracciones se separó del extracto al compuesto reportado como acetósido⁵⁰ (V), que no cuantificamos, y en las fracciones siguientes se detectó la salida de una mezcla de iridoides (mezcla I), revelando con sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico y además con el reactivo de vainillina-HCl.

Con el grupo de fracciones en las que se obtuvo la mezcla I, se realizó otra cromatografía en columna semilíquida de SiO₂, eluyendo con la mezcla acetato de etilo-metanol desde un 5% hasta un 15% polar. No se logró resolver la mezcla I. Para purificarla se realizó una cromatografía en placa preparativa de SiO₂, eluyendo con AcOEt-MeOH (7:3), sin obtener la separación completa de los iridoides y que designamos como mezcla I.

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS L-2 y L-3.

Se trabajó la planta recién colectada en Actopan, Hgo. (L-2 y L-3). De 881 g de planta fresca, seca y molida se obtuvieron 196 g de extracto metanólico; después de una cromatografía en columna semilíquida de SiO₂ y una placa preparativa de SiO₂, se aislaron 2 mg. de la mezcla I.

Con 19 g del extracto L-4, se hizo una cromatografía en columna semilíquida de SiO₂ de la cual se aislaron 0.0486 g de la mezcla de iridoides I, eluyendo con AcOEt-MeOH (92.5 : 7.5) .

IR (película) $\nu = 1706(\text{CH}_3\text{CO}-\text{C}=\text{CO})$, 2125, 2250, 3427.8 (OH) cm^{-1}

¹H-NMR (CD₃OD) δ 1.15(s,3H,CH₃), 1.6(m,H,H-6), 2.0(m,H,H-5), 2.1(m,H,H-7), 2.49(s,H,H-9), 2.85(m,H,H-5), 3.75(s,6H,COOCH₃), 4.15(m,2H,CH₂), 5.3(m,CH=C,H-7), 5.7(d,J=6.25,H,H-1), 5.8(d,H,H-1), 7.45(s,H,H-3), 7.52(d,J=6.25,H,H-3).

OBTENCION DEL EXTRACTO L-4.

De 1.5 Kg. de la planta *Lamourouxia dasyantha* colectada en Oaxaca, tratada igual que el lote L-1, se obtuvieron 50 g. de extracto metanólico 50.

ACETILACION DE LOS EXTRACTOS L-1 Y L-2.

1.3 g. del extracto metanólico de L-1, filtrado al vacío primero por celita y luego por tonsil, se acetilaron a temperatura ambiente con 2 mL de piridina y 1.5 mL de anhídrido acético recién destilados (1:2:1). El matraz de reacción se dejó 48 hrs. a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con HCl (ac) al 10% hasta pH ácido (neutralización de la piridina). Después se lavó varias veces con agua destilada hasta pH neutro. Se obtuvieron 0.25 g. de una mezcla color café no separable por c.c.f.

200 mg. del extracto L-2, se acetilaron con piridina y anhídrido acético, sin destilar (1:2:1.5), calentando a reflujo y bajo agitación por una noche. La mezcla acetilada se pasó por una columna de tonsil para quitar piridina y anh. acético remanentes. Se obtuvo una mezcla viscosa color café no separable por c.c.f.

100 mg. del iridoide **II** se acetilaron con 0.2 mL de piridina y 0.15 mL de anhídrido acético, calentando 24 hrs. La piridina y anhídrido acético remanentes se eliminaron con una destilación al vacío. Se obtuvo una mezcla viscosa café no separable por c.c.f.

OBTENCION DEL IRIDOIDE II.

Con 12 g. del extracto L-4 se realizó una cromatografía en columna semilíquida usando la mezcla ACOEt-MeOH (95:5) como eluyente, se aisló el iridoide **II** (4.041 g., 33.6%), cristales blancos, p.f. 103-105 ° (AcOEt), $R_f = 0.5$ (AcOEt-MeOH, 8:2).

IR (CHCl₃) V: 3400(OH), 1710(COOMe), 1630(C=C), 1290(C-C), 1075(C=O), cm⁻¹

¹H-NMR(CDCl₃) δ 0.9(d,3H,CH₃,J=8.16), 1.9(m,2H,H-6), 2.3(m,H,H-8), 2.6(m,H,H-9), 3.75(s,3H,COOCH₃), 4.08(m,2H,H-7), 5.28(d,OH,J=4.08, señal intercambiable con D₂O), 5.8(d,H,H-1,J=4.08), 7.45(s,H,H-3).

MS (EI 70 eV) m/z (intensidades relativas) 73.1(100), 179(50), 193(50), 211(70).

SEGUNDA PARTE. Obtención del aglucón iridoidal y síntesis del correspondiente alcaloide monoterpeno-piridínico.

HIDROLISIS ACIDA DEL IRIDOIDE GLUCOSIDICO II .

100 mg (2.6×10^{-4} moles) del iridoide y 0.65 mL de agua destilada se colocaron en un matraz bola. Bajo agitación se le agregaron 0.12 g (5.6×10^{-4} moles) de NaIO_4 (s) y la mezcla se agitó por 3 horas más.

Se enfrió la mezcla a 0°C con un baño de hielo-sal. Se agregaron entonces 0.04 g (1.05×10^{-3} moles) de NaBH_4 (s) y se agitó a temperatura ambiente por dos horas. Se le adicionaron dos gotas de HCl 6M y un mL de éter etílico, se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 3 horas, para después agregarle 0.05 g (5×10^{-4} moles) de bisulfito de sodio sólido y 0.05 g (8.5×10^{-4} moles) de cloruro de sodio sólido. Se observó la separación de la fase etérea. Se hicieron varias extracciones con éter etílico a la fase acuosa. Se reunieron las fases etéreas y se secaron con Na_2SO_4 anhidro. Se concentró la fase orgánica y se obtuvo un aceite color café que resultó ser una mezcla de reacción compleja, no separable por c.c.f.

Para determinar si en el sólido blanco que aparece a los escasos 3 min. después de la adición del NaIO_4 , ya se había formado el aglucón del iridoide II se hidrolizaron por separado el sólido blanco (93% respecto al iridoide), y la disolución acuosa de color amarillo que lo contiene. Se siguió el procedimiento arriba descrito y después de adicionar el HCl (ac) se obtienen, para el primero, una disolución amarilla y, para la segunda, un líquido viscoso color café oscuro. Después de las extracciones etéreas se obtienen en ambos casos mezclas complejas de productos no separables por c.c.f.

OBTENCION DEL ALCALOIDE MONOTERPENO-PIRIDINICO.

Se colocaron 100 mg (2.6×10^{-4} moles) del iridoide II y 0.15 mL (2.6×10^{-3} moles) de ácido acético glacial en un matraz bola, la disolución se agitó 10 minutos. Esta mezcla se agregó poco a poco a otro matraz con clorhidrato de hidroxilamina, 0.03 g (4.3×10^{-4} moles), suspendido en

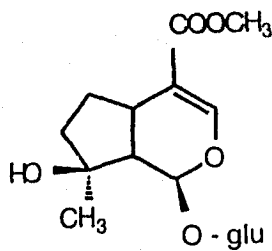
ácido acético glacial, 0.16 mL (2.8×10^{-3} moles). Se mantuvo 30 minutos en baño maría (30°) y se agitó toda una noche. Se neutralizó a pH=10 con NH_3 (ac) al 15%. Se extrajo al alcaloide con porciones de CH_2Cl_2 . Se concentró la fase orgánica obteniéndose un líquido café (80 mg), presenta dos manchas en c.c.f. con $R_f=0.41$ y $R_f=0.6$ (AcOEt-MeOH, 4:1), al revelar con luz UV, de color morado y azul claro, respectivamente; 50 mg de la mezcla de reacción anterior, fueron aplicados en una placa preparativa de SiO_2 (9.5 X 9.5 cm) y eluyendo con AcOEt-MeOH (2:1) fue separado el componente con $R_f=0.6$ que dió prueba positiva con el reactivo de Dragendorff, fue extraído con CH_2Cl_2 obteniéndose cristales amorfos amarillos (15 mg, 30%) del alcaloide monoterpenopiridínico IV, reblandece aprox. en 170° .

IR (CHCl_3) $\nu = 2965$ (anillo piridínico), 1730 (gpo. carbonilo), 1612 (C=N) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.35 (d, $J=7.14$, 3H, CH_3), 1.75 (m, 2H, 2H-7), 2.45 (m, 1H, H-8), 3.25 (m, 2H, 2H-6), 3.95 (s, 3H, COOCH_3), 8.15 (s, 1H, CH), 8.65 (s, 1H, CH)

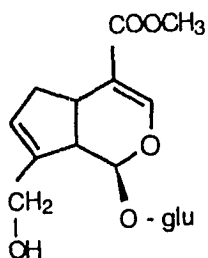
MS (EI 70 eV) m/z (intensidades relativas) 207.2 (M^+ , 100, $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$), 147.2 (69.9, $\text{C}_9\text{H}_9\text{ON}$) 176.2 (46.8, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}$), 191 (19.5, $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$).

ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.

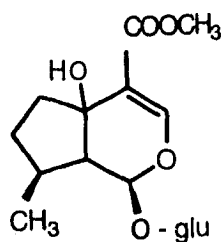


Mussaenósido

0.002g de la mezcla (0.001%)

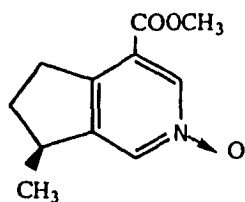


Genipósido



IRIDOIDE II

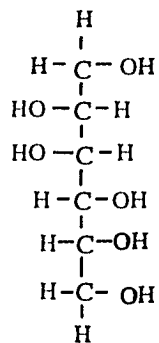
4.04 g (0.3%)



**N-óxido del alcaloide
monoterpénico
piridínico (IV)**

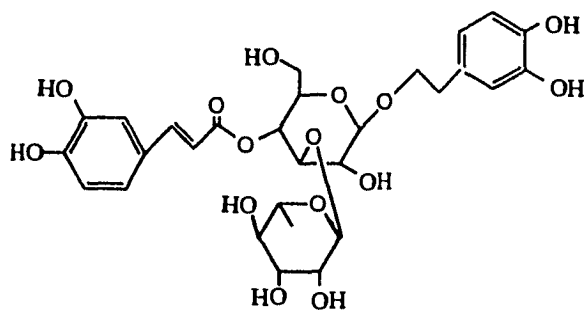
0.01 g (10 %)

ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.



D-mannitol (III)

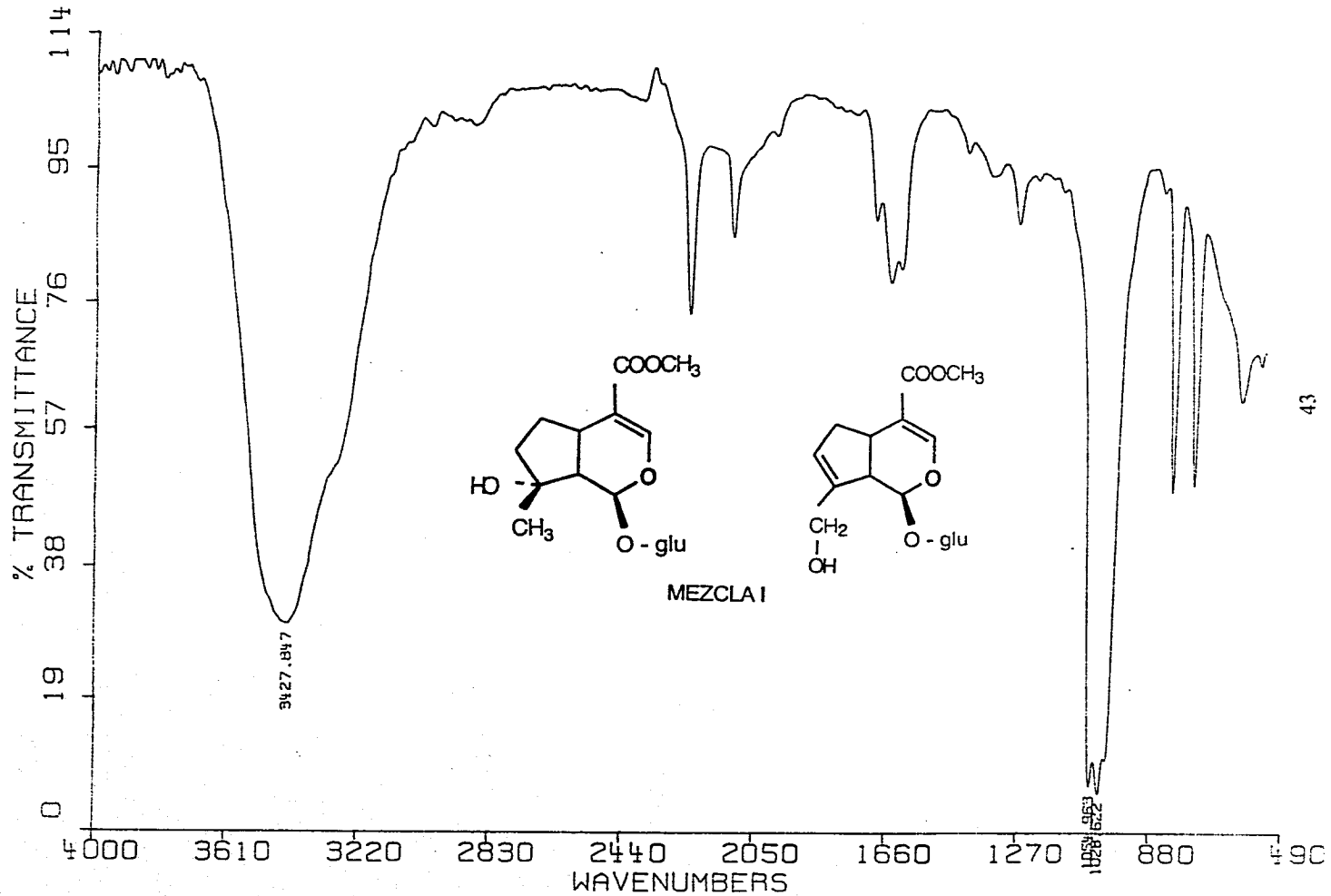
4.14 g (1%)

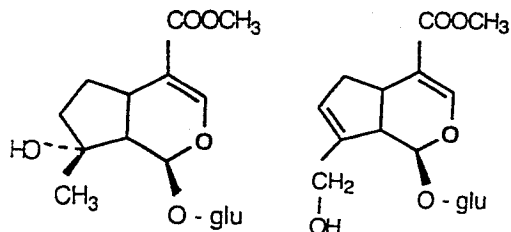


Acteosido
(No cuantificado)

ESPECTROS

MJE NM-EXT0.77-92(18-24) PELICULA 2198 06/09/93 RVI



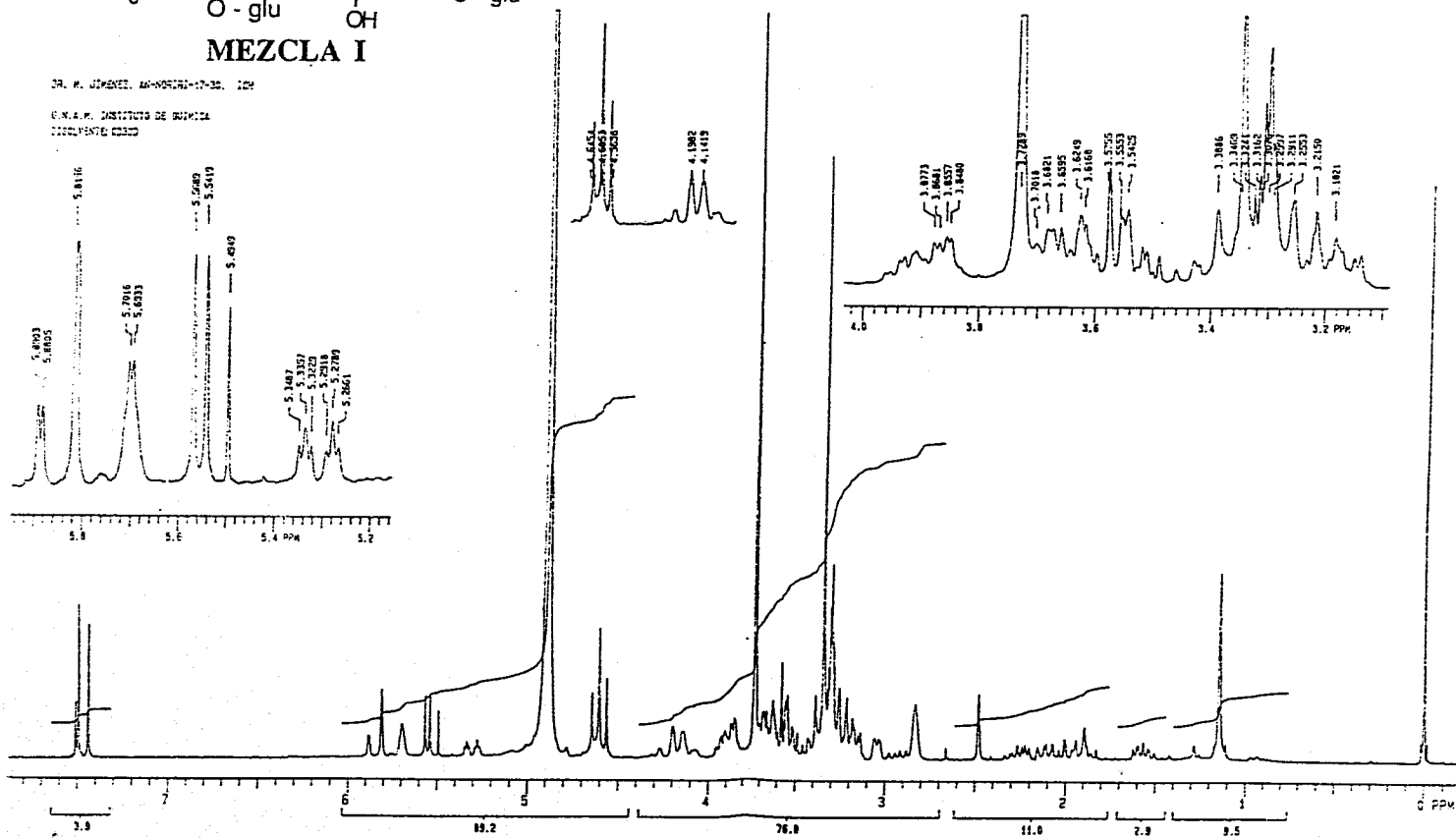


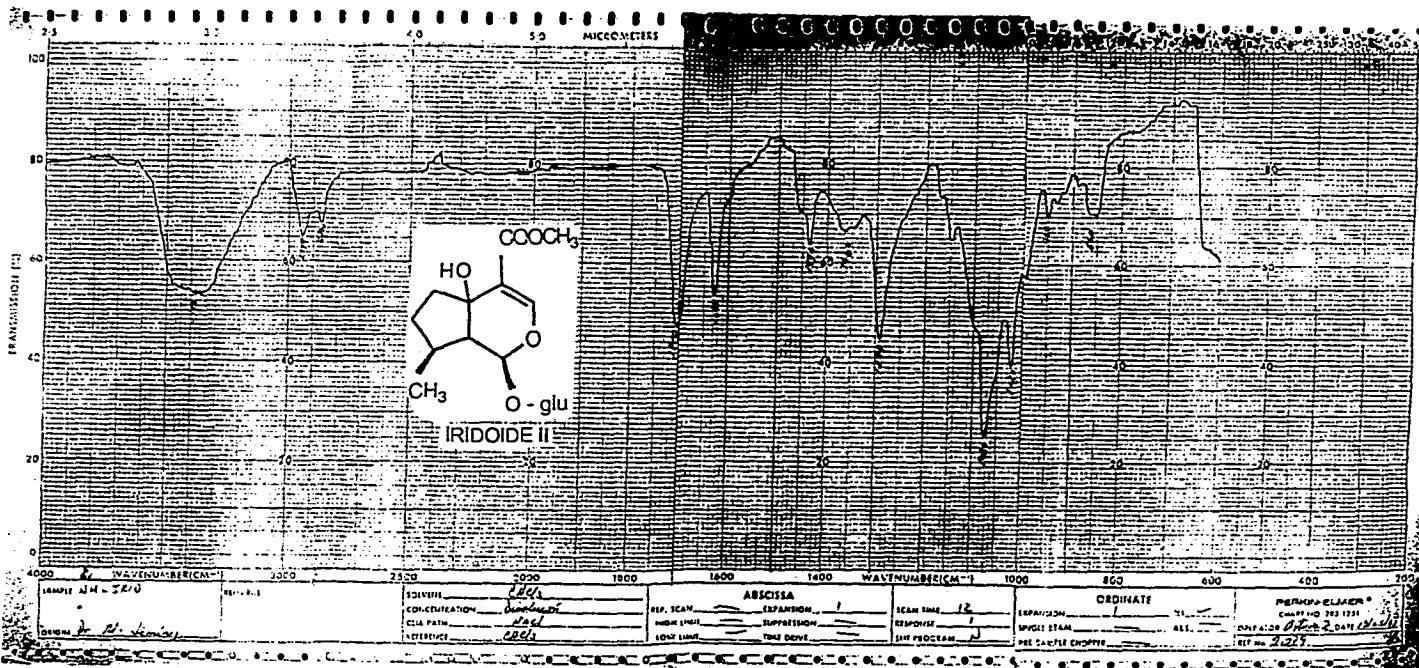
MEZCLA I

DR. R. JIMENEZ, MEXICO-17-55, 129

C.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA
CICLOPENTE: 1030

IR película $\nu = 1706$ (COR) cm^{-1}

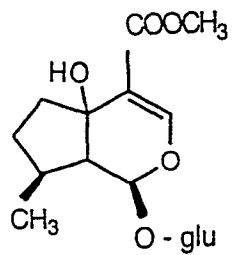




45

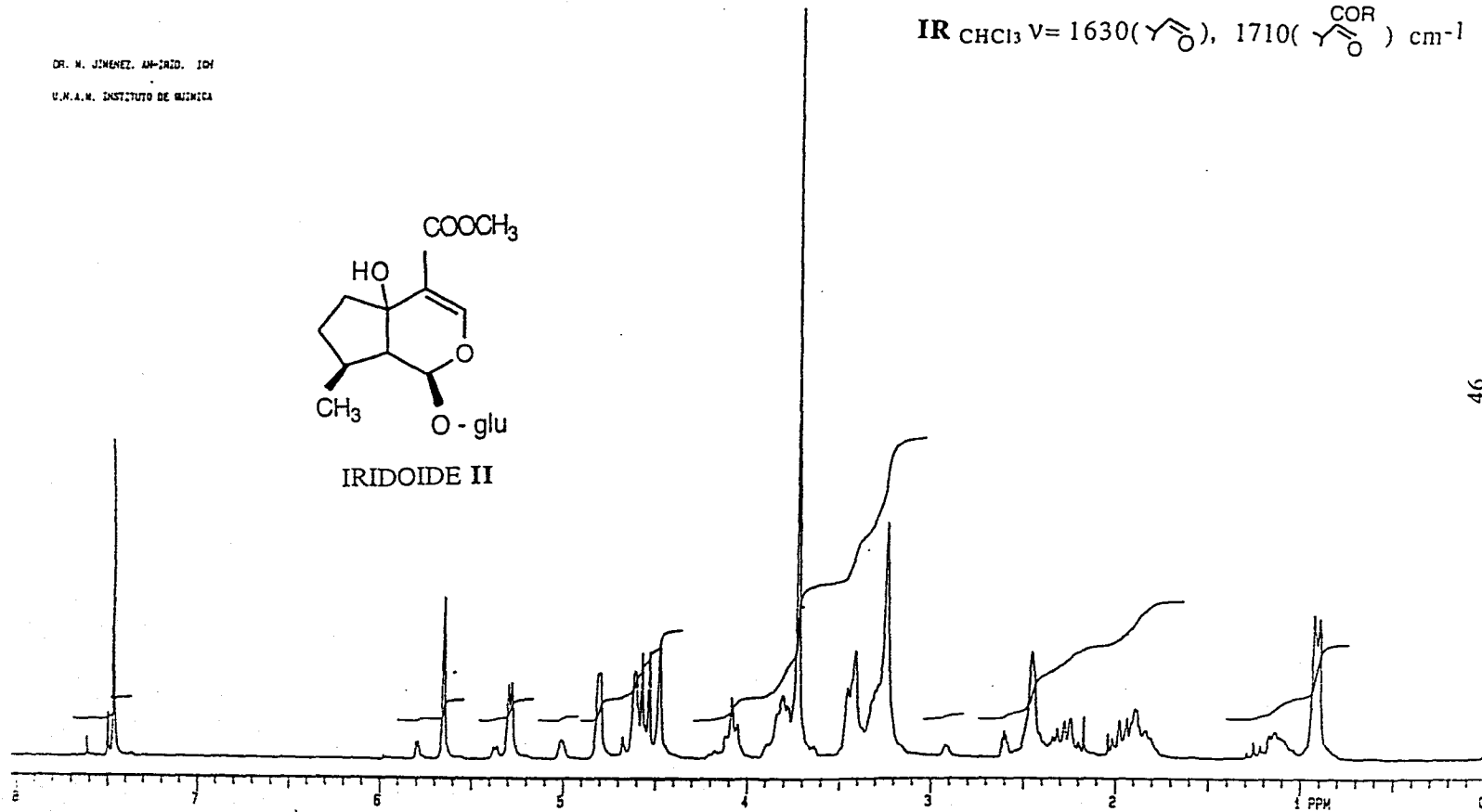
FALLA DE ORIGEN

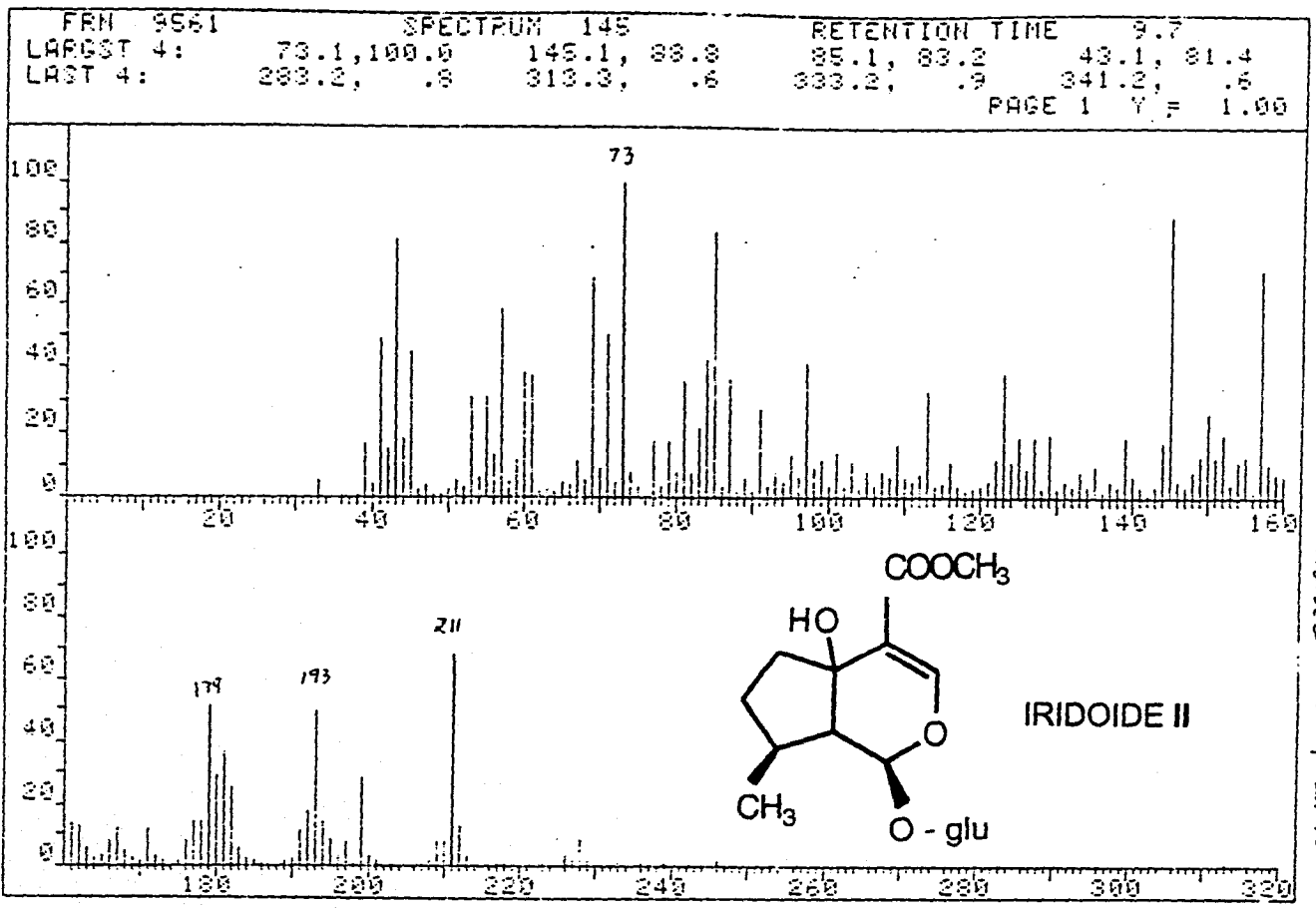
DR. M. JIMENEZ, AM-2820. 104
U.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA



IRIDOIDE II

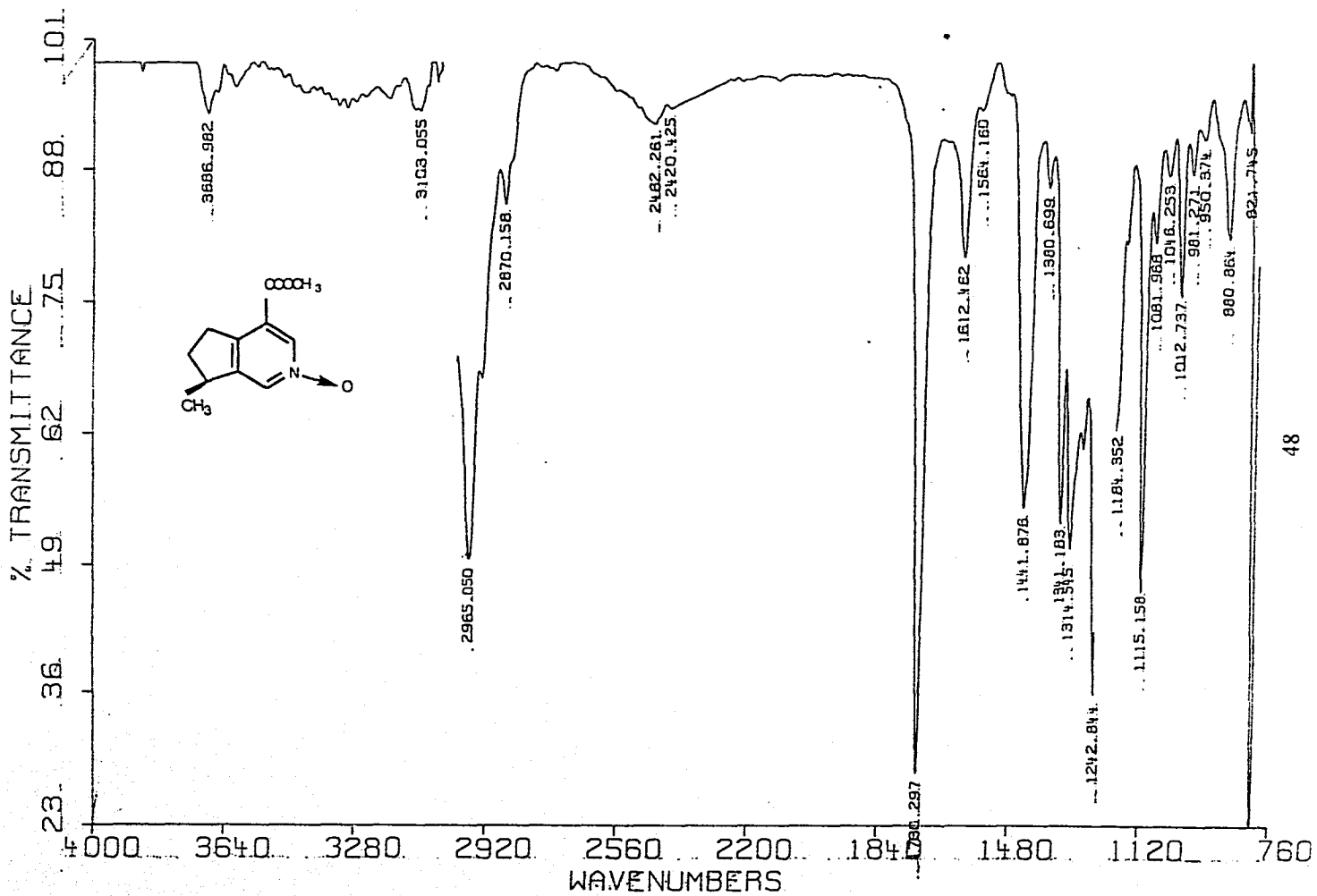
IR CHCl₃ ν = 1630 (C=C), 1710 (C=O) cm⁻¹





FALLA DE ORIGEN

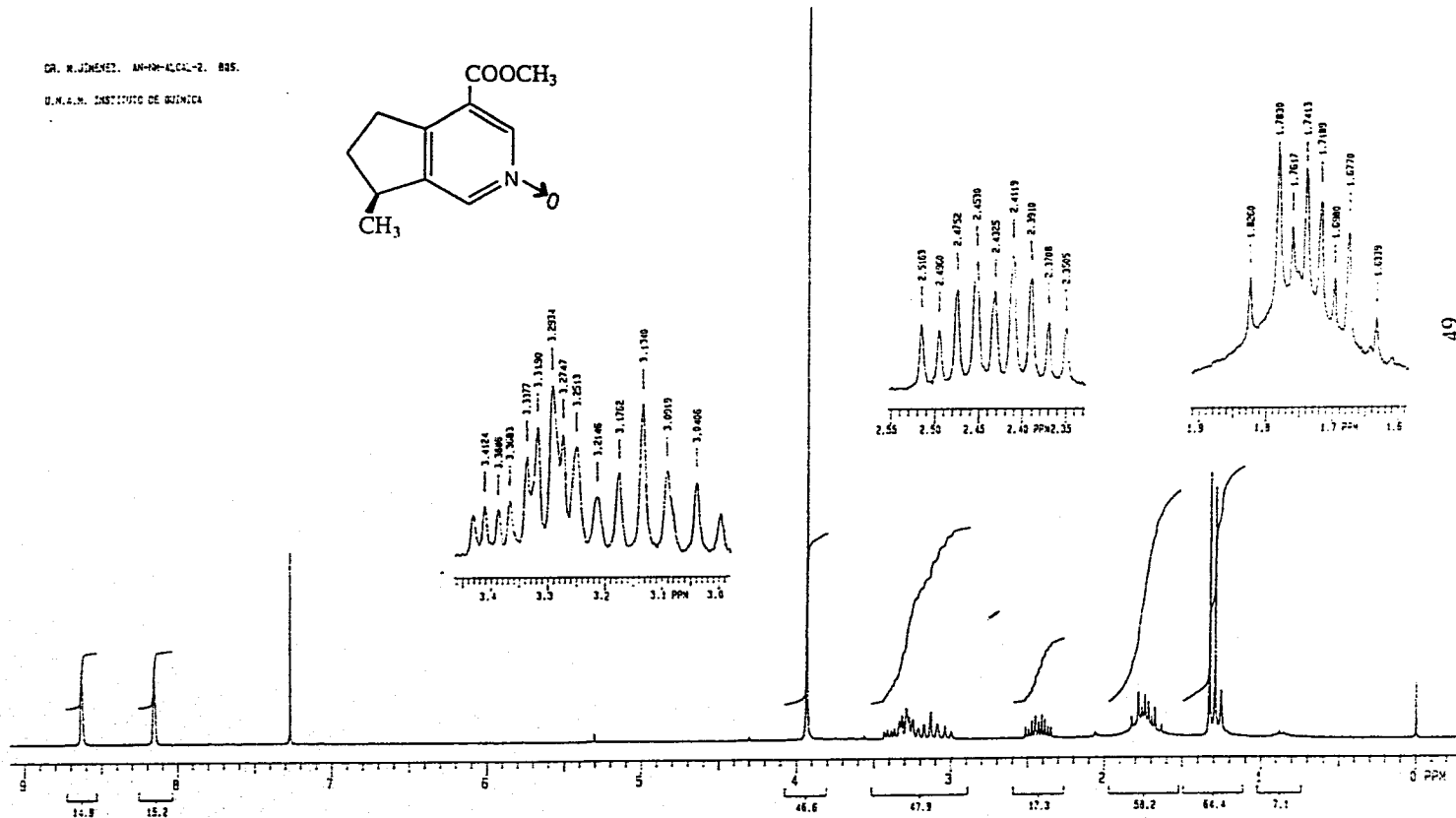
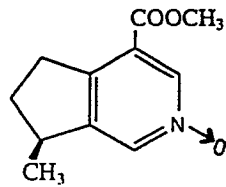
DR. M. JIMENEZ. AN-NM-ALCAL-2. SOL/CHCL3 11/04/94. RPM.



FALLA DE ORIGEN

IR CHCl_3 $\nu = 1612(\text{C}=\text{N}), 1730(\text{C}=\text{O}), 2965(\text{anillo piridínico}) \text{ cm}^{-1}$

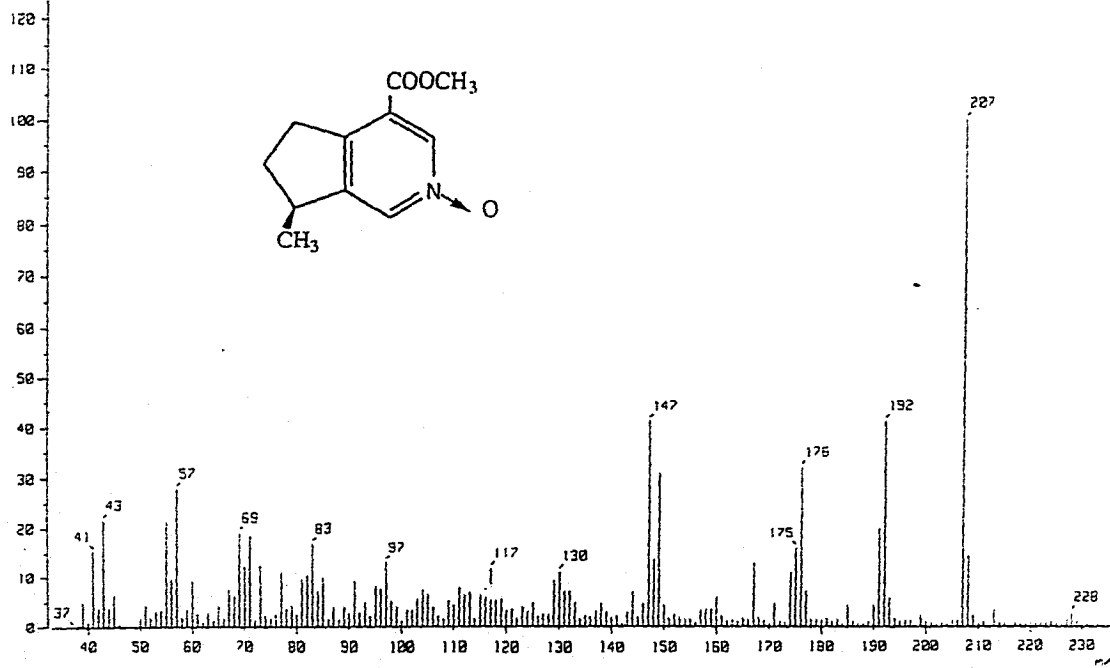
DR. R. JIMÉNEZ. AN-PP-ALCAL-2. 885.
D.M.A.M. INSTITUTO DE QUÍMICA



49

FALLA DE ORIGEN

[Mass Spectrum]
Data : NLM-PN-Alcaloide Date : 05-Jun-95 14:26
Sample : #
Note : Dr-Manuel-J-RX505
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
RT : 0.85 min Scan# : (16,21) Temp : 33.5 deg.C
BP : m/z 207.0000 Int. : 231.36
Output m/z range : 33.0000 to 237.2810 Cut Level : 0.00 %
2997230



FALLA DE ORIGEN

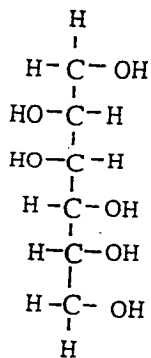
*Mannosyl
dusyantha*

DR. M. JIMENEZ. MM-F-25. 101

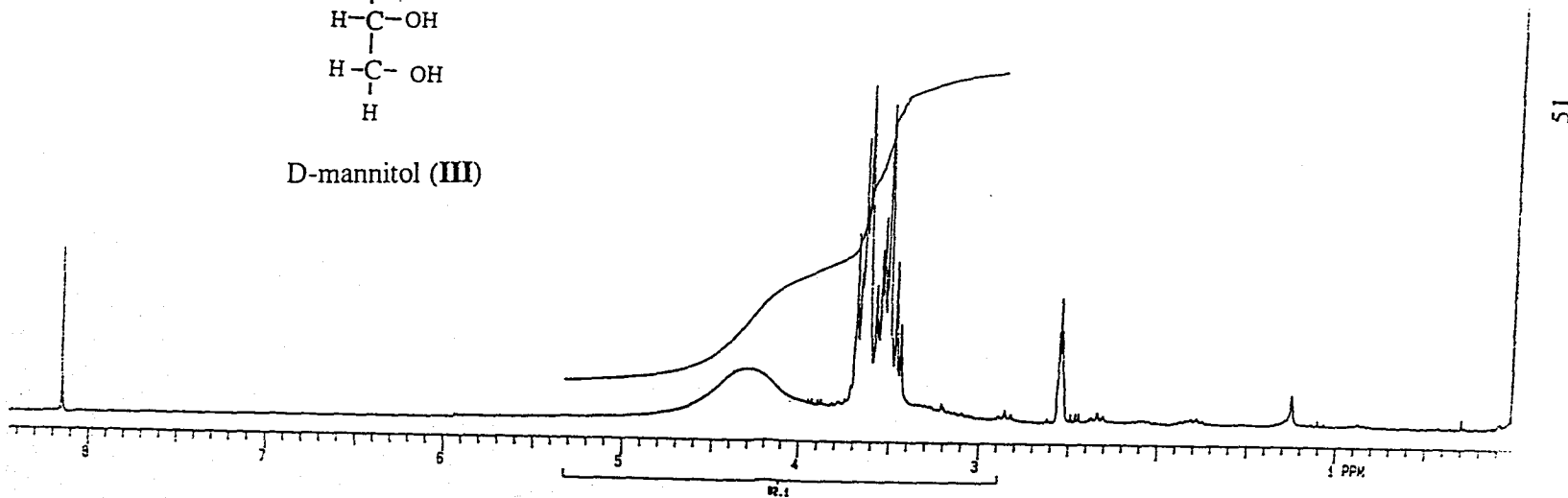
U.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA

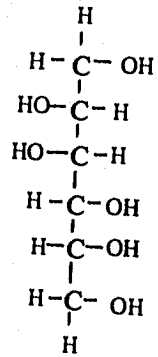
DMF-d₆

IR $\text{KBr } \nu = 1020(\text{C-C}), 1460(\text{C-O}), 2940(\text{C-H}), 3280(\text{O-H}) \text{ cm}^{-1}$

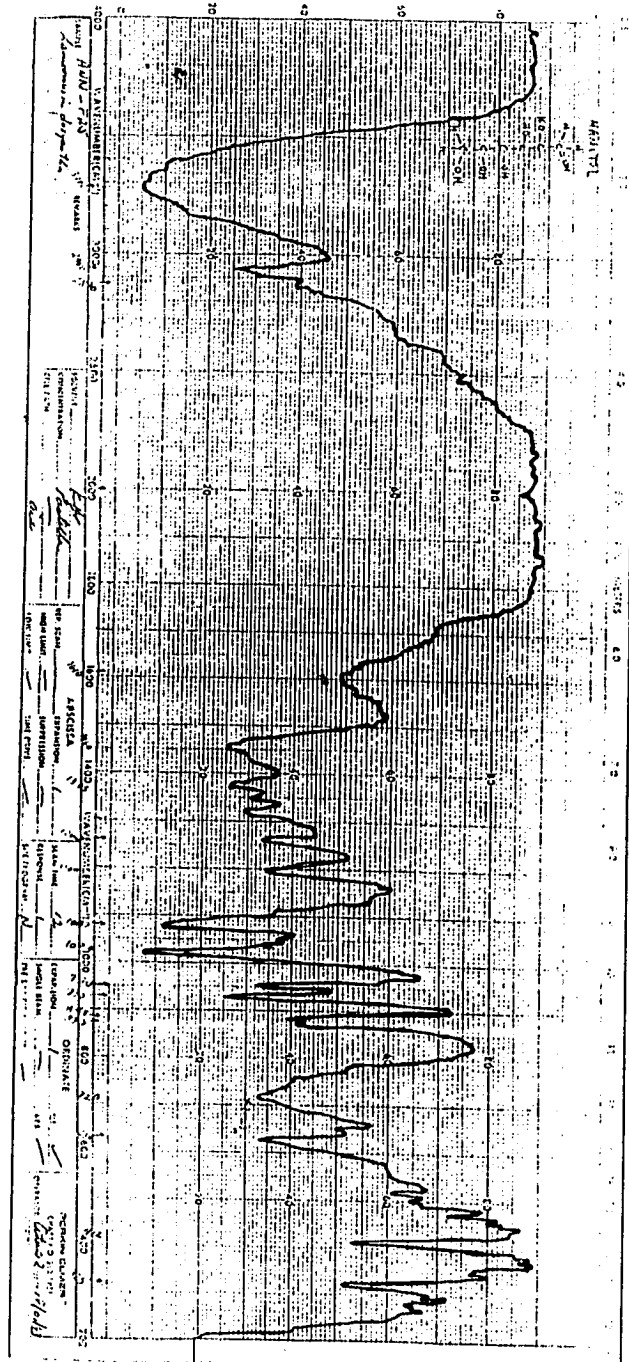


D-mannitol (III)

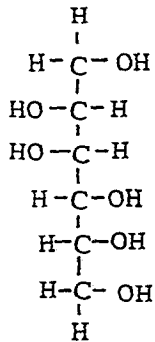




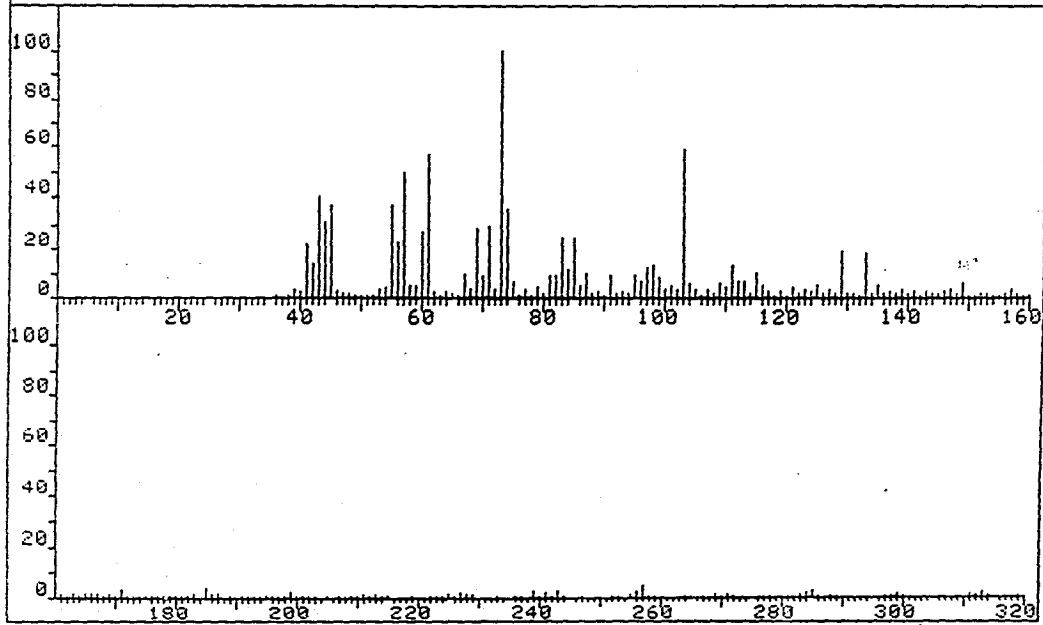
D-mannitol (III)



FRN 9185	SPECTRUM 38	RETENTION TIME 2.6
LARGST 4: 73.1, 100.0	103.0, 59.4	61.1, 56.9
LAST 4: 382.1, .9	383.2, .4	384.2, .4
		57.1, 50.0
		396.0, .6
		PAGE 1 Y = 1.00



D-mannitol (III)



DISCUSION DE RESULTADOS.

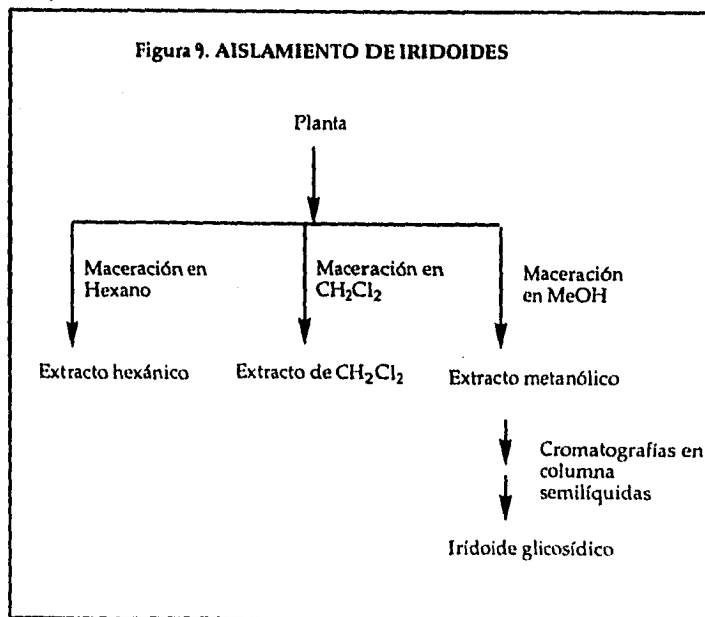
Aislamiento de los iridoïdes.

Como parte de nuestro estudio sistemático de las plantas de la familia Scrophulariaceae de la flora mexicana, se recolectaron varios lotes de *Lamourouxia dasyantha* en los estados de Hidalgo y Oaxaca, con el objeto de hacer un estudio comparativo de su composición química.

Del lote de *Lamourouxia dasyantha* recolectada en la zona montañosa de Oaxaca (al cual denominamos lote 4, L-4) estudiada anteriormente⁵⁰, fue aislado e identificado un iridoïde en cantidades apreciables (iridoïde **II**).

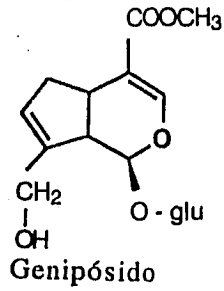
De acuerdo a los objetivos planteados para este trabajo, se localizó el mismo género en el estado de Hidalgo, en las cercanías de Jigüingo (lotes que denominamos como L-1 y L-3) y además en el pueblo de Actopan (lote denominado como L-2) .

Los lotes se trabajaron según se muestra en el esquema general (figura 9) .

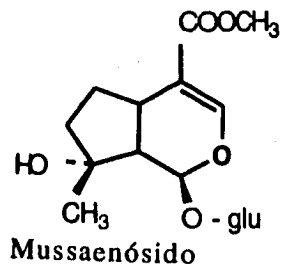


En cada extracto se realizó la detección de iridoides con el reactivo de vainillina, dando prueba positiva sólo el extracto metanólico; en cada uno de los extractos metanólicos se analizaron los componentes principales por c.c.f., revelando con sulfato cérico se observaron manchas azules o moradas que son las coloraciones características de la hidrólisis ácida de los iridoides, *ver anexo uno*. Cada uno de los extractos metanólicos obtenidos de los lotes L-1, L-2 y L-3, se purificaron por cromatografías en columna de SiO₂, de las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH (7:3) quedó un líquido viscoso color café que se purificó por cromatografía en placa preparativa eluyendo tres veces con AcOEt-MeOH (7:3), la franja con R_f = 0.5 se extrajo con metanol quedando un aceite color café que presenta dos manchas en c.c.f. (R_f = 0.44 y R_f = 0.51) eluyendo con AcOEt-MeOH (8:2). En I.R. presenta una señal en 1706 cm⁻¹ correspondiente al grupo carboximetil-enol-eter de los iridoides. En RMN-H¹ se aprecian las señales características para los H-1 (5.7-5.8 ppm), H-3 (7.45-7.5 ppm), H-9 (2.3-2.5 ppm) y COOCH₃ (3.75 ppm); *ver anexo tres*.

Después de analizar detalladamente todos estos datos y de compararlos con los descritos por L. Jiménez El-Naggar ⁵¹, llegamos a la conclusión de que corresponden a los compuestos llamados Genipósido y Mussaenósido:



Átomo de Hidrógeno	ppm
H-1	5.7 d
H-3	7.5 d
H-5	3 a 3.5 s
H-6	2 a 2.3 m
H-7	5.8 a 5.9 m
H-9	2.46 s
H-10	4.15 s
COOCH ₃	3.75 s

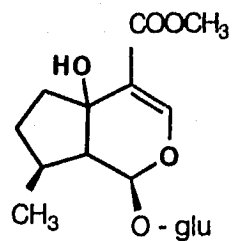


Átomo de Hidrógeno	ppm
H-1	5.81 s
H-3	7.45 s
H-5	2.85 s
H-6 y H-7	1.5 a 2.2 m
H-9	2.3 s
H-10	1.15 s
COOCH ₃	3.75 s

Una vez realizado el trabajo de separación y purificación de los compuestos, logramos establecer por c.c.f., eluyendo con AcOEt-MeOH (8:2), que las señales de los componentes mayoritarios extraídos con metanol son los mismos para los lotes L-1, L-2 y L-3 .

Las señales en c.c.f. para el extracto metanólico del lote L-4 fueron las mismas excepto por la del iridoide **II** ($R_f = 0.5$, AcOEt-MeOH, 8:2) que también revelaba en color azul intenso.

De las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH (9.5-0.5), obtenidas de la separación cromatográfica del lote L-4, se aisló un sólido blanco cristalino con p.f.= 103-105°, $R_f = 0.5$ (AcOEt-MeOH, 8:2), que presenta una señal en IR en 1710 cm^{-1} correspondiente al grupo carboximetil-enol-eter de los iridoides, y en RMN- H^1 aparecen las señales de los hidrógenos H-1(5.8 ppm), H-3(7.4 ppm), H-9(~2.6), COOCH_3 (3.7), y de los de la unidad de glucosa (3.2-4.8 ppm) De acuerdo con lo reportado por A. Méndez⁵⁰ estos datos espectroscópicos corresponden al iridoide **II** , que tiene la siguiente estructura:

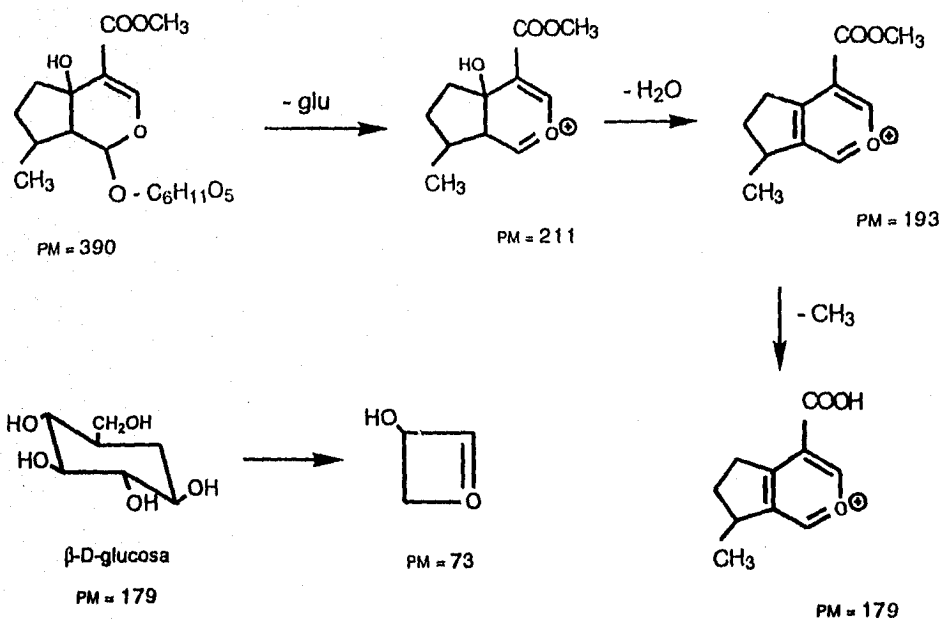


IRIDOIDE II

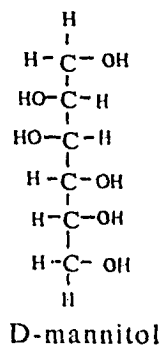
4.04 g (33.6% ,respecto al extracto metanólico)

Atomo de Hidrógeno	ppm
H-1	5.8 d
H-3	7.4 s
H-6	1.9 m
H-7	4.0 m
H-8	2.3 m
H-9	2.6 m
-COOCH ₃	3.75 s
-CH ₃	0.9 d
-OH	5.28 d

De los datos de espectrometría de masas podemos deducir el siguiente patrón de fraccionamiento para el iridoide II, mismo que apoya la validez de la estructura arriba propuesta:



De todos los extractos metanólicos, se aisló también una buena cantidad de D-mannitol (III) a lo largo de los procesos de purificación, con un 1% de rendimiento (respecto al peso seco de la planta). Por lo cual se propone a la especie *Lamourouxia dasyanta* como fuente natural de este azúcar usado en Farmacia como excipiente, saborizante, agente lubricante, en la determinación de boro, en la manufactura de resinas, plastificantes y condensadores electrolíticos y que se obtiene solamente por síntesis o de algas marinas⁵².



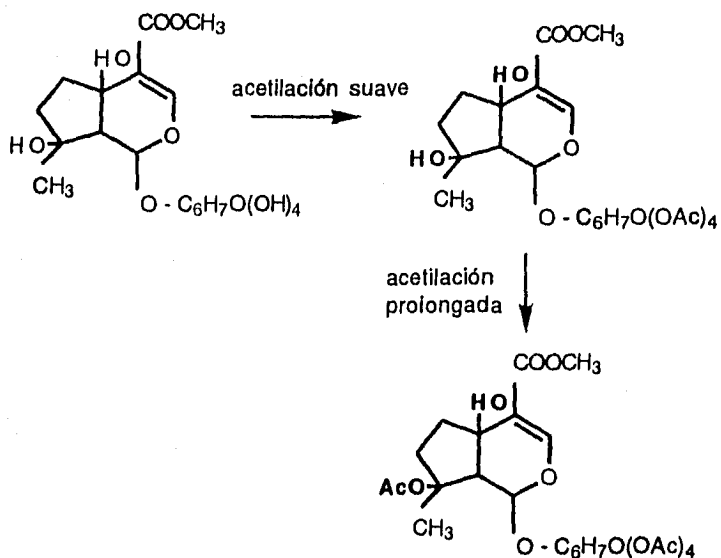
El Genipósido, Mussaenósido, D-mannitol y Acteósido están presentes en los tres lotes de *Lamourouxia dasyantha* colectados en Hidalgo y en el lote colectado en Oaxaca. Este último contiene además al iridoide II en un alto contenido, lo cual nos permitió realizar una serie de experimentos para tratar de transformarlo en productos biológicamente activos.

Purificación de iridoides.

Uno de los métodos de purificación de iridoides más empleados es el de la acetilación con piridina y anhídrido acético, que tiene como finalidad obtener al derivado poliacetilado, de peso molecular mayor y de polaridad menor que el iridoide de partida y que generalmente son productos cristalinos que pueden separarse fácilmente de la mezcla.

En este trabajo, a pesar de que se variaron las condiciones de las acetilaciones (temperatura, cantidad de reactivos, tiempo de reacción), se obtuvieron siempre acetilaciones parciales de acuerdo con los espectros de RMN- H^1 , y con las c.c.f. en las que se apreciaba un número mayor de señales después de acetilar las muestras, es decir, en lugar de simplificar la mezcla problema, se complicaba.

M.L. Scarpati y M. Guiso ⁵³ reportan acetilaciones parciales para el siguiente iridoide:



Lo cual explicaría la obtención de los productos parcialmente acetilados, ya que en los iridoides identificados también hay grupos hidroxilo terciarios.

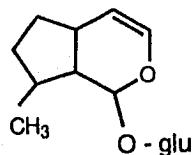
Finalmente, la purificación de los iridoides se realizó con cromatografías en columna de SiO_2 (flash o relámpago, semilíquidas y normales), variando, hasta optimizar, las proporciones entre la cantidad de extracto, la de SiO_2 y el diámetro de la columna de vidrio.

Obtención del aglicón.

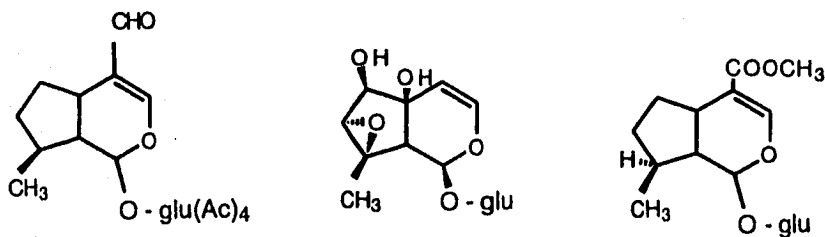
Obtener el aglicón del iridoide II era parte de nuestro interés porque al tenerlo como compuesto estable, es posible realizarle ensayos de actividad biológica ya que la actividad antitumoral, antibiótica o inhibidora del crecimiento vegetal, por ejemplo, sólo se manifiestan después de liberar a la unidad de glucosa de ciertos iridoides. Por otra parte, al establecer una estructura química para tal compuesto, se verificaría la estructura química propuesta para el iridoide de partida.

Para la obtención de aglicones iridoidales se reportan las siguientes metodologías y ejemplos de estructuras químicas que así han sido tratadas:

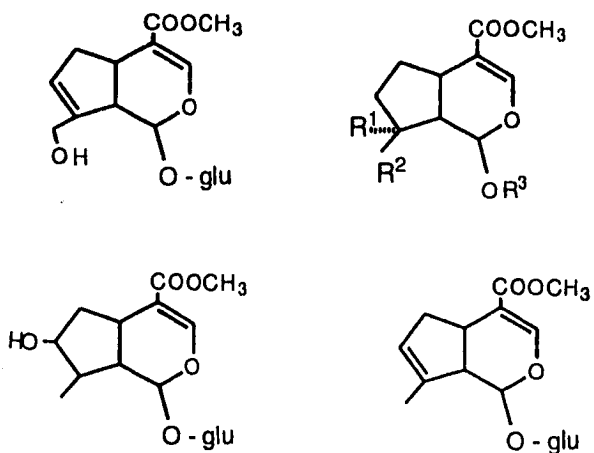
1.- Hidrólisis enzimática con β -glucosidasa 25,37.



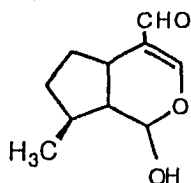
2.- Hidrólisis ácida con H₂SO₄ y HCl 36,38,54.



3.- Hidrólisis ácida modificada con peryodato de sodio³⁸.



4.- Por extracción directa con CH_2Cl_2 de la planta ⁵⁴.



Para la hidrólisis ácida, otro de nuestros objetivos fue encontrar un método que comprendiera pocos pasos, así que empleamos un método químico y no enzimático como se reporta en la gran mayoría de los artículos consultados. Además, ya que los aglicones obtenidos por hidrólisis con ácidos minerales se reportan como compuestos estables, por presentar un grupo electro-atractor, se hidrolizó al iridoide **II** con HCl diluído pero no se obtuvo al aglucón correspondiente.

M. Tanaka y M. Kigawa reportan un método químico de hidrólisis menos agresivo que aquellos que utilizan sólo ácidos minerales, en el que se hacen reaccionar una disolución acuosa del iridoide con peryodato de sodio, después se adiciona borohidruro de sodio con lo que se rompe la rigidez conformacional de la molécula de glucosa unida al iridoide, por último se agrega HCl 6M y la hidrólisis ácida se lleva a cabo rápidamente en condiciones relativamente suaves. Finalmente recomiendan extraer al aglucón con éter etílico. Se procedió de igual forma con el iridoide **II**, concentramos la fase orgánica y por c.c.f. se observaron varias manchas de los productos de degradación del iridoide, que por RMN- H^1 no generan las señales que se esperarían para el aglucón correspondiente.

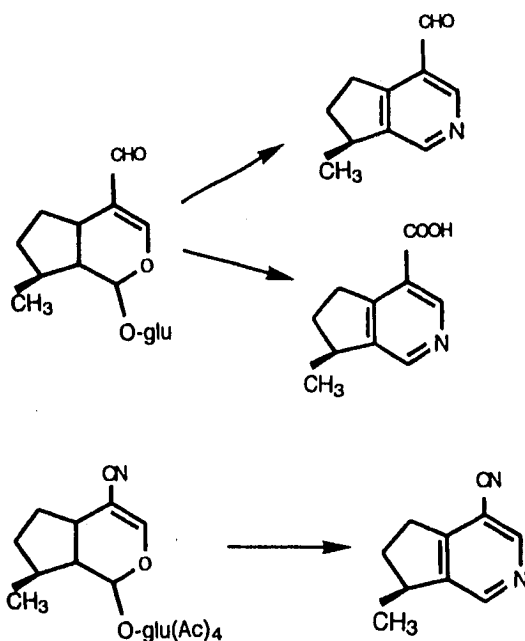
Obtención del alcaloide monoterpeno-piridínico.

Sintetizar un alcaloide de este tipo, tiene relevancia en el estudio de la relación biosintética entre los iridoide y los alcaloides y para realizar estudios de actividad biológica en el iridoide, por un lado, y en su alcaloide derivado por el otro, para elucidar a quién debe atribuírse la

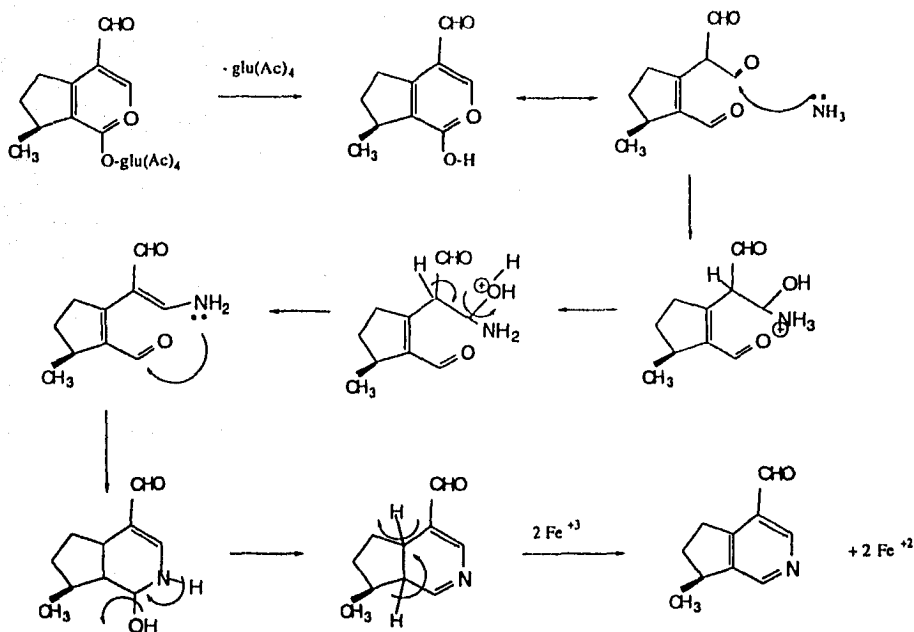
actividad biológica tan diversa encontrada en las especies vegetales que los contienen.

Para la síntesis del alcaloide monoterpino-piridínico partimos del iridoide **II**,

teniendo como antecedentes que con NH_3 (g) no se logra obtener al alcaloide, pero sí utilizando sulfato férrico-amoniacal o sulfato cúprico-amoniacal con los cuales Arturo Navarro⁵⁴ obtuvo rendimientos del 44% y 20%, respectivamente para los siguientes alcaloides:



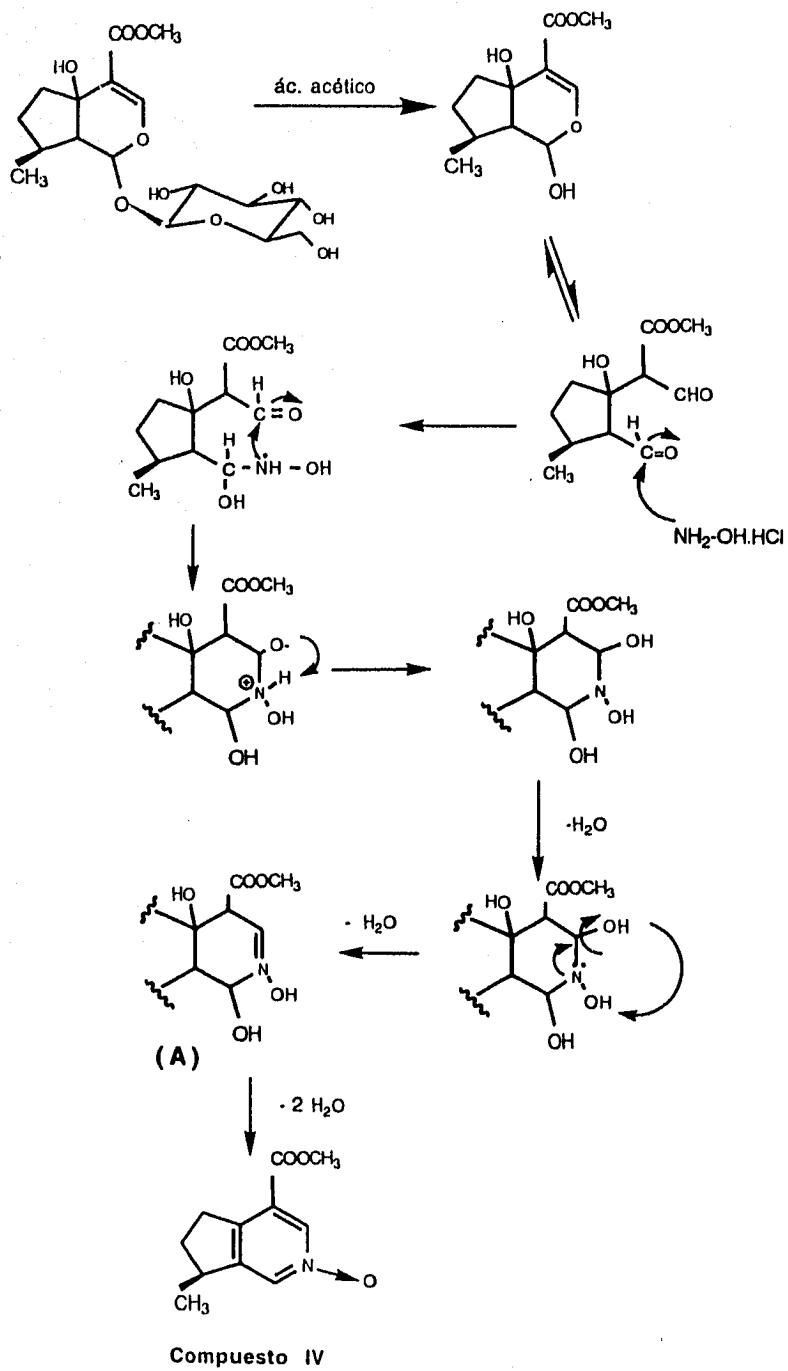
Como en el iridoide **II** hay un grupo hidroxilo en C-5, la aromatización del anillo de seis miembros sucedería sin necesidad de una reacción redox, como sucede cuando el Boschnalósido se hace reaccionar con sales férrico-amoniacales, según se ilustra con el siguiente mecanismo:



sino mediante deshidrataciones, se decidió utilizar clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético, como condiciones de reacción para sintetizar este tipo de alcaloides.

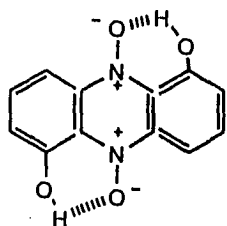
Como resultado de esta síntesis, no obtenemos al alcaloide sino a su N-óxido que es un sólido color amarillo que da prueba positiva con el reactivo de Dragendorff, el cual identificamos como el compuesto IV. En los datos de espectrometría de masas aparece la señal del ion molecular en 207, que se explica con la presencia de un átomo de oxígeno más que está unido al átomo de Nitrógeno porque en RMN- ^1H se observan todos los protones esperados para el sistema.

El mecanismo probable es:



Al parecer, se favorece la síntesis del N-óxido por la formación del intermediario A, este tipo de intermediarios (oximas) son los que se reportan en la preparación de N-óxidos por reacciones de ciclización con hidroxilamina, y que resultan del ataque nucleofílico de la hidroxilamina sobre un grupo carbonilo en el compuesto, para que posteriormente la oxima induzca la ciclización y la aromatización del anillo piridínico.

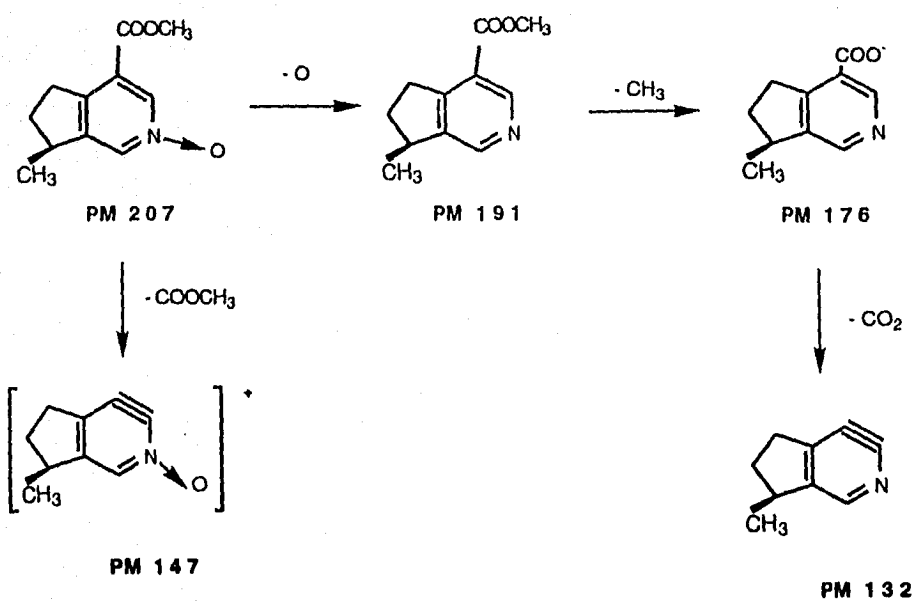
Investigando sobre la ocurrencia natural y la actividad biológica de los N-óxidos encontramos que relativamente son pocos los N-óxidos de heterociclos aromáticos que existen en la naturaleza y que la mayoría de los N-óxidos de alcaloides extraídos de plantas presentan una estabilización por puentes de hidrógeno:



IODININA

Antibiótico potente

De los datos de espectrometría de masas podemos deducir el siguiente patrón de fraccionamiento para el N-óxido del alcaloide (IV), mismo que apoya la validez de la estructura propuesta para dicho compuesto:



Se sabe además que ciertos alcaloides son menos tóxicos estando como N-óxidos sin que por ello se vea afectada su actividad biológica, por lo cual podría preferirse al N-óxido en lugar del alcaloide en ciertos tratamientos, por ejemplo.

La actividad fisiológica reportada para este tipo de compuestos sintéticos es como antibióticos, fungistáticos, mutagénicos, oncogénicos, carcinostáticos, sedativos y anticonvulsionantes. Además, presentan propiedades catalíticas en diversas reacciones.

Cabe mencionar que ésta es la primera vez que se reporta la síntesis de N-óxidos de alcaloides monoterpeno-piridínicos haciendo reaccionar iridoides glucosídicos con clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético glacial, en la bibliografía revisada se reporta que bajo las mismas condiciones experimentales, sólo se obtienen alcaloides piridínicos .

Chumakov y Sherstyuk⁴⁹ reportan la obtención de anillos piridínicos haciendo reaccionar compuestos 1,5-dicarbonílicos (que es el caso de

la estructura dialdehídica de los iridoides) con hidroxilamina en ácido acético glacial,, nosotros encontramos que partiendo de iridoides con un grupo metil ester como sustituyente en el C-4 y un hidroxilo en la posición C-5, es posible obtener el N-óxido del alcaloide monoterpénico correspondiente. Incluso pudieran obtenerse los mismos resultados teniendo como materia prima un iridoide glicosídico con grupos electro-atractores en las posiciones C-4 y C-5.

CONCLUSIONES

◇ Fueron aislados, caracterizados y cuantificados los iridoideos en las muestras analizadas de *Lamourouxia dasyantha* colectadas en Actopan (Hidalgo) y en Yanhuitlán (Oaxaca), encontrándose que difieren en su contenido de iridoideos glucosídicos.

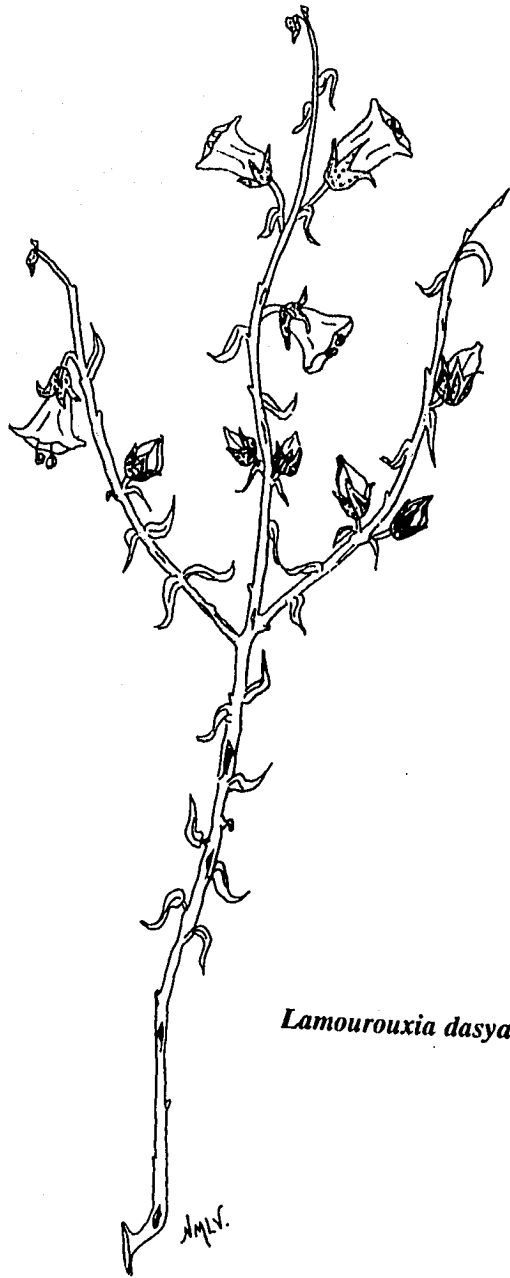
◇ La planta proveniente de Actopan contiene al Genipósido y al Mussaenósido en bajas cantidades (0.001%). En la de Yanhuitlán también se encontraron esos iridoideos pero además al (1S)-1-O-glc-4-carboximetil-5-hidroxi-3-irideno (iridoide II), este último en mayor cantidad (0.3%), por lo cual pudo utilizarse como materia prima quiral.

◇ El D-mannitol y el acteósido están presentes en ambas muestras de *Lamourouxia dasyantha*.

◇ No se obtuvo el aglucón del iridoide II ni al hidrolizarlo con HCl diluído, ni mediante la hidrólisis con $\text{NaIO}_4/\text{NaBH}_4/\text{HCl}$ a temperatura ambiente (condición reportada como más suave que la hidrólisis con un ácido mineral). Por lo tanto, la síntesis del alcaloide no se realizó a partir de un aglucon aislado sino generándolo insitu.

◇ Haciendo reaccionar un iridoide glucosídico, que tiene un grupo metil ester como sustituyente en el C-4, un hidroxilo en el C-5 y un metilo en el C-8, con clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético glacial se obtuvo el N-óxido del alcaloide monoterpeno-piridínico (compuesto IV). A pesar de que se le obtuvo con un bajo rendimiento (10 %) fue un hallazgo interesante ya que lo esperado era solamente un alcaloide monoterpeno-piridínico. En el N-óxido se conservó el centro quiral de la molécula de partida (C-8).

◇ La especie *Lamourouxia dasyantha* es una buena fuente de D-mannitol, hecho que sugiere la posibilidad de utilizarlo como materia prima en otro tipo de síntesis.



Lamourouxia dasyantha

ANEXOS

ANEXO UNO: AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE IRIDOIDES.

Usualmente se les aísla de los aceites obtenidos por arrastre de vapor o maceración en diversos disolventes.

Se han aislado iridoides de todos los tipos de tejidos vegetales, pero especialmente de hojas y tronco, también se les ha aislado de ciertos insectos, microorganismos y artrópodos. ⁹ .¹⁰

Su obtención presenta algunos problemas porque los iridoides son compuestos poco estables; se descomponen fácilmente en medio ácido o en presencia de enzimas, se hidrolizan y oxidan rápidamente obteniéndose productos de hidrólisis coloridos o incoloros.

Es importante la detección de iridoides antes de comenzar con su aislamiento, para prevenir todo el trabajo que implica su separación y purificación.

Se recomienda, primero, seleccionar el material vegetal de acuerdo a su composición quimiotaxonómica para luego hacer ensayos a los extractos con reactivos especiales para iridoides y decidir qué planta contiene el mayor número y/o concentración de iridoides.

Existen varios reactivos específicos para la detección de iridoides glicosídicos en cromatografía en papel ^{8,11}:

- Vainillina en HCl y metanol.
- p-anisidina en H₃PO₄ y etanol.
- SbCl₃ en cloroformo.
- H₂SO₄ 2N en metanol.
- Anisaldehído al 5% y H₂SO₄ al 5% en etanol.
- CCl₃COOH al 5% en metanol.
- Benzidina y CH₃COOH en etanol absoluto.
- Urea y HCl 2N en etanol.
- Glutamato monosódico acuoso al 10%.

Y para su detección en cromatografía en capa fina: H₂SO₄, 1M ó 2N y sulfato cérico en H₂SO₄.

Todos los métodos involucran la hidrólisis ácida del glicósido iridoidal con lo que se obtienen compuestos de degradación que al reaccionar con las sustancias arriba mencionadas dan compuestos coloridos.⁸

De todos los reactivos reveladores anteriores, aquellos que contienen una disolución alcohólica ácida de un aldehído aromático son los más usados por ser los más selectivos y con los que se consiguen colores más brillantes en comparación con aquellos reveladores que sólo contienen un ácido.⁸

ANEXO DOS: METODOLOGIA Y TECNICAS DEL AISLAMIENTO DE IRIDOIDES

Generalmente, se comienza por extraer a los compuestos iridoidales de las plantas en donde se detectaron. La extracción se realiza con etanol acuoso o metanol a temperatura ambiente. Deben evitarse las técnicas de extracción que involucren agua o aplicación de calor porque puede afectarse la estabilidad de los iridoides.

Además, se recomienda trabajar con material vegetal fresco porque los glicósidos iridoidales se degradan parcialmente después de someter las plantas a procesos de secado, con lo que se ocasiona un descenso considerable en la concentración de iridoides en la planta a estudiar.

Después, se realiza una purificación preliminar para quitar sustancias de polaridad similar a los iridoides como por ejemplo: fenoles, taninos, flavonoides glucosídicos, diterpenos ácidos, etc.

En la bibliografía se mencionan al menos tres métodos de eliminación de sustancias de carácter polar que interfieren en el proceso de separación de iridoides: Uno es con acetato de Plomo para precipitar flavonoides y taninos, es un método tóxico; otro es con filtraciones por óxido de Aluminio neutro (Al_2O_3), que no es recomendable cuando estén presentes iridoides esterificados con una estructura aromática, y finalmente otro en el que se usan filtraciones através de carbón activado, requiere de más tiempo y atención que los otros dos pero es el más recomendado¹².

Para la separación de mezclas de compuestos iridoidales existen varias técnicas, cada una con ventajas y desventajas dependiendo de la sensibilidad de los compuestos por separar, del tiempo que requieren y del costo y accesibilidad para el investigador. Algunas de las técnicas empleadas son:

Cromatografía en columna.

Es la técnica más empleada. Consiste en tener un soporte sólido adecuado (sílice, alúmina, celita, carbón activado, celulosa, etc.) en una columna de vidrio, un sistema eluyente (que puede ser uno o varios disolventes) y aplicar uniformemente la muestra. Se recomienda tomar en cuenta ciertas proporciones entre la cantidad de muestra aplicada, la cantidad de soporte sólido y el largo y el diámetro de la columna de vidrio, para conseguir una mejor separación.¹³

Para su aplicación, la muestra puede estar disuelta o absorbida en un material inerte (por ejemplo celita).

El flujo del eluyente puede efectuarse por acción de la gravedad, por succión con un sistema de vacío o aplicando una corriente de aire por la parte superior de la columna.

Este método no es específico para compuestos polares y usualmente requiere de mucho tiempo y para lograr una buena separación, se necesitan cromatografías en columna sucesivas.

Distribución a contracorriente. (CCD)

Este método se basa en los diferentes coeficientes de partición de los solutos en los sistemas disolventes formados por dos fases no miscibles. Tiene la ventaja de no necesitar una fase estacionaria sólida con lo cual disminuye el riesgo de la degradación de los compuestos iridoidales durante la separación, sin embargo muy pocos laboratorios lo tienen.

Cromatografía a contracorriente por goteo.(DCCD)

Gotas de la fase móvil pasan a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La separación se basa en los diferentes coeficientes de partición de los solutos respecto de la fase estacionaria. Es un método lento y muy costoso.

Cromatografía líquida de alta resolución, en fase reversa. (HPLC)

Se logran separaciones eficientes en poco tiempo, usando pequeñas cantidades de disolvente y con una buena resolución; sin embargo, se requiere de purificaciones preliminares de la muestra para no contaminar las columnas preparativas.¹⁴

Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

Se trabaja con placas delgadas de vidrio recubiertas de una capa muy fina de SiO₂, se eluyen colocándolas horizontalmente dentro de una cámara que contiene al eluyente. Es un método rápido, se consigue buena resolución pero se trabaja con cantidades muy pequeñas de muestra cada vez y las placas son caras.

Además están técnicas como la cromatografía en papel y en placas preparativas, para cantidades de muestra entre 50 y 500 mg.

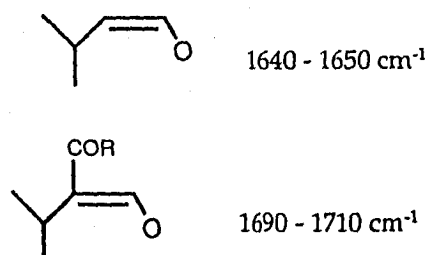
ANEXO TRES: ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DE IRIDOIDES POR METODOS ESPECTROSCOPICOS.

Radiación ultravioleta.

El único cromóforo presente en el esqueleto iridoidal básico, es el doble enlace entre C3 y C4, que si está conjugado con un grupo funcional oxigenado en C11, presenta una absorción máxima a 230 nm (log $\epsilon = 4$).

Infrarrojo.

Se tienen dos señales relevantes:

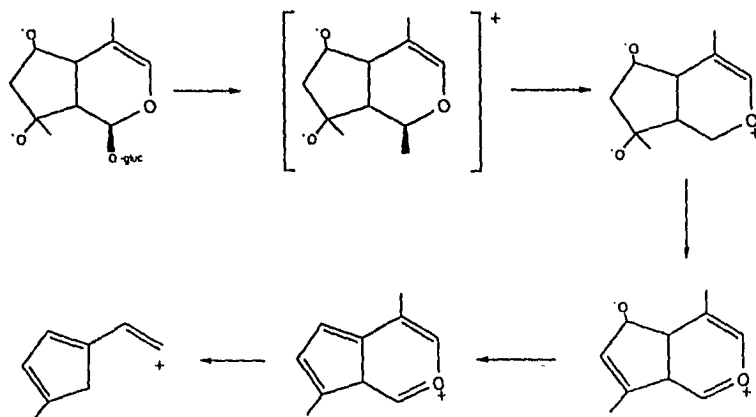


Espectrometría de masas.

Usualmente la señal del ion molecular no aparece en los espectros y si aparece es una señal muy pequeña.

Los picos principales se asignan a la fragmentación del aglucón, una vez descartadas las señales de la(s) unidad(es) de azúcar.

Una fragmentación típica es la siguiente:



Resonancia Magnética Nuclear.

El gran avance en el aislamiento de nuevos compuestos de este tipo ha incrementado notablemente los datos espectroscópicos de RMN (de ^1H y ^{13}C)

para iridoides. De hecho, conociendo los datos reportados en la bibliografía a veces es posible asignar por completo una estructura. Para este análisis espectroscópico se requieren productos de alta pureza para obtener espectros claros.¹²

ANEXO CUATRO: DETECCIÓN Y PURIFICACION DE ALCALOIDES.

Con los reactivos que se reportan para la detección de alcaloides se obtienen compuestos coloridos que indican la presencia del alcaloide, aunque algunas reacciones son positivas también para proteínas, purinas, cumarinas y ciertos polifenoles.

Se emplean disoluciones acuosas ligeramente ácidas (se acidifica con HCl 1N) del extracto en donde se pretende identificar alcaloides y se adicionan 2 ó 3 gotas de cualquiera de los siguientes reactivos: (ciertos alcaloides son muy solubles al agregar un exceso de estos reactivos).

REACTIVO	OBSERVACIONES
Mayer	Prueba + si aparece un precipitado blanco.
Dragendorff	Prueba + si aparece un precipitado café.
Bouchardat	Prueba + si aparece un precipitado blanco.
Munier	Prueba + si aparece una disolución roja, estable al menos por 24 hrs.
Yodoplatinato de potasio	Prueba + si aparece una disolución azul, violeta o café.

Los alcaloides pueden purificarse si se les convierte en alguno de sus derivados; por ejemplo, los alcaloides forman precipitados insolubles al reaccionar con disoluciones de tiocianato de potasio, ácido pícrico, nitrito de sodio, ácido cloroplátnico, ácido oxálico, tetrafenilboronato de sodio y perclorato de sodio. Estos derivados se purifican por recristalización hasta punto de fusión constante y finalmente se libera al alcaloide de su compuesto derivado.⁴³

BIBLIOGRAFIA

- 1 J.G.Ordaz González. "Estudio fitoquímico de Lamourouxia Multifida H.B.K." Tesis de Licenciatura, Puebla, 1989.
- 2 E. Davini. *Research Paper*, 41.
- 3 J.M. Brown and S. G. Davies. *Nature*. 1989, 342, 631.
- 4 E. Juaristi. *Introducción a la Estereoquímica y al Análisis Conformacional*. México, 1989 , capítulo 7.
- 5 E. Juaristi. *Avance y Perspectiva*.1992, 11, 267.
- 6 H.G. Cutler, editor. *Biologically Active Natural Products. potencial use in Agriculture*. American Chemical Society, Washington,D.C., 1988, 397-402.
- 7 L. J. El-Naggar and J. L. Beal. *J. Natural Products*. 1980, 43, 649.
- 8 A. Bianco. *Studies in Natural Products Chemistry*. Atta-ur-Rahman,editor. Elsevier, The Netherlands, 1990, vol. 7, 439-497.
- 9 M. Lorenz, W. Boland y K. Dettner. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 912-914.
- 10 D.V. Banthorpe, B.V. Charlwood y M.J.O. Francis. *Chemical Reviews*, 1972, 72, 115-144.
- 11 S. Pieretti, M. Nicoletti, S. Foddai y A. Bianco. *Rev. Latinoamer. Quím.* 22/1, 1991, 35-36.
- 12 M. Nicoletti. *Rev. Latinoamer. Quím. Suppl. I*. 1989, 131-159.
- 13 C. Morin. *J. Chem. Educ.* 1988, 65, 903-904.
- 14 K. Hostettmann, M. Hostettmann, A. Marston. *Preparative Chromatography Techniques*. Springer-Verlag, Rep. Demócrata Alemana, 1986
- 15 T. Hasegawa. *Chem. Abs.*,1982, 96, 31865.
- 16 H. Inouye, R. Toyama.*Chem. Abs.*,1979, 91, 173683.
- 17 H. Inouye, T. Yoshida, S. Tobita, K. Tanaka y T. Nishioka. *Tetrahedron Lett.* 2459, 1970
- 18 A. Romo de Vivar. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*, 59-62, Editorial LIMUSA, México, 1985.
- 19 R.B. Herbert. *The biosynthesis of secondary metabolites*, 31, 63-65, editorial Chapman and Hall, 2a edición, Gran Bretaña, 1989.
- 20 S. Uesato *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 4431.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 21 C.Glidewell *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 267-269.
- 22 S. Uesato. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4431.
- 23 G.W. Dawson y D.C. Griffiths. *Nature* ,**1987** ,325, 614.
- 24 C.C.Chiang, K.Nakanishi. *J.Chem.Soc.Chem.Com.*
1983,605.
- 25 E. Davini, C. Iavarone, C. Trogoló, P. Aureli y B. Pasolini.
Phytochem. **1986**, 25, 2420-2422.
- 26 *Dictionary of Organic Compounds*. 5a edición, Suplemento
2, Chapman and Hall, Gran Bretaña, **1984**, 412.
- 27 H. Wagner and P. Wolff. *New Natural Products and Plant
Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical
Activity*. Springer-Verlag, Berlin, **1977**, 147-156.
- 28 C.A. [32268 j], **1985**, vol. 102.
- 29 A. Holste. *Chem. Abs.* 13, 2088 (1919).
- 30 W.H. Tallent. *Tetrahedron*, **1964**, 20, 1781.
- 31 Isiguro and Yamaki. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 2375.
- 32 Ma.del C. Recio, R.M. Giner, S. Mániez, y J.L. Ríos. *Planta
Med.* **1994**, 60, 232-234.
- 33 A. Franke, H. Rimpler y D. Schneider. *Phytochem.* **1987**, 26,
103-106.
- 34 M.R. Roby y F.R. Stermitz. *Journal of Nat. Prod.* **1984**, 47,
854-857.
- 35 T. Endo and H. Taguchi. *Chem.Pharm.Bull.* **1973**, 21,
2684.
- 36 N.V.Handjieva, E.I.Ilieva, etal. *Tetrahedron*, **1993**, 49,
9261.
- 37 F. Murai and M. Tagawa. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**,
28,1730.
- 38 M. Tanaka, M. Kigawa, et al. *Heterocycles.* **1991**, 32, 1451-
1454.
- 39 E. Wenkert. *J. Am. Chem. Soc.* ,**1962**, 84, 98.
- 40 N.K. Hart, S.R. Johns y J.A. Lamberton *Aust. J. Chem.* **1969**,
22, 1283.
- 41 R.H.F. Manske, editor "The Alkaloids. Chemistry and
Physiology" Academic Press Inc. U.S.A., **1977**, 16, 431-510.
- 42 G.R. Newkome, editor. Serie *Heterocyclic compounds*, Vol.
14, parte 5: "Pyridine and its derivatives". John Wiley and
Sons, U.S.A.,**1984**.
- 43 B. Maldoni. *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 700-703.

- 44 G. R. Newkome, editor. Serie Heterocyclic compounds. Vol 14, parte 5, *Pyridine and its derivatives*. John Wiley and Sons, U.S.A., 1984, 14-15.
- 45 S.B. Hyeon. *Tetrahedron Lett.* 1968, 5325.
- 46 S.S. Popov, N.L. Marekov y T.N. Do *Journal of Nat. Prod.* 1988, 51 (4), 765-768.
- 47 G.W.K. Cavill y A. Zettlin *Aust. Journal of Chem.* 1967, 20, 349-357
- 48 G.W.K. Cavill, D.L. Ford y D.H. Solomon *Aust. Journal of Chem.* 1960, 13, 469-472.
- 49 Y.I. Chumakov y V.P. Sherstyuk. *Tetrahedron Lett.*, 1965, 2, 129-135.
- 50 A. Méndez Pérez. " Estudio fitoquímico de *Lamourouxia dasyantha*" Tesis de Licenciatura, ENEP Zaragoza, 1988.
- 51 L. Jiménez El-Naggar " Iridoid glycosides from *Mentzelia decapetala*" Tesis doctoral, Ohio, 1980.
- 52 The Merck Index
- 53 M.L. Scarpati y M. Guiso *Gazz.Chim. Ital.* 1969, 99, 1150-1166.
- 54 A. Navarro Ocaña. "Empleo de los productos naturales como fuente de intermediarios sintéticos (Boschnalósido)." Tesis de Maestría, México, D.F, 1991.
- 55 A. R. Katritzky, J.M. Lagowski. *Organic Chemistry. A Series of Monographs*, vol. 19, Academic Press, Gran Bretaña, 1971, 14-59.
- 56 R. Grigg. *Journal Chem. Soc. (B)*, 1966, 218.
- 57 N. F. Billups, editor. *American Drug Index*. 30 th edition, U.S.A., 1986, 486.