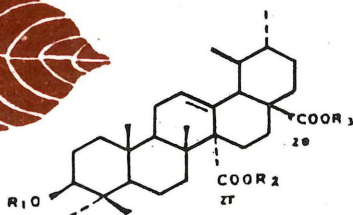
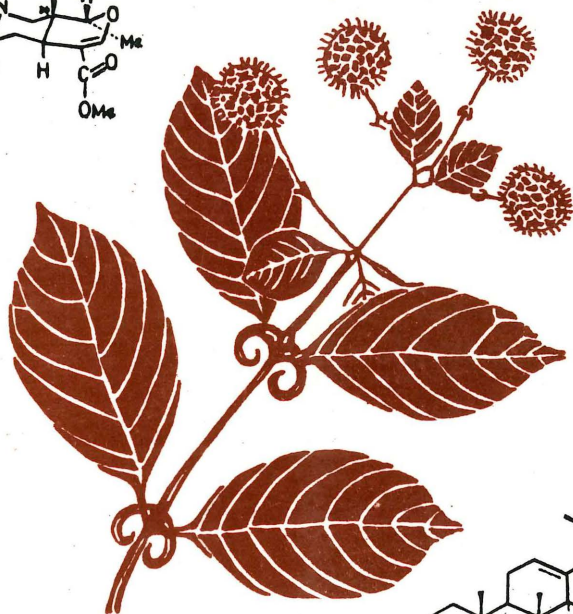
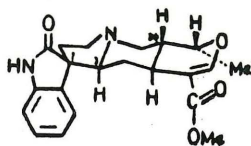


Investigación Fitoquímica

Métodos en el estudio de productos naturales

Olga Lock de Ugaz



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERU
FONDO EDITORIAL 1994

La obra contempla las metodologías usuales para la extracción, aislamiento y determinación estructural de compuestos orgánicos de plantas, principalmente de terpenoides, esteroides, flavonoides, cumarinas, cromenos, benzofuranos, xantonas, quinonas y alcaloides. Cada uno de estos grupos es discutido en términos de métodos cromatográficos apropiados y de sus características espectroscópicas.

Con la información proporcionada en esta obra se pretende impulsar las investigaciones fitoquímicas en el país, tan necesarias para un conocimiento científico-químico de nuestros recursos vegetales, orientando así a un mejor aprovechamiento de los mismos.

Olga Lock de Ugaz es profesora de Química del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Ingeniero Químico, egresada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con estudios de Maestría en Ciencias, con mención en química orgánica, en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México.

Desde hace muchos años ha enfocado su interés en la investigación en productos naturales contenidos en plantas medicinales y en plantas de uso industrial.

Ha participado en numerosos eventos de Química y de promoción de la investigación fitoquímica tanto en el país como en el extranjero.





Investigación Fitoquímica

Dora Lúck de Urrutia

Investigación Fitoquímica

Métodos en el estudio de productos naturales



Olga Lock de Ugaz

Investigación Fitoquímica

Métodos en el estudio de productos naturales

SEGUNDA EDICION



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERU
FONDO EDITORIAL 1994**

Oligo Lock de ligas

Investigación Fitopérmica

Métodos en el estudio de productos naturales

SEGUNDA EDICIÓN

Primera edición, julio de 1988

Segunda edición, revisada y ampliada, junio de 1994

Diagramación: Yoryina León M.

Investigación fitopérmica. Métodos en el estudio de productos naturales

Copyright © 1994 por Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria, cuadra 18. San Miguel. Apartado 1761. Lima 100, Perú. Telfs. 626390, 622540, Anexo 220.

Prohibida la reproducción de este libro por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso de los editores.

Derechos reservados

ISBN 84-8390-952-9

Impreso en el Perú - Printed in Peru

*A mi esposo
A Alberto, Liliana, Patricia
Carlos, Jorge y Susann*

CONTENIDO

PROLOGO SEGUNDA EDICION	XIII
PROLOGO PRIMERA EDICION	XV
ABREVIATURAS	XVII

CAPITULO I:

GENERALIDADES SOBRE EL ANALISIS FITOQUIMICO

1. INTRODUCCION	1
2. MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR	3
3. METODOLOGIA EN EL ANALISIS FITOQUIMICO	8
4. ANALISIS FITOQUIMICO EN EL PAIS. IMPORTANCIA Y PERSPECTIVAS	9
REFERENCIAS	20

CAPITULO II:

TERPENOIDES Y ESTEROIDES

1. INTRODUCCION	23
2. BIOSINTESIS. GENERALIDADES	24
3. ACEITES ESENCIALES	24
	IX

3.1	Técnicas recomendadas	33
3.1.1	General	33
3.1.2	Análisis espectrométricos	35
3.1.3	Determinación de los aceites esenciales	41
3.2	Ejemplos de aplicación	42
4.	SESQUITERPENLACTONAS	53
4.1	Técnicas recomendadas	57
4.1.1	General	57
4.1.2	Análisis espectrométricos	59
4.2	Ejemplos de aplicación	59
5.	DITERPENOS	64
5.1	Generalidades	64
5.2	Ejemplos de aplicación	70
6.	TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	72
6.1	Generalidades	72
6.2	Técnicas recomendadas	82
6.2.1	General	82
6.2.2	Análisis espectrométricos	84
6.2.3	Análisis cuantitativo de diosgenina	90
6.3	Ejemplos de aplicación	91
	REFERENCIAS	100

CAPITULO III: COMPUESTOS FENOLICOS

1.	INTRODUCCION	111
2.	FLAVONOIDES	114
2.1	Generalidades	114
2.2	Técnicas recomendadas	120
2.2.1	De extracción	120
2.2.2	Reacciones de color	120
2.2.3	Técnicas cromatográficas	121
2.2.4	Técnicas espectrométricas	127
2.3	Ejemplos de aplicación	135
3.	CUMARINAS	146
3.1	Generalidades	146

3.2	Técnicas recomendadas	151
3.2.1	De extracción	151
3.2.2	De separación cromatográfica y de detección	151
3.2.3	Técnicas espectrométricas	154
3.3	Ejemplos de aplicación	160
4.	CROMENOS Y BENZOFURANOS	170
4.1	Generalidades	170
4.2	Técnicas generales	172
4.3	Ejemplos de aplicación	174
5.	XANTONAS	179
5.1	Generalidades	179
5.2	Técnicas generales	179
6.	QUINONAS	182
6.1	Generalidades	182
6.2	Técnicas recomendadas	188
6.2.1	De extracción	188
6.2.2	De separación cromatográfica y de detección	189
6.2.3	Técnicas espectrométricas	189
6.3	Ejemplos de aplicación	194
	REFERENCIAS	197

CAPITULO IV: ALCALOIDES

1.	GENERALIDADES	211
2.	TECNICAS RECOMENDADAS	225
2.1	De extracción	225
2.2	Reacciones de coloración y de precipitación	226
2.3	Técnicas cromatográficas	226
2.4	Técnicas espectrométricas	228
2.5	Determinación cuantitativa de los alcaloides	234
3.	EJEMPLOS DE APLICACION	238
	REFERENCIAS	249

APENDICES

APENDICE 1: REACTIVOS DE COLORACION PARA CROMATOLOGRAFIA DE CAPA DELGADA	255
APENDICE 2: REACCIONES DE COLORACION Y PRECIPITACION PARA GRUPOS FUNCIONALES	269
APENDICE 3: MISCELANEAS	281
REFERENCIAS	288
INDICE DE MATERIAS	293
INDICE DE COMPUESTOS	295
INDICE DE PLANTAS	299

No hay nada que el esfuerzo perseverante y el cuidado constante y diligente no pueda vencer.

SÉNECA

PROLOGO A LA SEGUNDA EDICION

Los seis años transcurridos desde la primera edición han sido de reafirmación de la importancia de las plantas medicinales como proveedoras de metabolitos secundarios o productos naturales. La presente publicación aparece en momentos en que se ha despertado un inusitado interés mundial por una de ellas, la *Uncaria tomentosa*, por los diversos efectos terapéuticos que se le atribuyen, algunos de los cuales están siendo científicamente comprobados; ello demuestra una vez más la imperiosa necesidad de conocer sus principios activos y en el cual la fitoquímica juega un rol trascendental.

Con esta segunda edición ampliada y actualizada espero nuevamente contribuir al desarrollo de la investigación fitoquímica en el país, por supuesto, como parte de una investigación multidisciplinaria, habiendo incluido en la presente dos grupos de compuestos químicos de creciente interés como son las xantonas y las quinonas, así como nuevos ejemplos.

Quiero agradecer a los lectores de la primera edición por sus comentarios y sugerencias, y a la vez comprometerlos a continuar haciéndolos.

Mis reconocimientos muy especiales al grupo del laboratorio de química orgánica de la PUCP, en orden alfabético: Carmen, Isabel,

Marisol, Ninoska, Olga, V. Hugo y a todos mis alumnos tesistas, con quienes a través del quehacer diario en el laboratorio conocemos día a día nuevas técnicas a aplicar en nuestras investigaciones fitoquímicas; a mis amigos y colegas fitoquímicos de las diversas universidades del exterior que me apoyan constantemente; a la Pontificia Universidad Católica del Perú, al personal docente y no docente de la sección química, al personal de la biblioteca de ciencias, por el aporte brindado para esta publicación; a mi esposo, y en particular, a mis queridos hijos, quienes nuevamente digitaron el manuscrito y elaboraron las fórmulas.

Olga Lock de Ugaz
junio 1994

*Empezar es haber recorrido la mitad
del camino...*

CONFUCIO

PROLOGO A LA PRIMERA EDICION

Las plantas son muy promisorias fuentes de nuevas drogas aún en estos tiempos, se espera que muchas de ellas sean desarrolladas en los siguientes 20 años, pero esto será posible sólo si hay una estrecha colaboración entre botánicos, farmacólogos y químicos de productos naturales. Lamentablemente, la experiencia demuestra que esto no es general, salvo algunos programas desarrollados por la industria.

Es frecuente observar en la literatura ensayos biológicos hechos en extractos crudos de plantas en los que se evidencia que los químicos no han estado involucrados en ellos; por otro lado, un número bastante grande de plantas que tienen interesantes efectos biológicos han sido muchas veces estudiados desde un punto de vista puramente químico y así, aunque muchos compuestos han sido aislados de plantas de interés biológico, el agente activo permanece todavía sin ser descubierto.

Más lamentablemente es aún, la situación de nuestro país, de reconocida y abundante flora y que por sus condiciones climáticas se hace muy variada, con una medicina tradicional de siglos de existencia, son muy escasas las investigaciones científicas realizadas por los peruanos; la mayoría de los conocimientos que tenemos de la química de nuestras plantas han sido proporcionados por extranjeros, que realizan expediciones y llevan material para estudios en sus laboratorios.

Es urgente que tomemos conciencia de nuestro potencial económico y hagamos esfuerzos conjuntos para que luego de una investigación básica, llevemos estos resultados a nivel de industria llámese química, farmacéutica, de cosméticos, de colorantes, etc.

Luchemos contra los escépticos que creen que todo está descubierto, que muy poco puede ya obtenerse de las plantas, o contra los que creen que una investigación de esta naturaleza es dependiente de la disponibilidad de instrumentos sofisticados y de enormes edificios; recordemos estas palabras: "grandes edificios y pequeños personajes nunca harán grandes instituciones; personas e imaginación son las mejores fuentes".

El interés de incentivar las investigaciones químicas en el Perú me indujo a preparar esta obra que es una modesta contribución al estudio químico de plantas en la que se pretende dar pautas de cómo iniciar una investigación fitoquímica, y de las diversas técnicas que pueden emplearse para aislar y determinar estructuras de los llamados Productos Naturales o Metabolitos Secundarios. Aunque el número de técnicas utilizadas es bastante grande, más aún en estos últimos años con los adelantos científicos; la intención de esta obra es dar aquellas que sean de fácil acceso a nuestros laboratorios, aunque no deja de nombrarse algunas más sofisticadas que por lo menos deben ser conocidas como existentes.

Deseo expresar mis agradecimientos a los muchos investigadores, autores de las referencias incluidas, porque sus esfuerzos combinados a través de sus publicaciones han hecho posible presentar la información en esta obra, y a la Pontificia Universidad Católica del Perú por las facilidades brindadas para la elaboración de la misma. A la Dra. Liliana Eguren por sus comentarios, críticas y sugerencias. A mis hijos que, sacrificando sus vacaciones, escribieron a máquina el manuscrito.

Esta obra puede ser utilizada como texto para estudiantes de Química, Química Farmacéutica, Farmacología, Biología, Bioquímica; y será útil a quienes trabajan en la investigación fitoquímica. Desde ya agradezco a los lectores por las críticas y sugerencias que pudieran hacerme llegar.

ABREVIATURAS

a	ancho
ac	ácido
Ac	acetilo
Ac ₂ O	anhidro acético
ADP	difosfato de adenosina
alc	alcaloide
AMV	ácido mevalónico
aq	acuoso
ATP	trifosfato de adenosina
n-buOH	n-butanol
t-buOH	t-butanol
bz	benceno
c	cuarteto
ca	aproximado
°C	grado centígrado
CC	cromatografía de columna
CCD	cromatografía de capa delgada
CCDP	cromatografía de capa delgada preparativa
CG-EM	cromatografía de gas-espectrometría de masas
CGL	cromatografía gas-líquido
cm	centímetro
conc	concentrado
CP	cromatografía de papel
d	doblete
dd	doble doblete

DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
2,4-DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
ε	coeficiente de extinción
EM	espectrometría de masas
EP	éter de petróleo
est. int.	estándar interno
Et	etilo
Et ₂ O	éter etílico
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
g	gramo
gt(s)	gota(s)
h	hombro (en espectroscopía UV)
hept	heptano
hex	hexano
HOAc	ácido acético
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
Hz	Hertz
J	constante de acoplamiento
IR	infrarrojo
L	litro
lit	literatura
m	multiplete
M	masa molecular
Ms	muestra
máx	máximo
Me	metilo
Me ₂ CO	acetona
MEK	metil etil cetona
MeOH	metanol
min	minuto
mL	mililitro
m/z	relación masa a carga
NaOAc	acetato de sodio
neg	negativo
nm	nanómetro
pf	punto de fusión
pos	positivo

PPDMA	pirofosfato de dimetilalilo
ppdo	precipitado
PPF	pirofosfato de farnesilo
PPG	pirofosfato de geranilo
PPGG	pirofosfato de geranilgeranilo
PPI	pirofosfato de Δ^3 -isopentilo
ppm	partes por millón; de desplazamiento químico (δ). relativo al tetrametilsilano, en el RMN
Py o py	piridina
R	reactivo
RP	fase reversa
Rf	movilidad relativa al frente del solvente
RMN	resonancia magnética nuclear
RMN- ^1H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ^{13}C	resonancia magnética nuclear de carbono
s	singulete
seg	segundos
sol	solución
sp	especie
t	triplete
tol	tolueno
tr	tiempo de retención
UV	ultravioleta
Vis	visible
vol(s)	volúmen(es)
λ	longitud de onda

I

Generalidades sobre el análisis fitoquímico

1. INTRODUCCION

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades; éstas últimas, llamadas plantas medicinales, eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación; nadie buscaba el saber porqué o cómo actuaban, pero era un hecho incontestable y que parecía mágico.

Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar sus síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad, y

finalmente dar a conocer a la humanidad los resultados de estos estudios. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros.

La utilización de las plantas en la medicina no ha perdido interés, según lo demuestra el hecho que durante alrededor de quince años (1959-1973), en el mercado de los Estados Unidos, el 25,0% de las prescripciones médicas contenían principios derivados de plantas (no menor de 24,0%, ni mayor de 26,0%); esta estabilidad permite presumir que el porcentaje no será diferente en estos momentos (reportes de esta naturaleza no ha sido posible encontrar a nivel nacional). Es también frecuente encontrar en estas prescripciones, extractos crudos de plantas, aunque la proporción es menor, alrededor de 2,5%¹.

Es conveniente comentar que si el extracto crudo posee el efecto farmacológico, podría parecer contradictorio el hecho de tener que aislar el principio activo que contiene, y más aún que la prescripción médica de este último sea en porcentajes mayores; sin embargo, ello es justificado si consideramos que:

- la ingestión oral del extracto puede tener en algunos casos menor efecto que la aplicación intramuscular del principio activo aislado, y en este caso debe ser una sustancia pura;
- debe conocerse la pureza y concentración de la droga al administrarse, lo que no será posible al utilizarse directamente como extracto;
- la concentración del principio activo en las plantas es pequeño (generalmente 0,1-2,0% en la planta, en otros casos menor que 0,01%).

Por otro lado, el aislamiento y conocimiento estructural de compuestos de plantas, podría dar a lugar a diseñar reacciones para producir derivados semisintéticos, como ya lo indicamos; así por ejemplo, el uso de la diosgenina como materia inicial para la síntesis de la mayoría de hormonas esteroidales usadas corrientemente en la medicina, o dar pautas para la síntesis de compuestos similares como el caso de la cocaína, que sirvió como compuesto modelo para la producción de cocaína y otros anestésicos locales. Es entonces de gran

importancia aislar los principios activos de las plantas, y su localización en las diferentes partes de las plantas o en los diferentes extractos debe ser motivo de ensayos biológicos adecuados.

Un gran porcentaje de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los llamados **Productos Naturales o Metabolitos Secundarios**, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, y de distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas, que los llamados **Metabolitos Primarios**; éstos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente. De los primeros, **Productos Naturales o Metabolitos Secundarios**, podemos decir que no son indispensables en las plantas que ocurren; no intervienen o quizás, mejor dicho, no se ha descubierto aún una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados *artículos de lujo* en la planta.

En la figura 1 se ilustra el área general del metabolismo en los organismos vivientes, en la que puede observarse, en la columna de la derecha, los llamados **Metabolitos Primarios**: proteínas, ácidos grasos, polisacáridos, etc., y en la parte inferior los **Metabolitos Secundarios**: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, etc.². Algunos autores han descrito a los **Metabolitos Secundarios** como *Compuestos del Químico* y a los **Primarios** como *Compuestos del Bioquímico*.

2. MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR

Se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en las plantas, basados en la extracción de éstos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración³⁻⁵.

Un esquema sencillo se representa en la figura 2, para la determinación de alcaloides, saponinas y flavonoides.

Esquemas más elaborados se indican en las figuras 3 y 4 para la detección de los compuestos antes señalados, y de otros como antraquinonas, cardenólidos, etc.

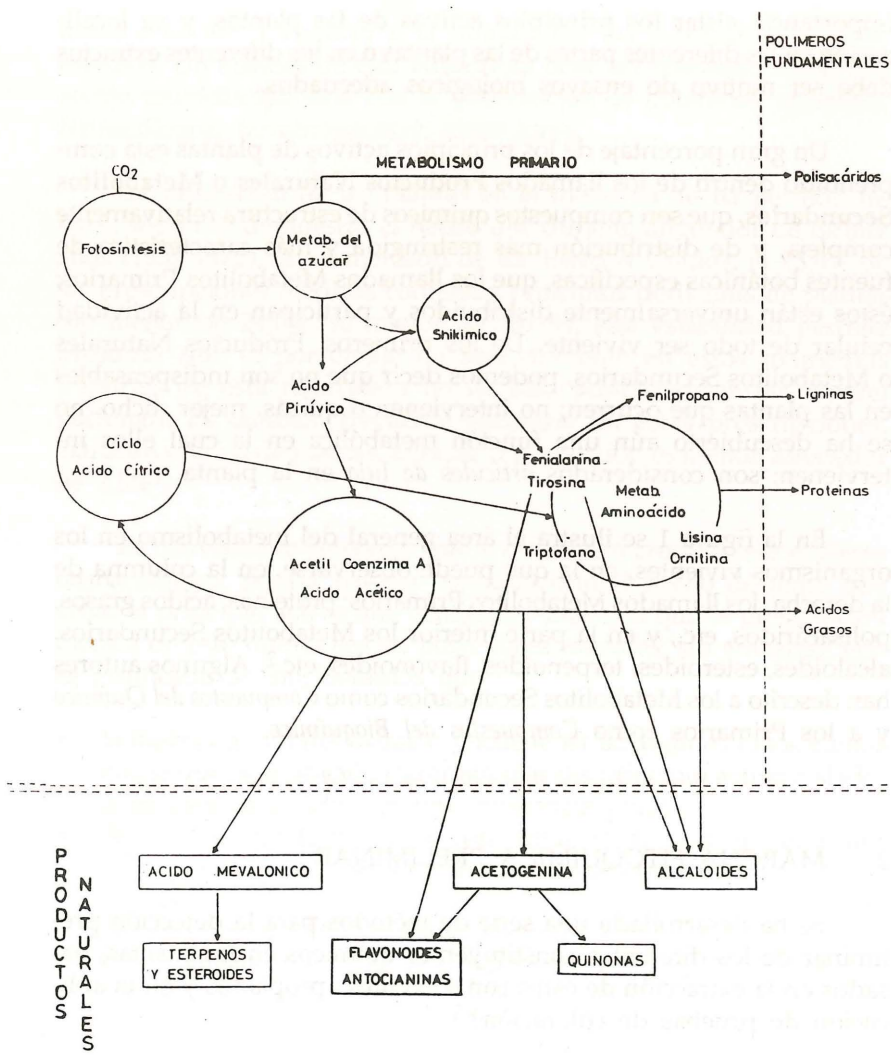


Fig. 1.- Area general del metabolismo en los organismos vivos

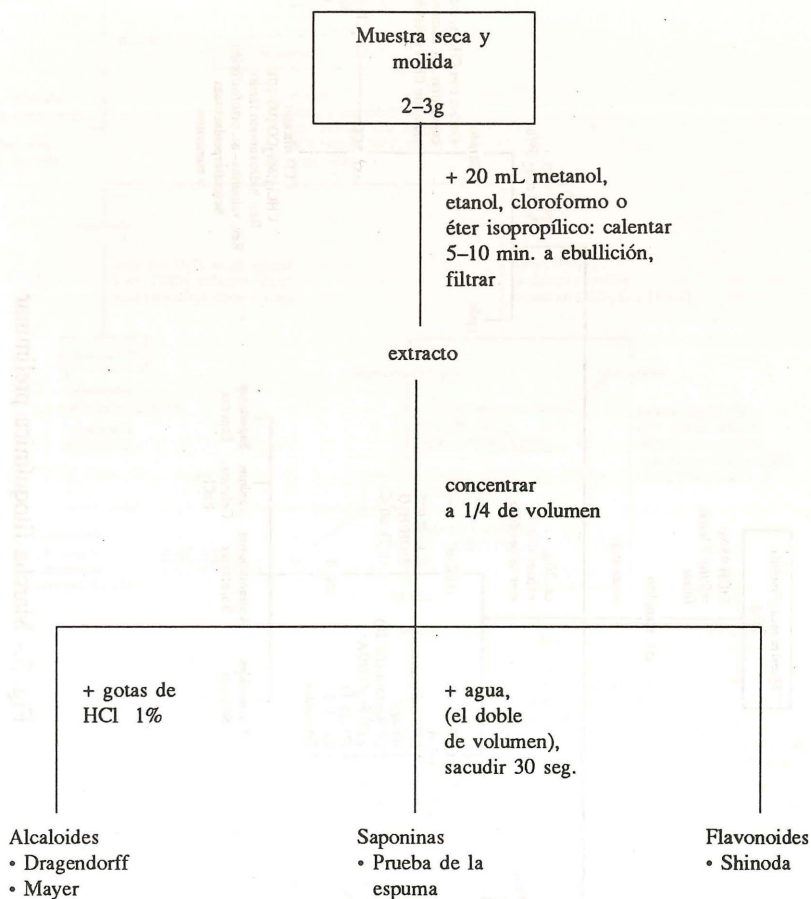


Fig. 2.- Marcha fitoquímica preliminar

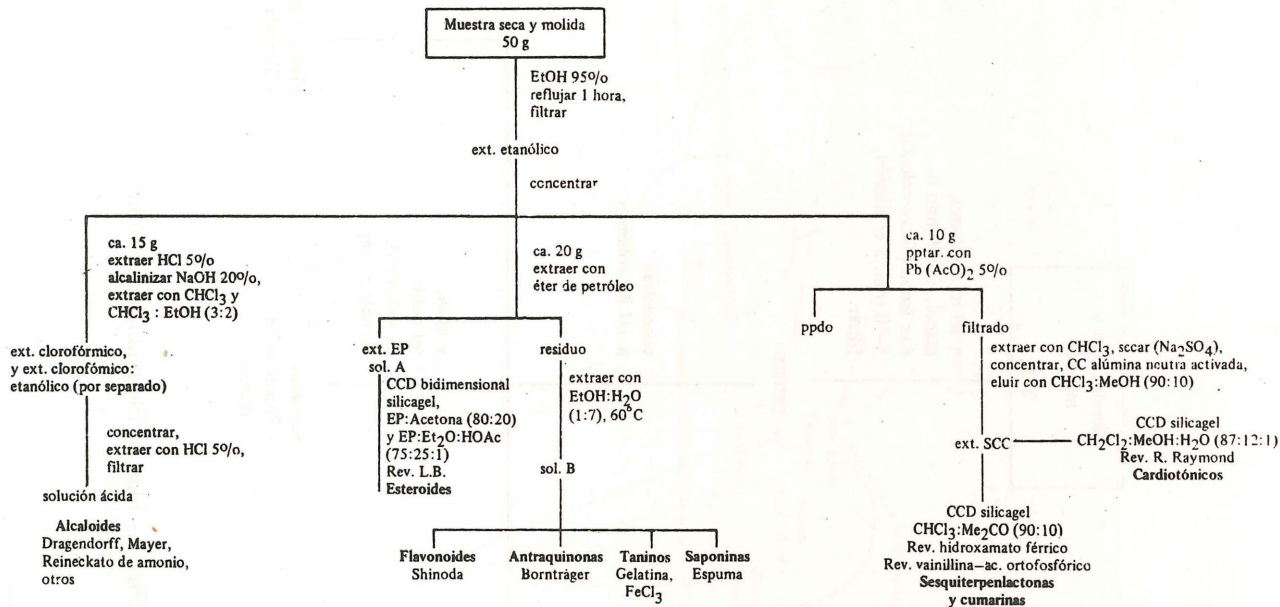


Fig. 3.- Marcha fitoquímica preliminar

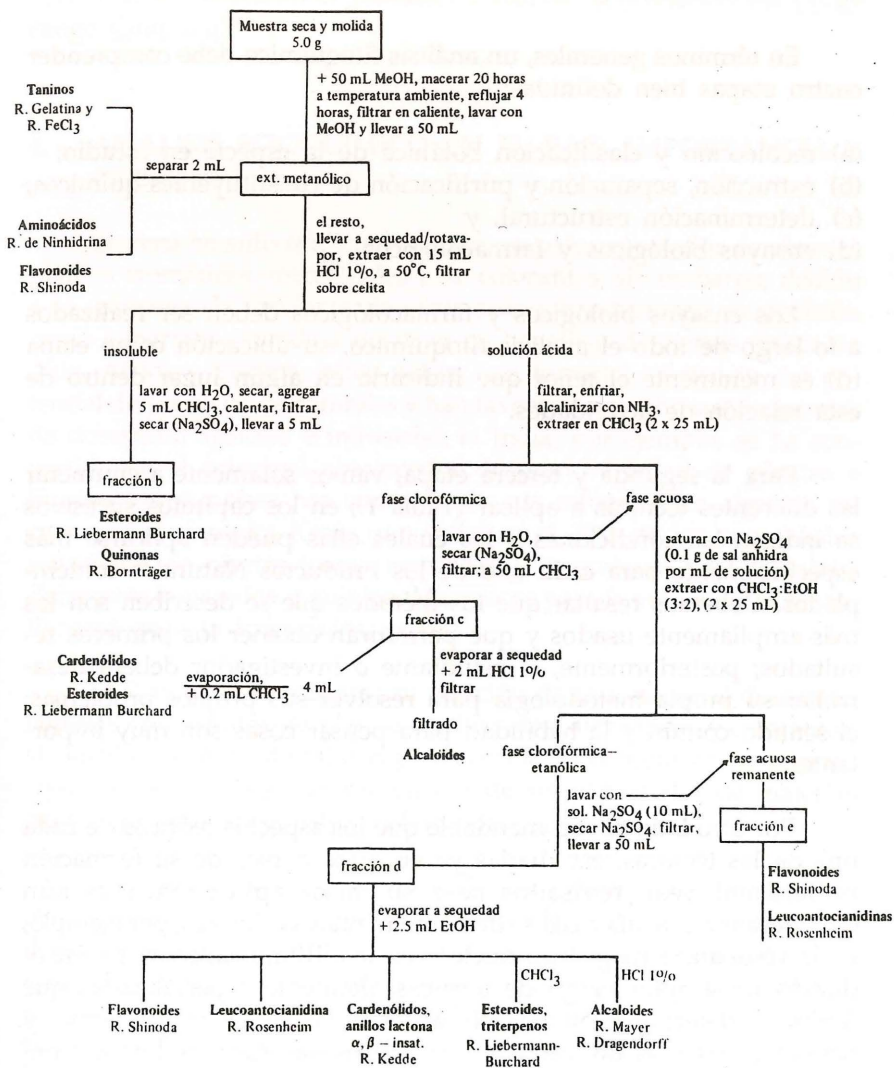


Fig. 4.- Marcha fitoquímica preliminar

3. METODOLOGIA EN EL ANALISIS FITOQUIMICO

En términos generales, un análisis fitoquímico debe comprender cuatro etapas bien definidas:

- (a) recolección y clasificación botánica de la especie en estudio;
- (b) extracción, separación y purificación de constituyentes químicos;
- (c) determinación estructural, y
- (d) ensayos biológicos y farmacológicos.

Los ensayos biológicos y farmacológicos deben ser realizados a lo largo de todo el análisis fitoquímico, su ubicación como etapa (d) es meramente el tener que indicarlo en algún lugar dentro de esta relación de actividades.

Para la segunda y tercera etapa, vamos solamente a enumerar las diferentes técnicas a aplicar (Tabla 1); en los capítulos sucesivos se indican las condiciones a las cuales ellas pueden aplicarse más específicamente para cada uno de los Productos Naturales contemplados. Debemos resaltar que los métodos que se describen son los más ampliamente usados y que permitirán obtener los primeros resultados; posteriormente, el estudiante o investigador deberá desarrollar su propia metodología para resolver sus propios problemas; el sentido común y la habilidad para pensar cosas son muy importantes.

Por otro lado es recomendable que los aspectos teóricos de cada una de las técnicas, estudiadas ya en otros cursos de su formación profesional, sean revisados para su mejor aplicación, más aún considerando que día a día se desarrollan nuevas técnicas; por ejemplo, en la resonancia magnética nuclear en los últimos años se ha introducido un amplio rango de técnicas altamente especializadas que facilita la determinación estructural, entre las correlaciones homo- y heteronuclear mas utilizadas en productos naturales podemos mencionar la correlación ^1H - ^1H por COSY (Correlation Spectroscopy); la correlación ^{13}C - ^{13}C por INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment); la correlación heteronuclear ^{13}C - ^1H , HETCOR, por INEPT (Intensive Nuclei Enanced by Polarization Transfer) y DEPT (Distortionless Enancement by Polarization Transfer), la correlación ^{13}C - ^1H a larga distancia por INAPT (Intensive Nuclei

Assigned by Polarization Transfer) y COLOC (Correlation via Long-range Coupling)*^{6,7}.

4. ANALISIS FITOQUIMICO EN EL PAIS. IMPORTANCIA Y PERSPECTIVAS

El Perú ha sido tradicionalmente un país exportador de algunas plantas aromáticas, medicinales y de colorantes; sin embargo, debido a la competencia creciente de otros países productores, su posición como exportador tiende a decrecer en beneficio de ciertos países de Asia, Africa y Europa; estos países han tomado conciencia del potencial de sus recursos naturales y han favorecido mucho sus programas de desarrollo agrícola e industrial; la India, por ejemplo, se ha convertido en el principal abastecedor de gran variedad de plantas a Europa, otros países han concentrado sus esfuerzos en algunos recursos, por ejemplo: Kenia que satisface el 70% de las necesidades mundiales de piretro (como insecticida), Yugoslavia para la salvia, Zaire para la papaína y quinina, Marruecos para la verbena y el senna, Panamá para la ipecacuana, etc^{8,9}.

El Perú puede recuperar su posición de exportador si desarrolla cultivos organizados de plantas medicinales, aromáticas y colorantes; si efectúa el control de calidad para apreciar la concentración de principios activos y mejor aún si en vez de ser exportador de materias primas lo es de productos elaborados.

Por otro lado, en el país por la gran riqueza de su flora, de la cual varios miles de especies son conocidas, con varios cientos por descubrir y con menos del 10% estudiadas desde el punto de vista químico y farmacológico, un análisis fitoquímico sistemático dará a conocer nuevas drogas tan o más importantes que las ya en aplicación. Con un programa de esta naturaleza, desarrollado en un período de 20 años (1956-1976) en un laboratorio farmacéutico de Estados Unidos pudo descubrirse cuatro plantas de acción antitumoral, una de las

* Se ha señalado la técnica en el idioma ingles para mantener la abreviatura usual en la literatura científica

Tabla 1.- Técnicas generales a aplicar en un análisis fitoquímico

I. De extracción: En soxhlets. Maceración. Percolación. Arrastre de vapor. Fluido supercrítico.		
II. De separación y purificación:		
Cromatografía de Papel, CP	Ascendente Descendente Circular Preparativa	CPA CPD CPC CPP
Cromatografía de capa delgada, CCD	Analítica Preparativa Bidimensional	CCD CCDP CCDB
Cromatografía líquida-líquida, (de columna: CC)	Adsorción Partición Exclusión Flash Al vacío Intercambio iónico Alta Performance, HPLC	
Cromatografía en contracorriente, CCC	A la gota (DCCC) Alta velocidad (HSCCC)	
Cromatografía gas-líquido, CGL		
Electroforesis		
III. De determinación estructural		
Espectrométricas:	Ultravioleta-Visible, UV-Vis Infrarrojo, IR Resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13:	RMN- ¹ H RMN- ¹³ C
	De masas, EM	
Rayos X		
Reacciones de coloración y de precipitación		
Propiedades físicas		

cuales el *Catharanthus roseus* conocida comúnmente como "isabelita", abundante en nuestro medio como planta ornamental, ha dado lugar al descubrimiento de los alcaloides vinblastina y vincristina, puestos en el mercado en la década del 60 y de gran valor terapéutico en el tratamiento del cáncer¹.

El análisis fitoquímico podría ser orientado desde diferentes puntos de vista aprovechando las experiencias de investigaciones reportadas en la literatura, así por ejemplo:

- la literatura reporta varias especies de *Dioscorea*, especialmente en la región de la Selva, y de su contenido de diosgenina, de gran importancia como materia prima para la producción de hormonas esteroidales; debe propiciarse y buscarse la tecnología para la producción de diosgenina a escala industrial.
- la literatura reporta la presencia de lactonas sesquiterpénicas principalmente en los géneros *Ambrosia* y *Artemisia*, las que por ensayos biológicos se han demostrado que presentan acción antitumoral y citotóxica, éstas podrían constituir un grupo de plantas de estudio en la búsqueda de sesquiterpenlactonas biológicamente activas.
- la literatura reporta varias especies del género *Werneria* en los andes peruanos, que la medicina tradicional hace uso de ellas para el tratamiento del cáncer al útero, como febrífuga, para el tratamiento del reumatismo, de dolor de garganta, etc., sin embargo hay escasos trabajos realizados en la parte química y farmacológica, por lo que propiciar su desarrollo sería importante, debido a que estas especies son potencialmente fuentes de nuevas drogas.

Los ejemplos de esta naturaleza pueden ser interminables; enfoques desde un punto de vista u otro podrían ser tomados en cuenta, no importaría, de una u otra forma se estudia nuestros recursos contribuyendo con ello a su conocimiento científico; ésto puede dar lugar en el futuro a una explotación racional de los mismos y por último se contribuye al desarrollo socioeconómico del país.

En las Tablas 2, 3 y 4 se da una relación de plantas medicinales, aromáticas y colorantes, muchas de ellas conocidas en nuestro país^{10,11}, y de significación económica en el mercado mundial. Para cada especie se ha dado su nombre botánico, su nombre común, la parte de la

Tabla 2.— Plantas medicinales e insumos vegetales para la Industria Química

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Principio(s) activo(s) conocido(s)</i>	<i>%</i>	<i>Usos</i>
Aloe vera Tourn	sávila, zábila		derivados hidroxiantracenos (como barbaloina)	28,0	laxativos, en cosméticos
Artemisia annua	qing hao		artemisina		antimalárico
Atropa belladonna L.	belladonna	hojas, raíces	atropina, hiosciamina	0,13-1,7	estimulante del sistema nervioso, antiespasmódico, tratamiento de úlceras gástricas.
Berberis spp.		raíces	berberina		en diarreas.
Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze	tara	frutos	taninos	mayor de 50%	afecciones del estómago, cicatrizante, antiescorbútica.
Cassia senna L.	senna	hojas, vainas	sennósidos Ay B (derivados de antracenos)	2,5-4,5	estimulante laxativo.
Catharantus roseus (L.) G. Don	isabelita	hojas, raíz, flores	ajmalicina (raíces) vinblastina y vincristina (hojas)	...0,55 ...0,7	tratamiento de leucemia.
Cephalis ipecacuana (Brot) A. Rich.	ipeacuana	raíces	emetina	1,7-2,3	tratamiento de amebiosis, expectorante, emético, insecticida.

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Principio(s) activo(s) conocido(s)</i>	<i>%</i>	<i>Usos</i>
Cinchona calisaya Weddel	quina	cortezas	quinina, cinchonina, quinidina, cinchonidina	6-10	antipirético, antimalárico, tratamiento de arritmia cardíaca, propiedades astringentes y amargas.
Chondrodendron tomentosa o género Strychnos	curare	raíces, hojas, tallos, cortezas.	D-tubocurarina		anestésico, relajante muscular.
Chrysanthemum cinerariifolium	piretro	flores	piretrina		insecticida.
Croton lechleri M. Arg.	sangre de grado	latex	taspina		cicatrizante.
Datura stramonium L.	chamico	flores, hojas	hiosciamina	0,25-0,55	acción sedativa y antiemética, anticolinérgico, desórdenes gástricos, antiespasmódico.
Digitalis lanata Ehrh.; D. purpurea L.		hojas	glicósidos cardioactivos: digoxina	1,0-1,4	actúa en sistemas cardiovasculares.
Dioscorea spp.		tubérculos	diosgenina	2,5	producción de cortisonas y hormonas sexuales.

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Principio(s) activo(s) conocido(s)</i>	<i>%</i>	<i>Usos</i>
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	licorice	rizomas, raíces	glicirrizina		demulcente y expectorante, endulzane para diabéticos, antiinflamatorio.
<i>Krameria triandra</i> R. & P.	ratañia	raíces, hojas	ratanina	17	astringente, acción hemostática, diarreas.
<i>Lonchocarpus nicou</i> (Aubl.) DC	barbasco	raíces	rotenona	6-8	insecticida.
<i>Lupinus mutabilis</i> Swett	tarwi	semillas	lupinona	2-5	
<i>Marsdenia condurango</i> Reich	condurango	cortezas de raíces	condurangina		afecciones gástricas, anorexias y gastralgias
<i>Panax gingseng</i> C.A. Meyer	gingseng	raíces	ginsenósidos		febrífugo; regula presión de la sangre por reducción de nivel de colesterol; estimulante y afrodisiaco.
<i>Peumus boldus</i> Molina	boldo	hojas	boldino	0,1	estimulante digestivo, analgésico

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Principio(s) activo(s) conocido(s)</i>	<i>%</i>	<i>Usos</i>
<i>Rauwolfia serpentine</i> Benth		cortezas de raíces	ajmalicina, serpentina	0,7-3	hipertensión arterial, acción sedativa.
<i>Rhamnus purshiane</i> D.C.	cáscara sagrada	cortezas	antraquinonas frangulin A y B		estimulante laxativo.
<i>Rheum palmatum</i> L., <i>R. officinalis</i> Baillon	ruibarbo	rizomas, raíces	emodina, etc.		acción catártica.
<i>Sylibum marianus</i> Gaertn	cardo santo		silimarina, silibina, silidianina		afecciones al hígado.
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni		hojas	steviosidos	10	edulcorante
<i>Taraxacum officinale</i> Wigger	diente de león	raíces	taraxasterol, taraxerol		diurético, desórdenes crónicos en riñón e hígado.
<i>Tabebuia</i> spp.	iperox, lapacho, tahuari	corteza, tronco	lapachol y derivados		antitumoral.
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt		corteza, troncos	taxol, diterpenos, taxanos		antitumoral.
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) U. <i>guianensis</i> (Aubl.) Gmel	uña de gato		alcaloides oxindólicos, ácidos quinóvicos, taninos		antitumoral, antiinflamatorio, gastritis.

Tabla 3.- Plantas aromatizantes

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Aceite esencial (a.e.) componente(s) principal(s)</i>	<i>% a.e.</i>	<i>Aplicaciones</i>
<i>Allium sativum</i> L.	ajos	bulbos			antiséptica
<i>Apium graveolens</i> L.	apio	semillas	80% hidrocarburos terpenos (α -limoneno, selineno)	1,5-2,5	a., p., alimentos, aperitivo diurético
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Garc. ex Bl.	canela	cortezas	aldehído cinámico 42-75%	0,5-1	a., p.
<i>Citrus limonium</i> L.	limón	frutos	citral, limoneno		a.
<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	naranja	frutos	limoneno 90%		a.
<i>Coriandrum sativum</i> L.	culantro	semillas	linalol 50%	0,2-2	a., carminativo, estomáquico.
<i>Cominum cyminum</i> L.	comino	semillas	aldehído cumínico 35-62%	2,5-4	a., estimulante, estomáquico, carminativo.
<i>Curcuma longa</i> L.	palillo	rizoma	turmerona 60%	4-5	a.
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	hierbaluisa		citral		a.
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	citronela	frutos	citronelal		a., p., desinfectante.

a: aromatizante, p: perfumería

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Aceite esencial (a.e.) componente(s) principal(s)</i>	<i>% a.e.</i>	<i>Aplicaciones</i>
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	eucalipto	hojas	cineol 80%	1-3	bronquitis y catarro.
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	clavo de olor		eugenol 84%	15	a., p., medicina.
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	manzanilla	flores	chamazuleno (0-15%) bisabolol (10-15%) farnesano (15%)	0,25	a., antiespasmódico y sedante.
<i>Melissa officinalis</i> L.	toronjil	hojas	citronelal, cital	0,01-0,2	a., sedante
<i>Mentha arvensis</i> L.	menta	flores, hojas	mentol (50-70%), mentona	1,2	a., inflamaciones vesiculares, antiespasmódica, antiséptica.
<i>Minthostachys mollis</i> (Kunth) Griseb.	muña	hojas, flores,			a., conservador, carminativo estomacal.
<i>Myristica fragans</i> Houtt.	nuez moscada	semillas	α y β -pineno, sabineno	4-15	a.
<i>Ocimum basilicum</i> Linné	albahaca	toda la hierba	linalol, metilchavicol (60%)	1,8	a.
<i>Origanum vulgare</i> Linné	orégano	hojas	timol y carvacrol	0,1-1	a., fungicida, antihelmíntico, espasmolítico, carminativo, diurético.

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Aceite esencial (a.e.) componente(s) principal(s)</i>	<i>% a.e.</i>	<i>Aplicaciones</i>
Petroselinum sativum Hofm	perejil	toda la planta semilla	miristicina, feladreno	1-2 2-7	a.
Pimpinella anisum Linné	anís	semillas	anetol 84-87%, metil chavicol	1,5-3,5	a., estimulante, antiespasmódico.
Piper nigrum L.	pimienta blanca	bayas	felandreno (alcal. piperina)	1-2,5	a.
Rosmarinus officinalis Linné	romero	arbustos	borneol, cineol	1	a., estimulante estomacal, antiespasmódico.
Salvia officinalis L.	salvia	hojas	tuyona 35-40% cineol 14%, canfor 7-8%	1,8	a., estimulante y antidiaforético.
Satureja spp.	panizzara	hojas	carvacrol	1	a., espasmolítico, carminativo, expectorante.
Schinus molle L.	molle	frutos	pineno, felandreno		
Thymus vulgaris L.	tomillo	flores, hojas	carvacrol, timol	2,5	a., antiséptico, estimulante de las vías digestivas y circulatorias, antiespasmódico.
Zingiber officinales Roscoe	gengibre, kión	rizomas	canfeno, felandreno, zingerona	1-3	a., saborizante en medicina, alimentos.

Tabla 4.- Plantas colorantes

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Parte(s) utilizada(s)</i>	<i>Pigmentos</i>	<i>%</i>	<i>Aplicación</i>
<i>Amaranthus caudatus</i> var. <i>atropurpurea</i> .	kiwicha	inflorescencias	amarantina		colorantes para alimentos.
<i>Berberis lutea</i> R. & P.	tankar	raíces	berberina, otros		teñido de fibras.
<i>Beta vulgaris</i> L.	betarraga	tubérculos	betanina		colorante para alimentos.
<i>Bixa orellana</i> L.	achiote	semillas	bixina, norbixina	1,5-2,5	colorante para alimentos; propiedades medicinales: curación de quemaduras, antidisentería, alivia dolor de cabeza.
* <i>Coccus cacti</i>	cochinilla	insectos	ac. carmínico	15-18	
<i>Curcuma longa</i> L.	palillo	rizomas	curcumina	0,3-5,4	colorante para alimentos.
<i>Opuntia soeherensii</i> Bredt	ayrampo	semillas	betanina		colorante para alimentos.
<i>Tagetes erecta</i> L.	marigold	flores	xantófila	0,6-0,9 g/Kg.	Flor: alimentos balanceados. Xantófila: industrias alimentarias.
<i>Zea mays</i> L.	maíz morado	corontas	antocianinas	1,2-1,8	colorantes para alimentos.

* insecto

planta utilizada; se ha tratado de indicar el o los principios activos conocidos y su concentración. En algunos casos de plantas aromatizantes y colorantes además de su uso como tales se les conoce otras acciones medicinales, las cuales también se indican.

Estas Tablas han sido elaboradas en base a la experiencia personal y a una serie de datos recopilados de fuentes de información nacional e internacional, oral y escrita.

REFERENCIAS

- 1 Farnsworth, N.R. (1980) Rational Approach Applicable to the Search for and Discovery of New Drug Plants. Conferencia presentada en el Primer Simposio Latinoamericano y del Caribe en Agentes Farmacológicos de Ocurrencia Natural. La Habana, Cuba.
- 2 Hendrickson, J.B. (1965) *The Molecules of Nature*. W.A. Benjamin, Inc., Nueva York.
- 3 Farnsworth, N.R. (1966) Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* 55, 225-275.
- 4 Rondina, R.V.D. y Coussio, J.D. (1969) Estudio de Plantas Medicinales Argentinas (1). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA, 6, 351-366.
- 5 Domínguez, X.A. (1973) *Métodos de Investigación Fitoquímica*. John Wiley, México.
- 6 Fischer, N.H., Vargas, D., Menelaou, M. (1991) Modern NMR Methods in Phytochemical Studies. En *Modern Phytochemical Methods*. Plenum Press, N.Y.
- 7 Derome, A.E. (1989) The Use of NMR Spectroscopy in the Structure Determination of Natural Products: Two Dimensional Methods. *Nat. Prod. Reports* 6, 111-141.

- 8 **International Trade Centre UNCTAD/GATT. Market for Selected Medicinal Plants and Their Derivatives. Génova (1982).**
- 9 **FOPEX (1984) Hojas Técnicas de Colorantes Naturales, Especies, Plantas Medicinales e Insumos Vegetales para la Industria Química. Lima.**
- 10 **Soukup, J. (1987) Nombres Vulgares de la Flora Peruana. Ed. Salesianos, Lima.**
- 11 **Chávez, N. (1977) La Materia Médica en el Incanato. Ed. Mejía Baca, Lima.**

Algunas se refieren a la unión de unidades de isopreno como las
propias de algunos de los que se venían haciendo en los
terpenos en la química de la fisiología de los
del mundo de los organismos. En la figura 1 se ilustra el esqueleto
general de la estructura de los terpenos y esteroides.

La formación del ácido mevalónico, su conversión en preterpeneo
de la fisiología y la ramificación de éste en preterpeneo de
diversidad se muestra en la figura 2. Puede verse en la figura 3
la unión de las unidades de los terpenos para formar unidades de C₁₀,
C₁₅ y C₂₀ y la ramificación de éstas en unidades de C₁₅ y C₂₀.
En la figura 4 se puede observar la ramificación
de las unidades de éstas en las estructuras del mundo y la ramificación
de éstas en las unidades de los terpenos, como el ácido mevalónico,
que en el mundo de los organismos se ramifica en unidades de C₁₀,
C₁₅ y C₂₀. En la figura 5 se puede observar la ramificación
de las unidades de éstas en las unidades de los terpenos.

II

Terpenoides y esteroides

1. INTRODUCCION

El término terpenoide se refiere a un grupo de sustancias que tienen un origen biosintético común y que siguen la llamada "regla del isopreno" esbozada por Wallach en 1866.

Pueden clasificarse como monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), y tetraterpenos (C₄₀), según el número de unidades de isopreno (2,3...8) que los forman.

(Fig. 1)

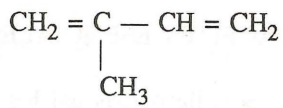


Fig. 1.- Estructura del isopreno

El amplio uso de los terpenoides, tanto en la industria como en la medicina, ha despertado el interés por encontrar nuevas fuentes y por el conocimiento de nuevas estructuras químicas.

2. BIOSINTESIS. GENERALIDADES

Aunque se señala la unión de unidades de isopreno como ruta biogenética debemos destacar que el verdadero precursor de los terpenoides es el pirofosfato de Δ^3 -isopentilo, el cual es formado del acetato vía ácido mevalónico. En la figura 2 se indica el esquema general de la biosíntesis de los terpenoides y esteroides.

La formación del ácido mevalónico, su conversión en pirofosfato de Δ^3 -isopentilo y la isomerización de éste en pirofosfato de dimetilalilo se observa en la figura 3; puede notarse en la figura 4 la unión cabeza-cola de las unidades para formar esqueletos de 10, 15 y 20 carbonos, y la dimerización de estos dos últimos, C_{15} y C_{20} , por unión cola-cola para dar lugar a los terpenos de 30 y 40 carbonos respectivamente^{1,2}. En la figura 5a., se puede observar la subdivisión en unidades isoprenicas en las estructuras del mirceno y farnesano, en algunos casos puede ocurrir excepciones como el ácido crisantémico, figura 5b., en el cual a pesar de tener un número de átomos de carbono múltiplo de 5, la disposición de las mismas impide la subdivisión en las mencionadas unidades.

El gran número de terpenoides aislado de plantas ha sido originado por la facilidad con que estos esqueletos carbonados sufren reacciones de ciclación y reordenamiento del tipo ion carbonio, hidrataciones y oxidaciones, dando así lugar a compuestos de estructura cíclica y acíclica, saturados o insaturados, con uno o mas grupos funcionales (hidroxilos, aldehídos, cetonas, etc.)

3. ACEITES ESENCIALES

Son llamados así los constituyentes odoríferos o "esencias" de una planta. El término aceite, probablemente, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. La palabra esencial fue derivada del latín "quinta essentia" que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos.

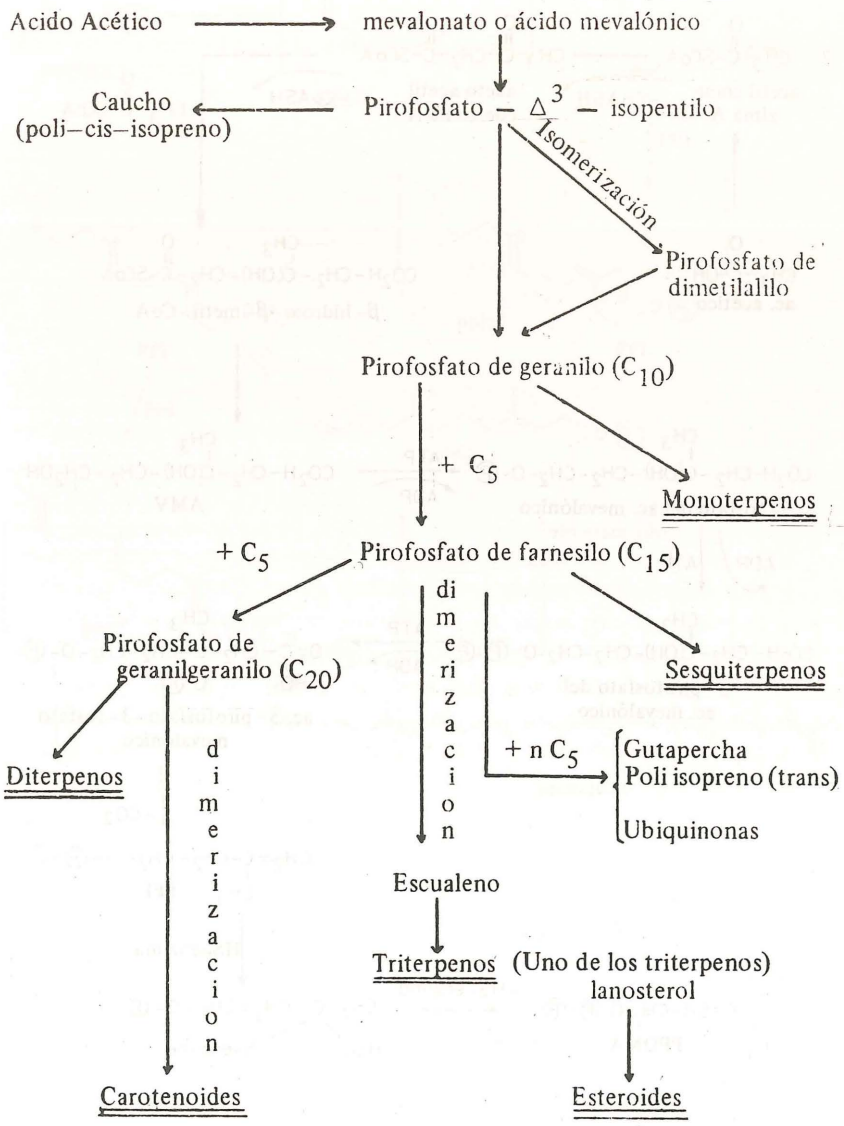


Fig. 2.- Esquema general de la biosíntesis de terpenoides y esteroides

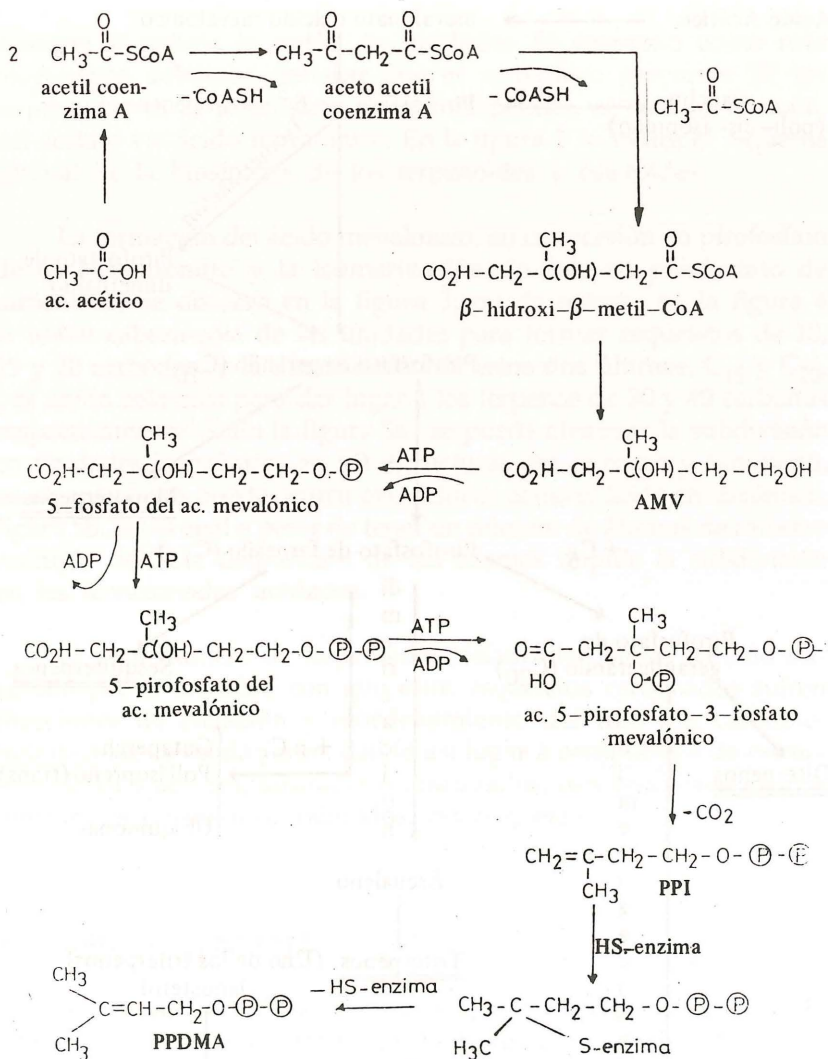


Fig. 3.- Formación del pirofosfato de Δ -³-isopentilo y su isomerización a pirofosfato de dimetilalilo (-O-P-P=pirofosfato)

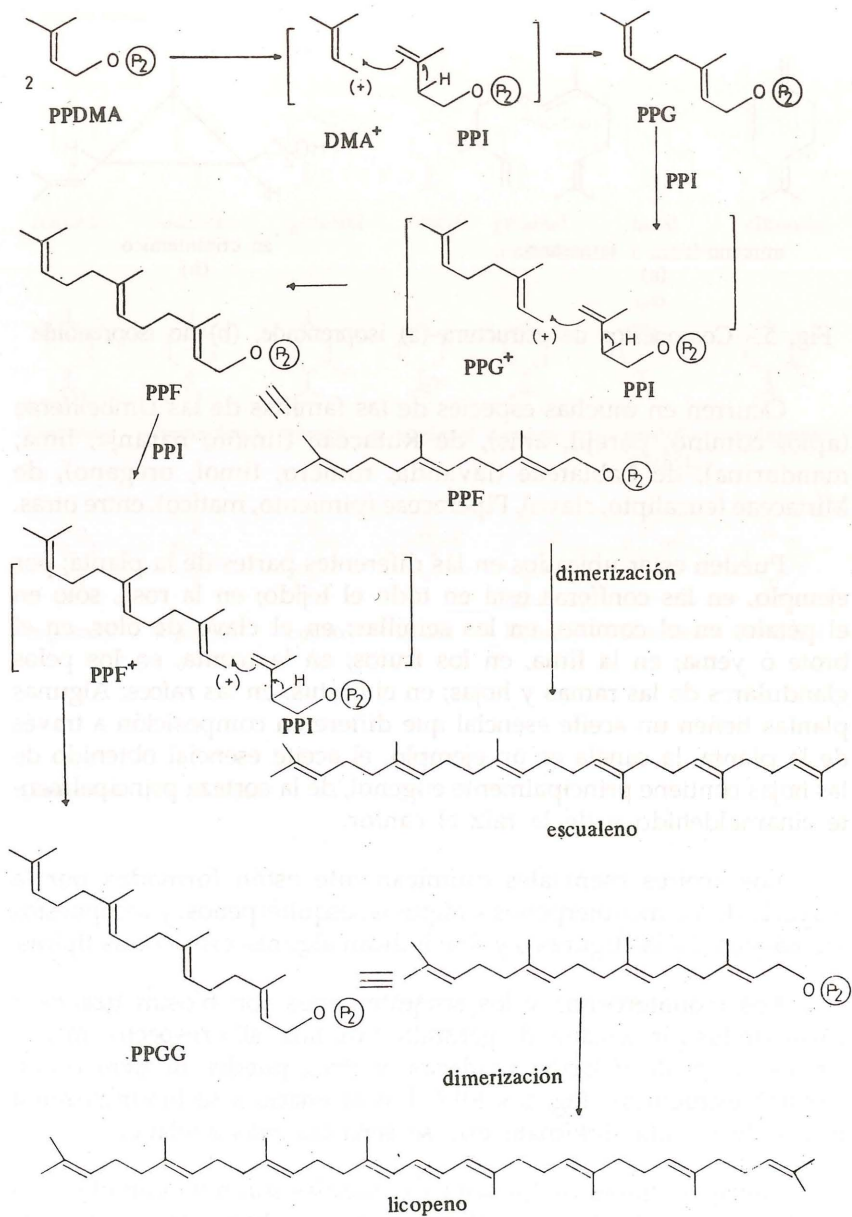
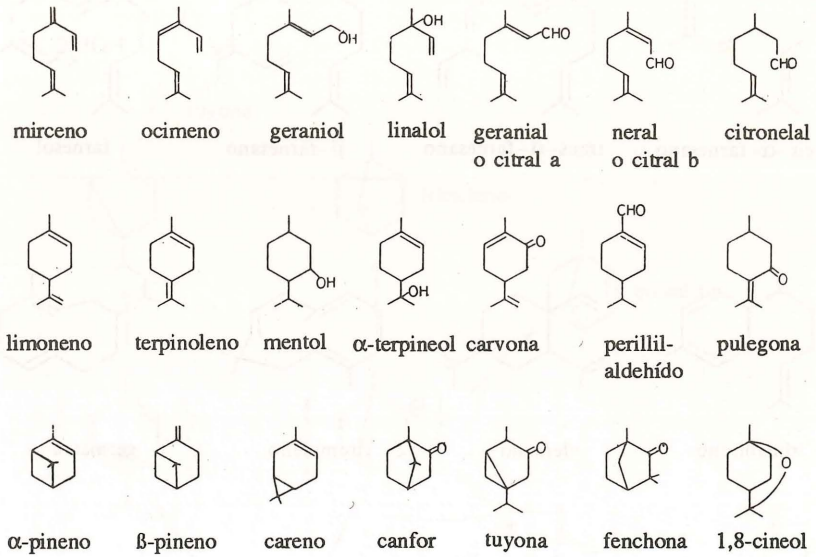


Fig. 4.- Esquema biosintético de terpenoides (-O P₂)=pirofosfato)

Monoterpenos



Aromáticos (ruta shikimato)

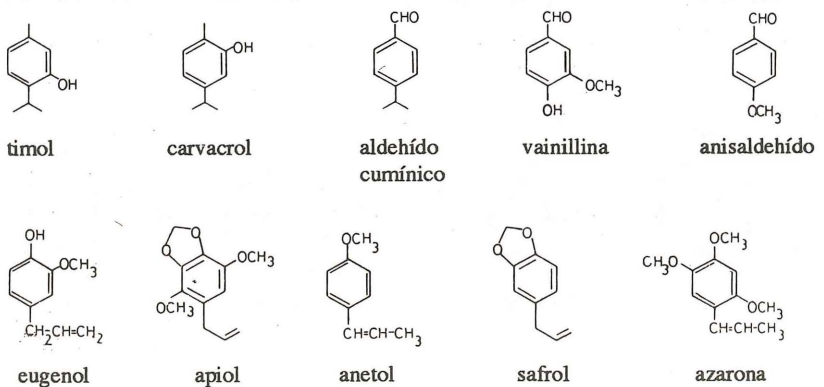
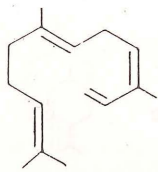
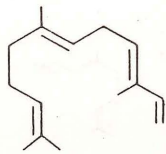


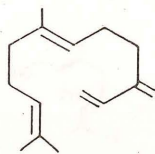
Fig. 6.- Algunos monoterpenos y aromáticos volátiles



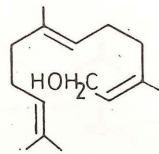
cis- α -farnesano



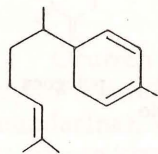
trans- α -farnesano



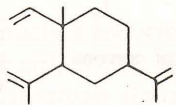
β -farnesano



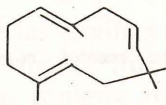
farnesol



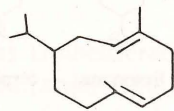
zingibireno



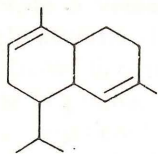
elemano



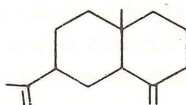
humuleno



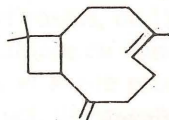
germacrano



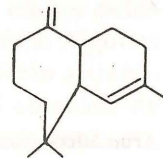
cadineno



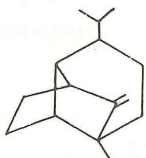
β -selineno



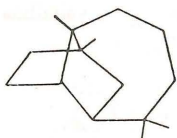
cariofileno



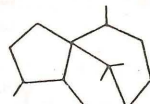
α -himachale



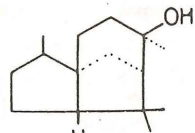
sativeno



longicanfano



ciperano



H
cedrol

Fig. 7.- Algunos sesquiterpenos

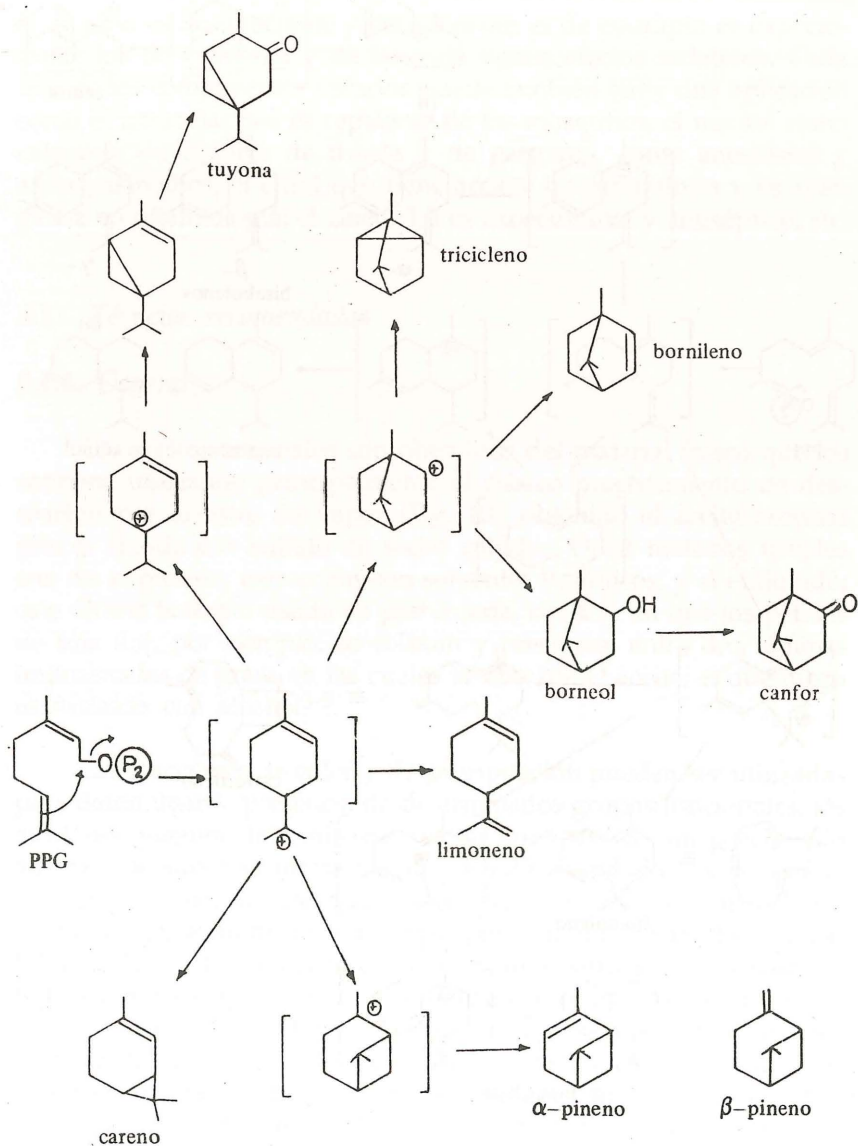


Fig. 8.- Esquema biosintético para algunos monoterpenos

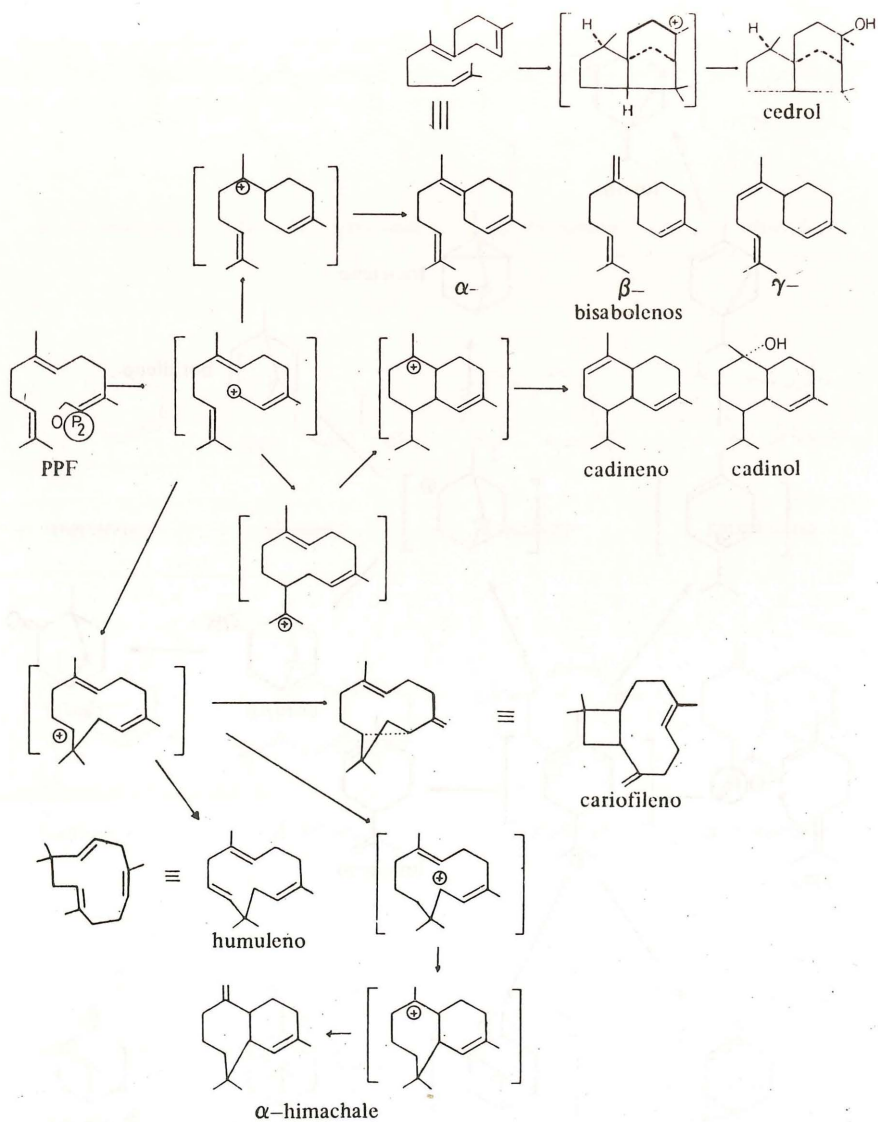


Fig. 9.- Esquema biosintético para algunos sesquiterpenos

dental y se utiliza además en la producción comercial de vainillina; el de pino es desinfectante y desodorante; el de eucalipto es expectorante; los de valeriana y de lavanda tienen efectos sedativos. Cada uno de los componentes aislados puede también tener una aplicación como el citronelal que es repelente de los mosquitos, el mentol como calmante de dolores de muela y de garganta, como anestésico y antiespasmódico; el citral que tiene acción antihistamínica y es analgésica en oftalmología; el cineol-1,8 es expectorante y antiséptico, etc.

3.1. Técnicas recomendadas

3.1.1. General

Los aceites esenciales son obtenidos del material fresco que los contiene utilizando principalmente el clásico procedimiento de destilación por arrastre de vapor (Fig. 10); obtenido el aceite esencial éste es secado con sulfato de sodio anhidro. Otros métodos usuales son de: expresión, extracción con solventes lipofílicos, y el enflorado; este último bastante usado en perfumería, consiste en que los pétalos de una flor, por ejemplo, se colocan y presionan entre dos láminas impregnadas de grasa en las cuales se absorbe el aceite, el que luego es extraído con alcohol³⁻⁵.

Las reacciones de color y de precipitación pueden ser utilizadas para determinar la presencia de determinados grupos funcionales: los alcoholes pueden determinarse por la aparición de un precipitado amarillo debido a la formación de xantato cuando la Ms es tratada con CS_2 y KOH; los aldehídos y cetonas por la formación de precipitado rojo, anaranjado o amarillo por reacción de la Ms con 2,4-DNFH; los ésteres reaccionan con una solución alcalina de hidroxilamina y aparecerá una coloración púrpura cuando se agrega gotas de solución de $FeCl_3$; los fenoles dan también coloraciones características con solución de $FeCl_3$; las insaturaciones pueden ser determinadas por la decoloración de una solución de bromo en CCl_4 o de una solución acuosa de $KMnO_4$; también es usada la prueba de tetranitrometano que revela la presencia de insaturaciones cuando aparece un color amarillo o rojo; los hidrocarburos aromáticos dan coloraciones en presencia de una gota de formaldehído y un mL de ácido sulfúrico^{5,6}.

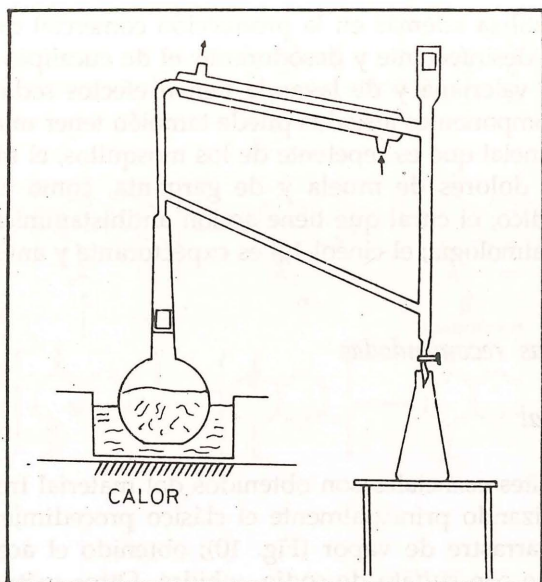


Fig. 10.- Equipo para la destilación por arrastre de vapor

El análisis por CCD puede realizarse utilizando gel de sílice, y sistemas de solventes como benceno, tolueno, cloroformo, acetato de etilo o mezclas binarias de ellos; ejemplos: tol:EtOAc (95:5, 93:7, ó 90:10), tol:CHCl₃ (25:75). Para terpenos conteniendo dobles enlaces las placas de gel de sílice pueden prepararse con una solución acuosa de AgNO₃ al 2,5% y utilizar sistemas como benceno, bz:EtOAc:Me₂CO (1:2:2), o CH₂Cl₂:CHCl₃:EtOAc:n-propanol (45:45:4,5:4,5); es también usual preparar las placas con una solución de NaOH 0,1N en vez de agua, para evitar isomerizaciones. En general la CCD es más usual para los compuestos oxigenados que para los hidrocarburos.

Como agentes cromogénicos pueden utilizarse: SbCl₃ al 5% en CHCl₃, solución acuosa de KMnO₄ al 0,25%, H₂SO₄ conc., vainillina-H₂SO₄ o anisaldehído-H₂SO₄; las placas deben ser calentadas a 100-105°C después del rociado para que se desarrollen los colores. Los compuestos con dobles enlaces o con grupos cetónicos pueden detectarse utilizando vapores de bromo o ser revelados con 2,4-DNFH, respectivamente^{5,7-9}.

La técnica más usual para el análisis cualitativo y cuantitativo es la CGL. En el caso de un aceite esencial de composición química conocida podría ser suficiente un cromatograma de gases; en otro caso sería indispensable un CG-EM para determinar cada uno de los componentes, o realizar la separación por CC o CCD, como se señaló antes, y cada uno de ellos analizados por espectroscopía UV, RMN y EM. El análisis por CG-EM para 64 aceites esenciales ha sido reportado por Masada¹⁰.

En las figuras 11 y 12 se muestran cromatogramas típicos correspondientes a los aceites de eucalipto y de citronela respectivamente. Puede observarse que en el aceite de eucalipto hay una concentración bastante alta de un componente, el cineol, mientras que en el aceite de citronela se observa una mezcla más compleja de constituyentes.

3.1.2. *Análisis espectrométricos*

El análisis por métodos espectrométricos de un aceite esencial constituido por una mezcla de compuestos puede ser utilizado para obtener una información sobre su posible composición, y asumir la ausencia o presencia de determinado grupo funcional.

En el espectro UV, absorciones intensas entre 202 y 210 nm y ninguna a mayores longitudes de onda sería indicativa de compuestos saturados o de la presencia de insaturaciones aisladas; entre 215 y 250 nm de la presencia de compuestos insaturados, y entre 250 y 270 nm de compuestos aromáticos. Los espectros UV de los aceites de eucalipto y de citronela (Fig. 13 y 14) indicarían la ausencia de compuestos aromáticos o su presencia en muy pequeña concentración, no así el del aceite de matico donde se observa absorciones a longitudes de onda mayores de 250 nm (Fig. 15).

En el espectro IR, la presencia de alcoholes puede ser detectada por las señales a $3600-3300\text{ cm}^{-1}$ y la naturaleza de ellos 1° , 2° ó 3° por las señales a $1200-950\text{ cm}^{-1}$, grupos carbonílicos por las señales a $1800-1650\text{ cm}^{-1}$, insaturaciones o anillos aromáticos por las señales entre $1670-1500\text{ cm}^{-1}$.

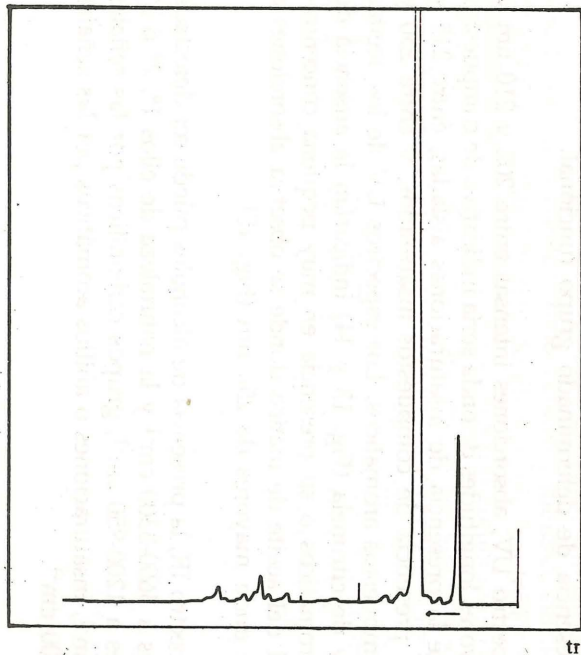


Fig. 11.- Cromatograma gas-líquido del aceite de eucalipto (PE 3920 B, columna SE-30 en Chrom. W, AW-DMCS 80/100 mesh, 0,22 mm d.i. x 1,8 m. longitud; programa de temperatura 4/80/8/250/16, temperatura de inyector e interfase 250°C)

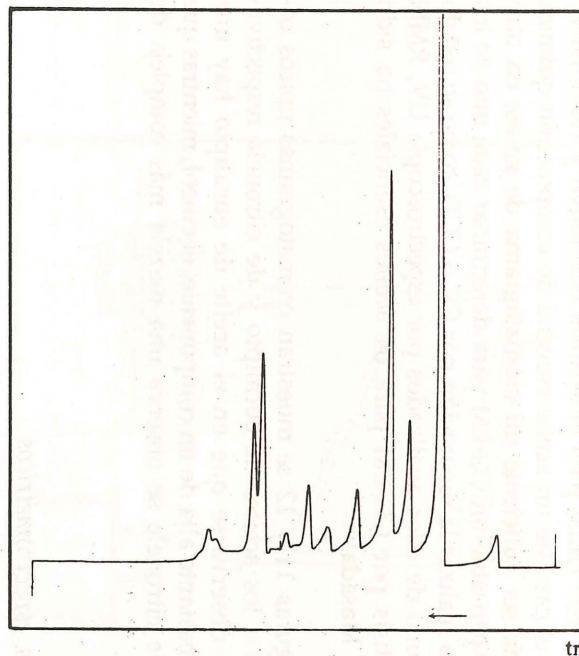


Fig. 12.- Cromatograma gas-líquido del aceite de citronela (PE 3920 B, columna 3% OV-17 en Chrom Q 100/120 mesh, 1,8 x 1/8", programa de temperatura 2/80/4/200/4, temperatura de inyector e interfase 250°C)

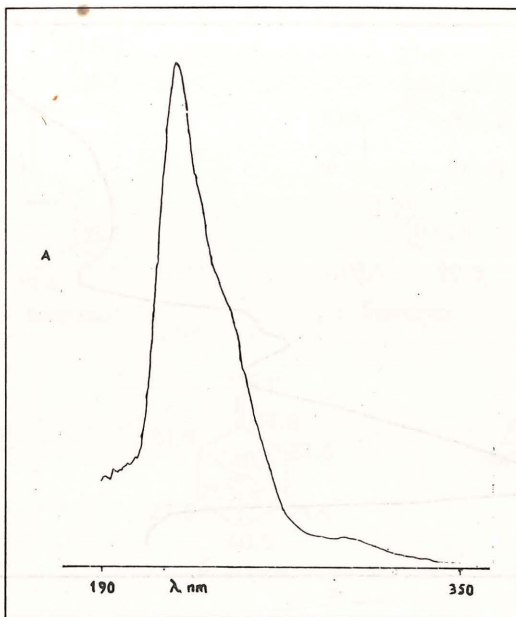


Fig. 13.- Curva de absorción en el ultravioleta del aceite de eucalipto

En el caso de compuestos puros desconocidos, además de los análisis espectroscópicos anteriores, es indispensable el análisis por RMN y por EM para la determinación estructural.

En el RMN-¹³C los diferentes tipos de carbono en un terpenoide presentan desplazamientos en los siguientes rangos: carbono metílico a 10-30 ppm; metilénico a 20-45 ppm, metínico a 25-55 ppm; cuaternario a 30-55 ppm; olefínico a 105-165 ppm; acetilénico a 65-95 ppm; alcohólico a 50-80 ppm y carbonílico a 180-220 ppm. En la figura 16 se muestra algunos terpenos con sus valores de desplazamiento observados para los diferentes carbonos^{11,12}.

En el EM la aparición de algunos fragmentos es indicativa de la presencia de determinados grupos funcionales; por ejemplo, M⁺-15, de metilo; M⁺-43, de isopropilo; M⁺-18, de hidroxilo; de fragmento m/z 29 a la presencia de grupo aldehído; de m/z 43 con una intensidad de 100%, de acetato (Fig. 17).

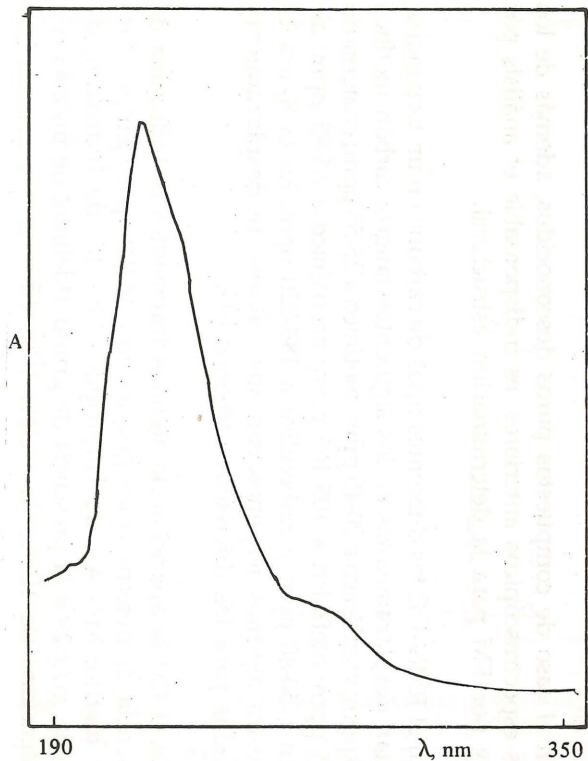


Fig. 14.- Curva de absorción en el ultravioleta del aceite de citronela

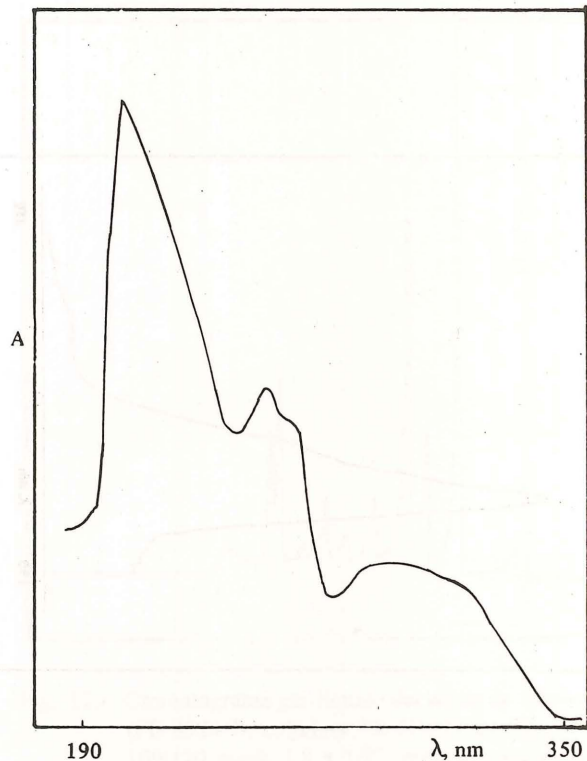
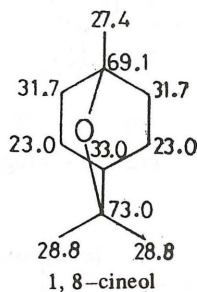
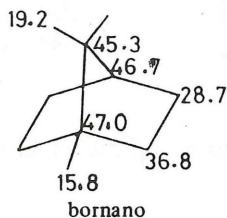
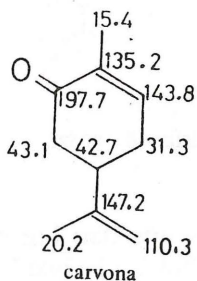
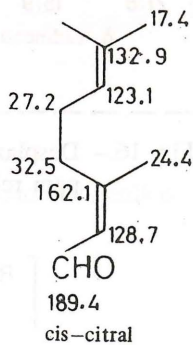
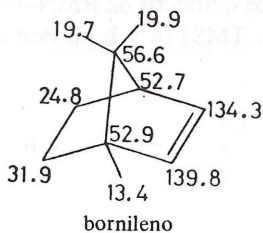
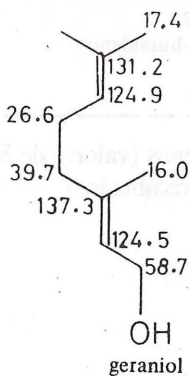
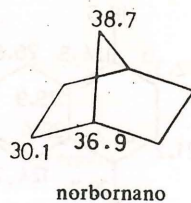
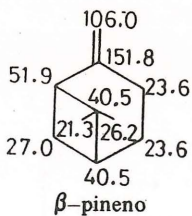
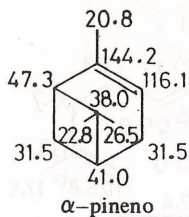
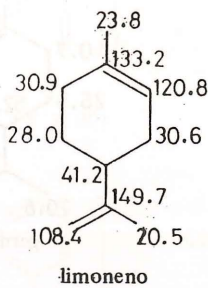
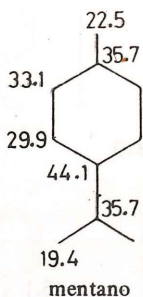


Fig. 15.- Curva de absorción en el ultravioleta del aceite de matico



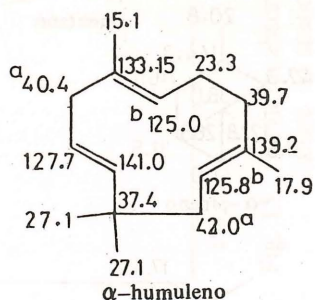
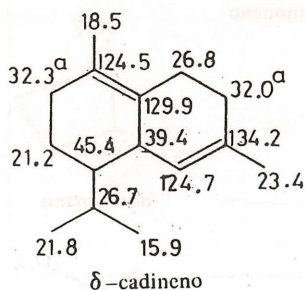
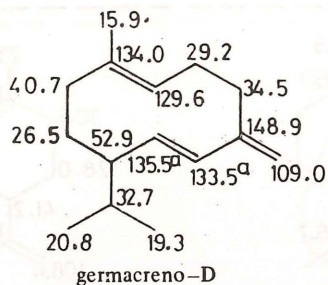


Fig. 16.- Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de terpenos (valores de δ ppm relativos a TMS) (a y b pueden estar intercambiados)

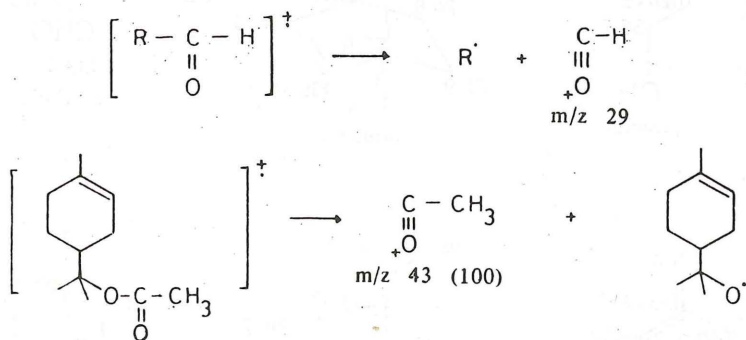


Fig. 17.- Fragmentaciones típicas en la espectrometría de masas

En la figura 18 se observa las fragmentaciones que dan lugar a los picos bases para el limoneno, α -terpineol, y alcohol feniletílico¹⁰.

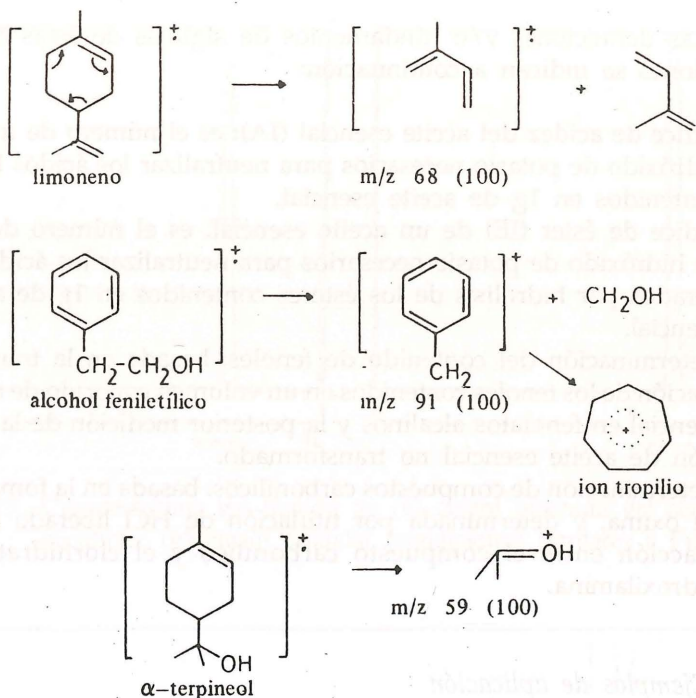


Fig. 18.- Picos bases de limoneno, α -terpineol y alcohol feniletílico

3.1.3. Determinación de los aceites esenciales

Las características de un aceite esencial son dadas en forma general mediante valores de índice de refracción, gravedad específica, rotación específica, rango de temperatura de ebullición, punto de cristalización o congelación, índice de acidez, índice de éster y más específicamente, cuando se conoce, en base a el(los) componente(s) principal(es), como el caso del aceite del eucalipto que se expresa como contenido de cineol; el de comino como aldehído cumínico (p-isopropilbenzaldehído); el de limón expresado como citral; el de citronela como citronenal; el de menta como contenido de carvona; el de salvia, de tuyona; el de orégano como contenido de fenoles (contiene principalmente timol y carvacrol); el de clavo expresado como eugenol, etc.

Las definiciones y/o fundamentos de algunas de estas determinaciones se indican a continuación:

- Índice de acidez del aceite esencial (IA): es el número de mg de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1g de aceite esencial.
- Índice de éster (IE) de un aceite esencial: es el número de mg de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los ésteres contenidos en 1g de aceite esencial.
- Determinación del contenido de fenoles: basada en la transformación de los fenoles contenidos en un volumen conocido de aceite esencial en fenolatos alcalinos y la posterior medición de la fracción de aceite esencial no transformado.
- Determinación de compuestos carbonílicos: basada en la formación de oxima, y determinada por titulación de HCl liberado de la reacción entre el compuesto carbonílico y el clorhidrato de hidroxilamina.

3.2. Ejemplos de aplicación

- *Aceite esencial de eucalipto*

De la destilación por arrastre de vapor de hojas frescas de eucalipto se obtuvo un aceite esencial de IA 0.4921 e IE 1.4039¹³.

El CGL presentó dos picos principales con tr 194 y 320 segundos correspondientes al α ó β -pineno y cineol respectivamente (Fig. 11).

De la destilación al vacío (5 mm Hg) del aceite de eucalipto se separó el cineol con una pureza no menor de 98% (Fig. 19a). El cromatograma del cineol estándar se observa en la figura 19b.

El espectro RMN-¹H del cineol se muestra en la figura 20.

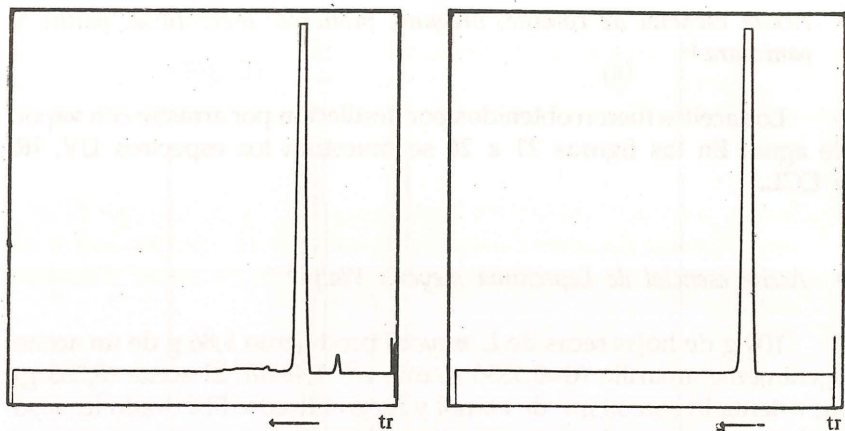


Fig. 19.—Cromatograma gas-líquido de (a) cineol obtenido del aceite de eucalipto, (b) cineol estándar (condiciones similares a Fig. 11)

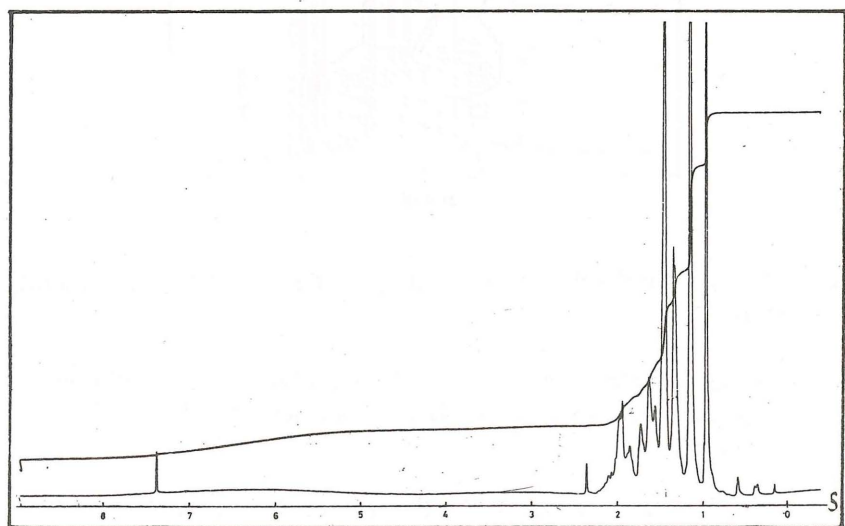


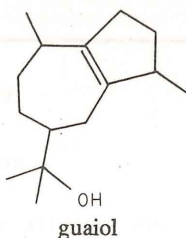
Fig. 20.— Espectro de resonancia magnética nuclear del cineol

- *Aceite esencial de comino, orégano, pimienta, hierbaluisa, palillo y panizzara.*¹⁴

Los aceites fueron obtenidos por destilación por arrastre con vapor de agua. En las figuras 21 a 26 se muestran los espectros UV, IR y CGL.

- *Aceite esencial de Lepechinia meyenii Walp*¹⁵

100 g de hojas secas de *L. meyenii* produjeron 1,86 g de un aceite ligeramente amarillo ($d=0,9836$ g/mL, $n^{20} 1,4810$). El aceite (0,283 g) fue calentado con 30 mL de etanol y luego filtrado. El filtrado lechoso se dejó en reposo durante tres días, obteniéndose agujas cristalinas amarillentas las que luego de ser purificadas dieron 0,094 g de agujas incoloras de pf 86,5-87°C. Las agujas fueron caracterizadas como el sesquiterpeno guaiol por correlación de sus datos espectroscópicos:

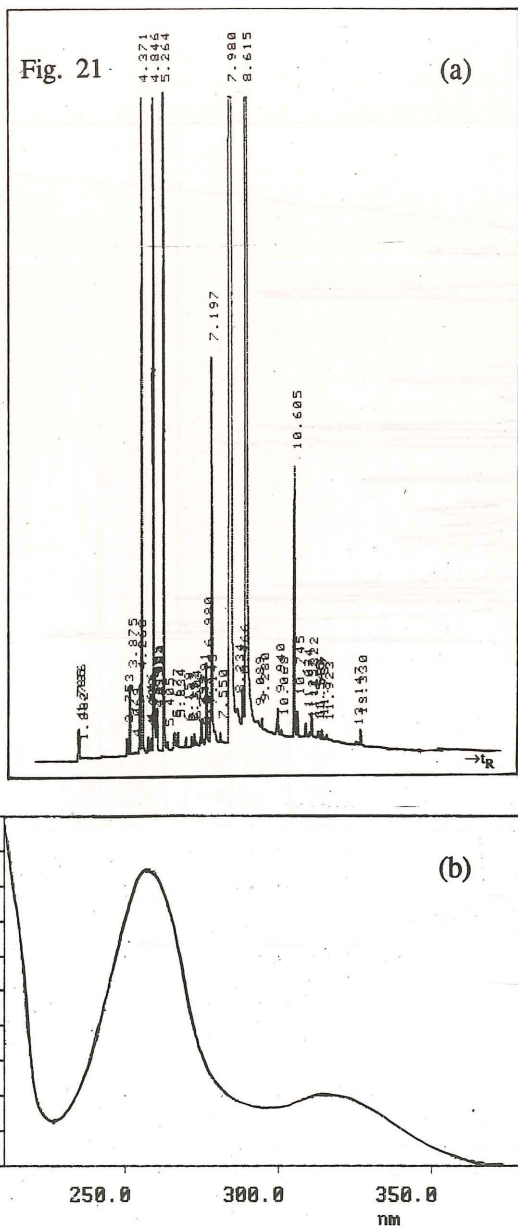


IR ν_{\max}^{KBr} , cm^{-1} 3374 (OH), 2924, 2920 (CH_2 , CH_3), 1370 (gem-dimetil), 1150 (CO)

RMN-¹H (350 MHz, CDCl_3), 1,19 (3H, s); 1,16 (3H, s); 0,98 (3H, d, $J=6,4$ Hz); 0,95 (3H, d, $J=6,4$ Hz) y señales complejas entre 1,2-2,6 (13H), ppm.

RMN-¹³C (62,9 MHz, CDCl_3) 15 señales a 139,99; 138,86; 73,52; 49,57; 46,26; 35,34; 33,74; 33,64; 30,89; 27,82; 27,33; 27,29; 25,90; 19,90; 19,73, ppm

APT: señales para 4 grupos metilos (19,73; 19,90; 25,90; 27,33); 5 grupos metilenos (27,29; 27,82; 30,89; 33,73; 35,34), 3 grupos metino (33,63;



Todos los cromatogramas fueron corridos en un HP 5890-A, columna capilar HP-1, 0.2 mm DI, 25m longitud, programa de temperatura 2/100/10/250/10; temperatura de inyector e interfase 250 °C. Los espectros UV fueron medidos en metanol y los IR en KBr.

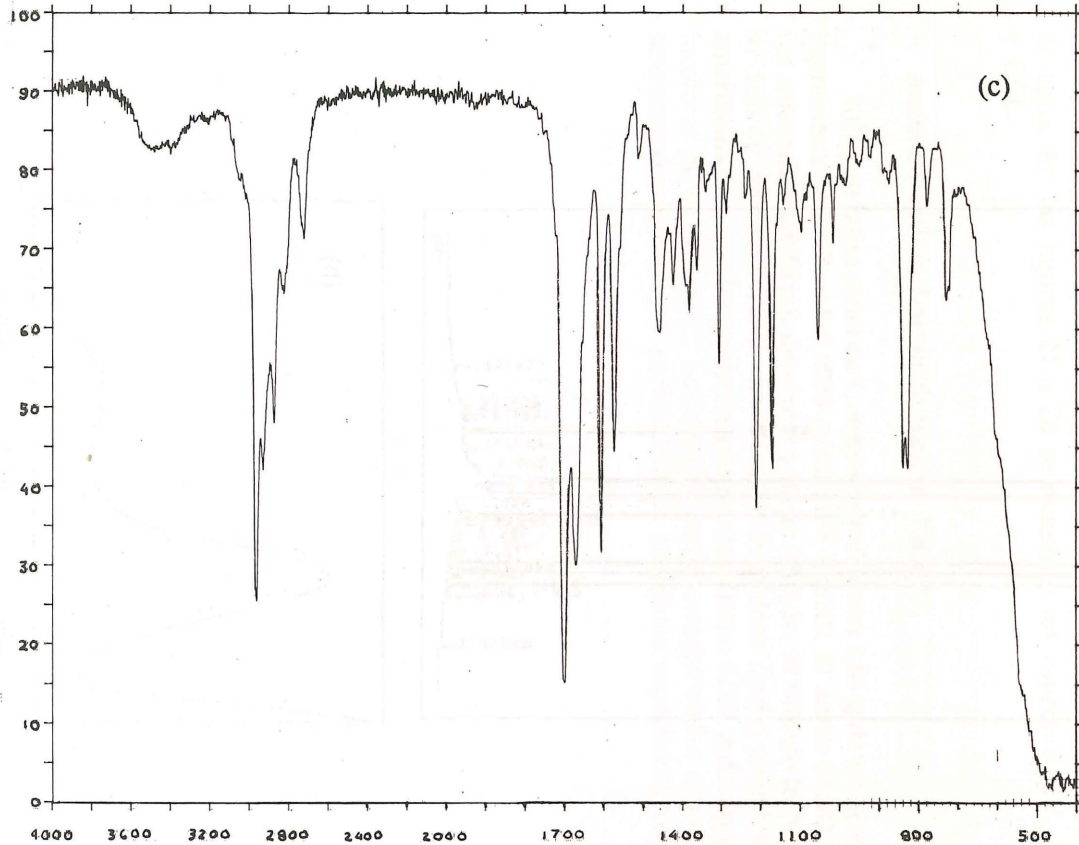
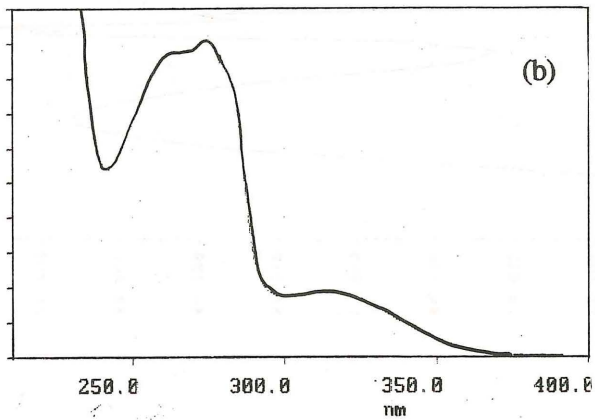
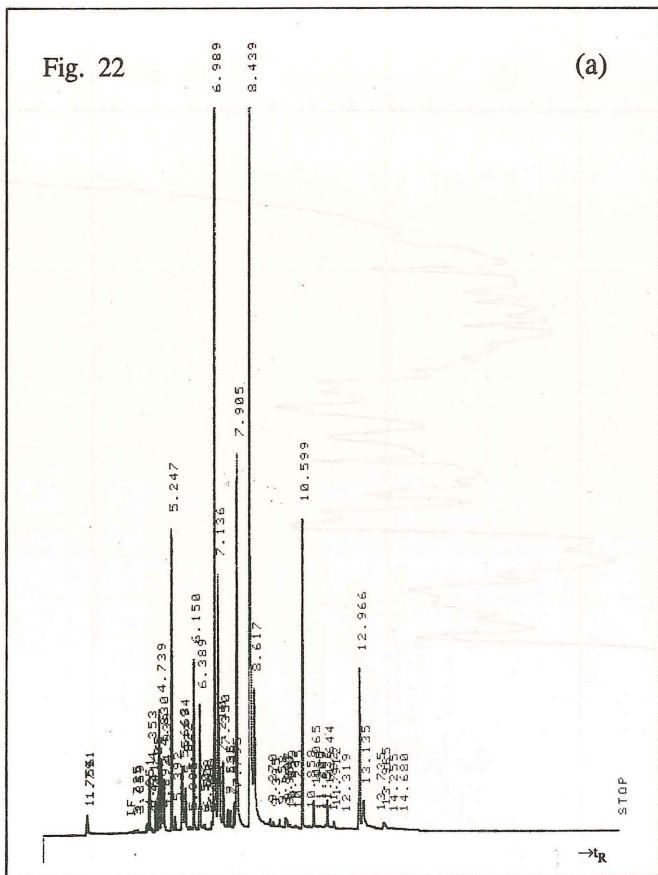


Fig. 21.- Aceite esencial de comino a) cromatograma gas-líquido b) espectro ultravioleta, c) infrarrojo,



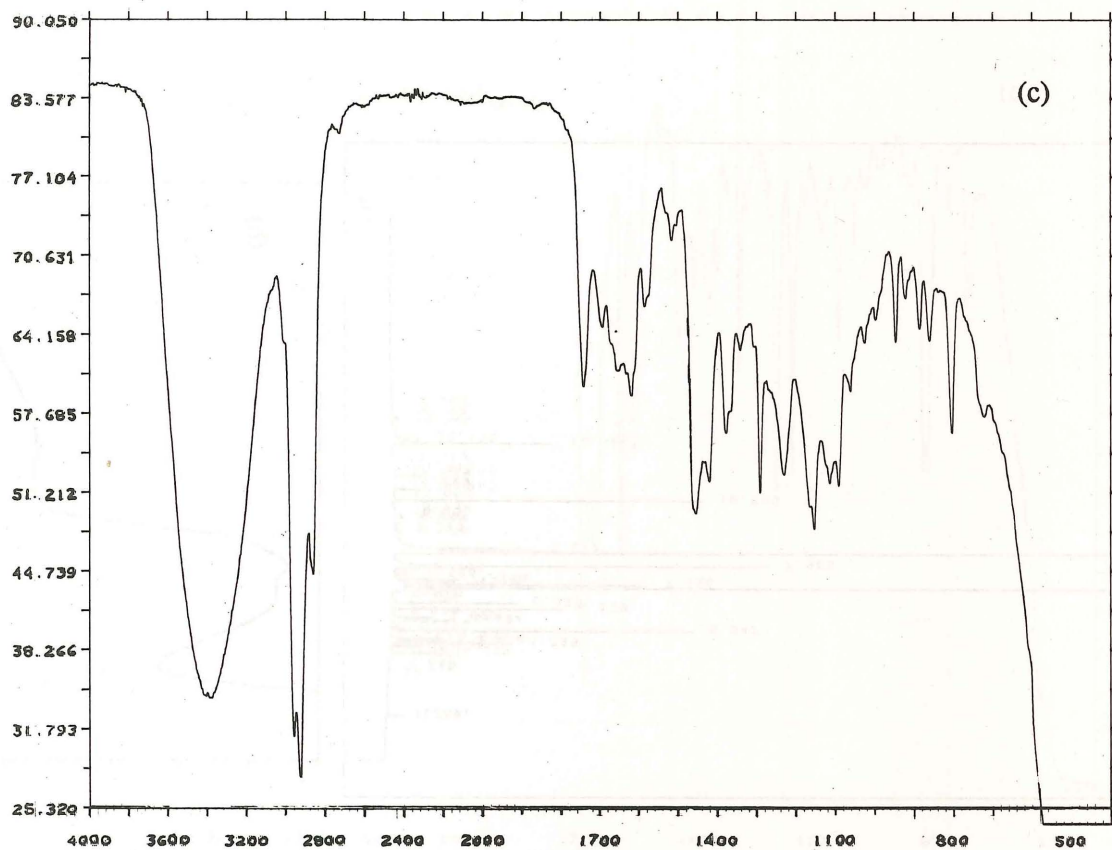
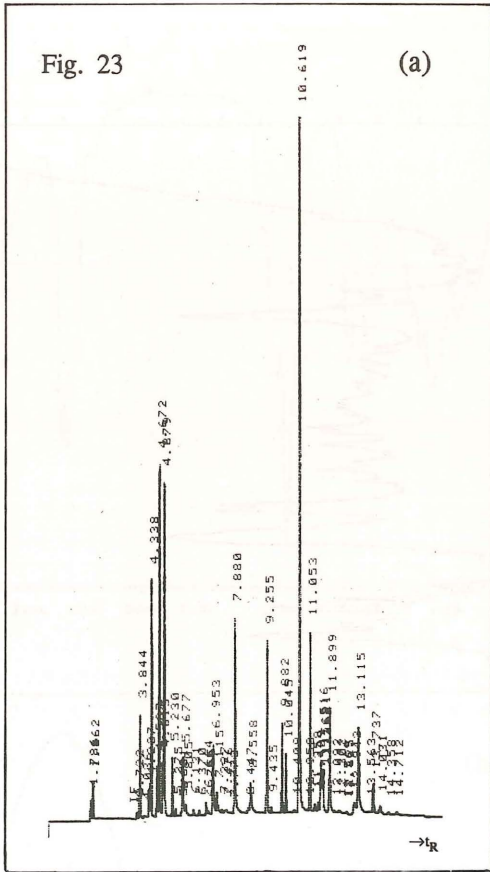


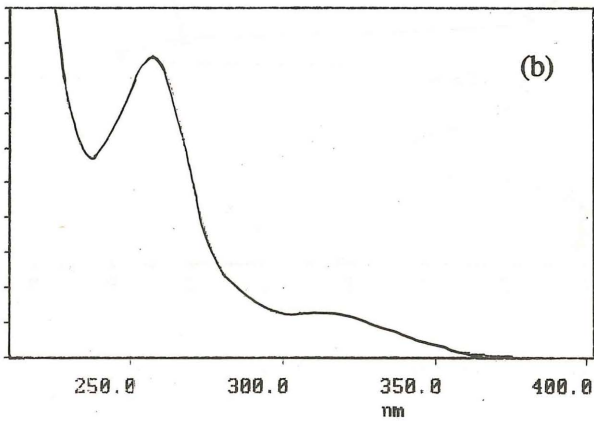
Fig. 22.- Aceite esencial de orégano a) cromatograma gas-líquido b) espectro ultravioleta, c) infrarrojo,

Fig. 23

(a)



(b)



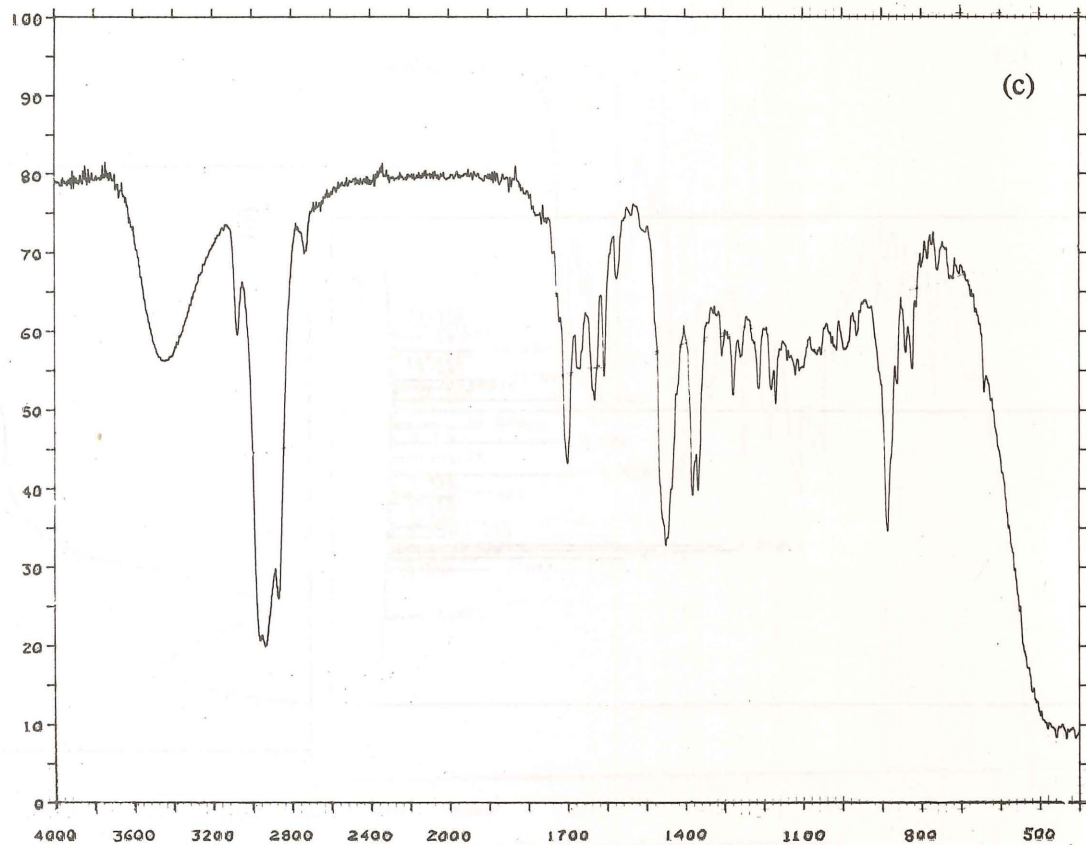


Fig. 23.- Aceite esencial de pimienta a) cromatograma gas-líquido b) espectro ultravioleta, c) infrarrojo,

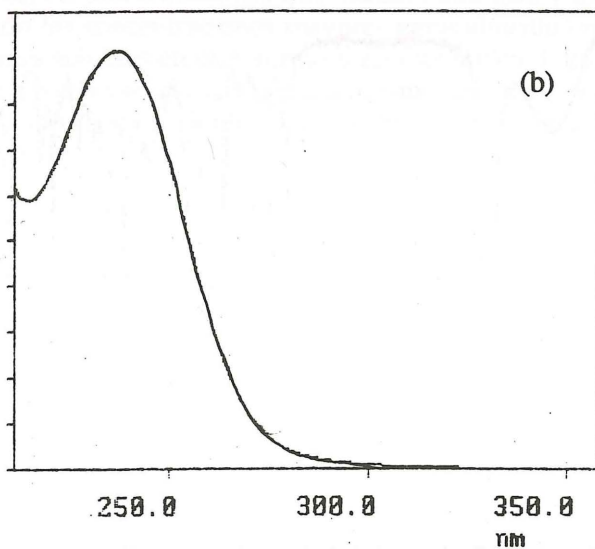
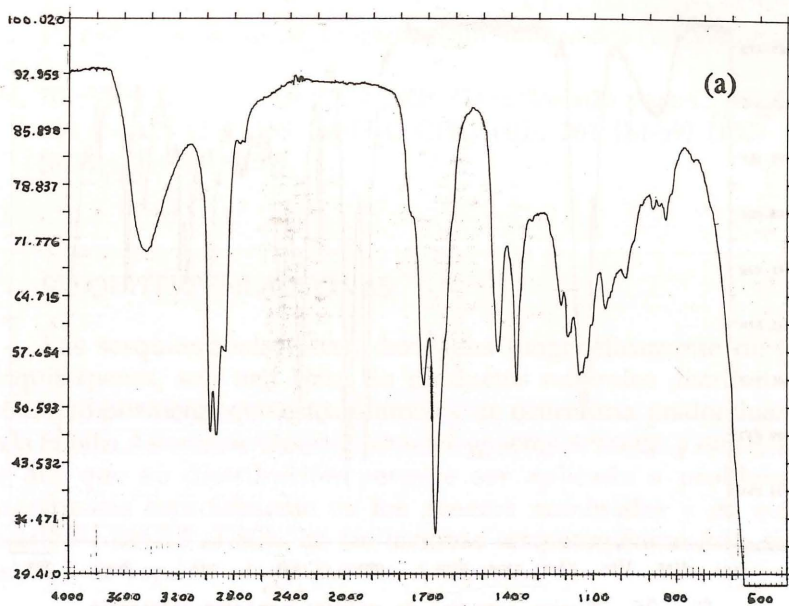


Fig. 24.- Aceite esencial de hierba luisa a) espectro ultravioleta, b) infrarrojo

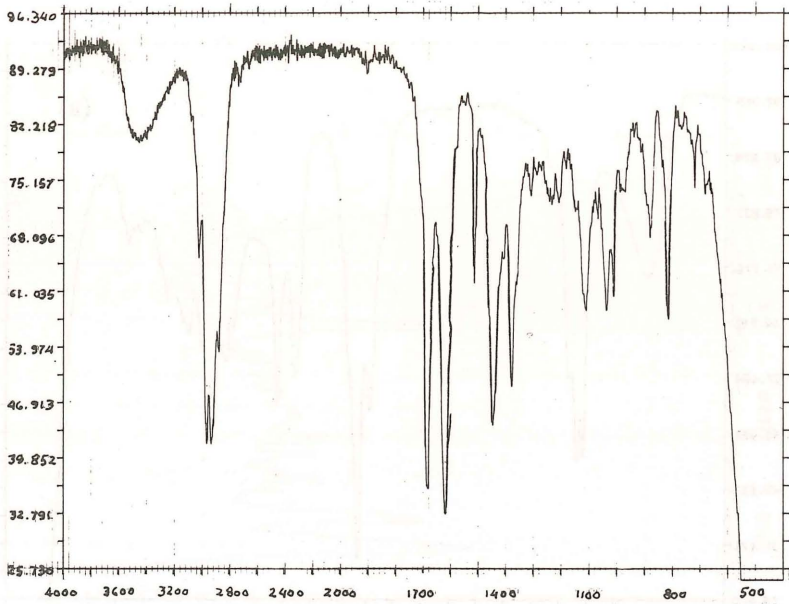


Fig. 25.- Aceite esencial de palillo: espectro infrarrojo

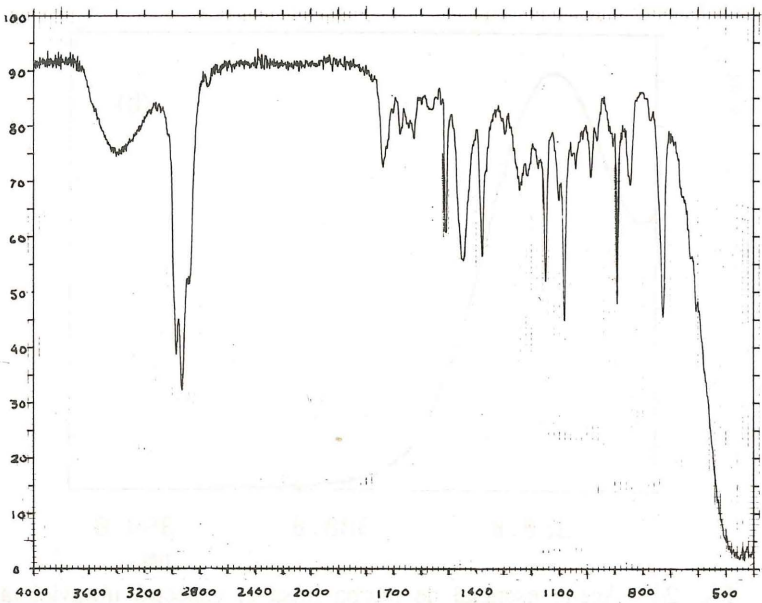


Fig. 26.- Aceite esencial de panizzara: espectro infrarrojo

46,26; 49,57), 1 carbón cuaternario enlazado a un oxígeno (73,52) y 2 carbonos olefínicos completamente substituídos (139,99;138,86).

EM, 70 eV, m/z (int. relat.) 222 [M]⁺ (2) (calculado para C₁₅H₂₆O), 204 [M-18] (20), 189 [M-H₂O-CH₃] (10), 161 [M-59] (100), 59 [(CH₃)₂C=OH]⁺ (59).

4. SESQUITERPENLACTONAS

Las sesquiterpenlactonas, derivadas biogénicamente de los sesquiterpenos, son una clase de productos naturales distribuidos menos ampliamente que estos últimos y de ocurrencia predominante en la familia Asteraceae (notablemente en géneros *Artemisia* y *Ambrosia*), de allí que su distribución permite ser aplicada a problemas taxonómicos especialmente en los géneros nombrados y en otras taxas¹⁶⁻¹⁸. Del 25 al 80% de las lactonas sesquiterpénicas han sido aisladas de especies de la familia Asteraceae.

Son sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de la planta, en concentraciones que varían entre 0,01 y 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas; son bastantes solubles en cloroformo y en éter etílico. Presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, antitumoral, analgésica, inhibidores del crecimiento de bacterias, entre otras¹⁹⁻²⁸.

El rápido desarrollo de las técnicas analíticas hace que el conocimiento de estos compuestos haya incrementado notablemente en los últimos años: prueba de ello son las aproximadamente 1100 sesquiterpenlactonas conocidas al año 1980, contra las 600 en 1976, las 350 en 1970 y las pocas decenas conocidas en 1950; son de estructuras muy diversas, resultantes de una variedad de ciclaciones, fusiones de anillo, oxidaciones, esterificaciones, etc., pero con un anillo característico de γ -lactona- α,β -insaturada.

Estos compuestos lactónicos son primariamente clasificados en base a su esqueleto carbocíclico como germacranólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudoguaianólidos, entre otros (el sufijo ólido se refiere a la función lactona) (Fig. 27).

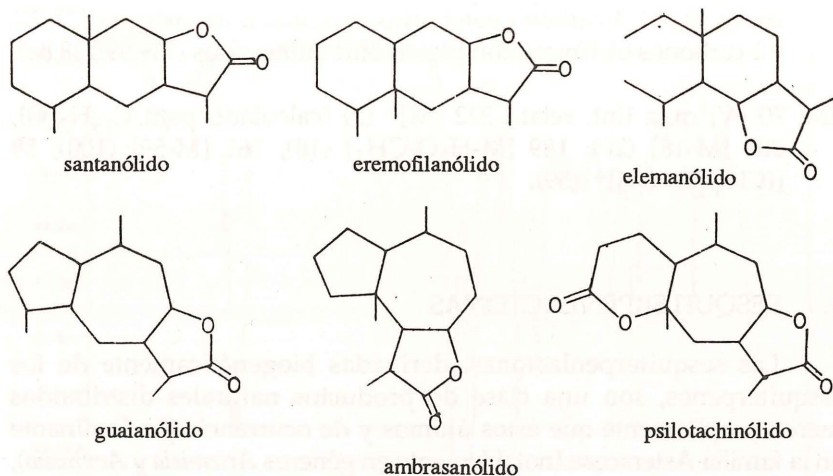


Fig. 27.- Algunos esqueletos carbonados típicos de sesquiterpenlactonas

Los estudios demuestran que el anillo de lactona se forma a partir del grupo isopropenilo de un sesquiterpeno, a través de las reacciones que se indican en la figura 28, produciéndose el cierre de anillo en el C-6 ó el C-8^{1,29}.

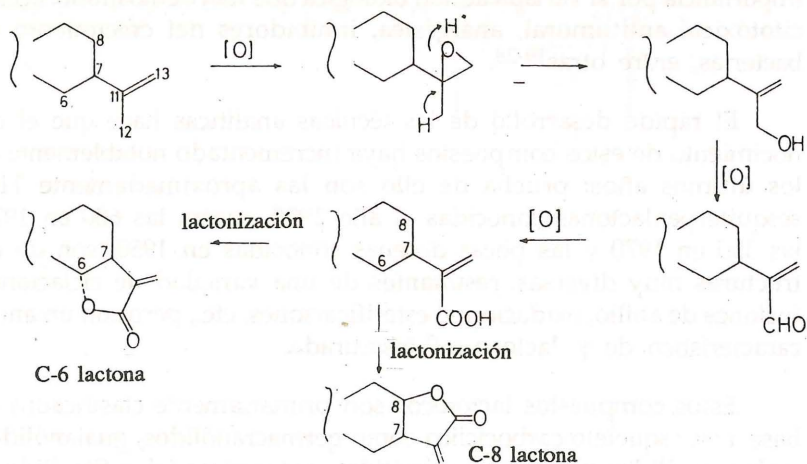


Fig. 28.- Formación del anillo de lactona

Se ha demostrado también que hay una relación biogénica entre el germacranólido y las otras sesquiterpenolactonas según puede observarse en el esquema de la figura 29³⁰.

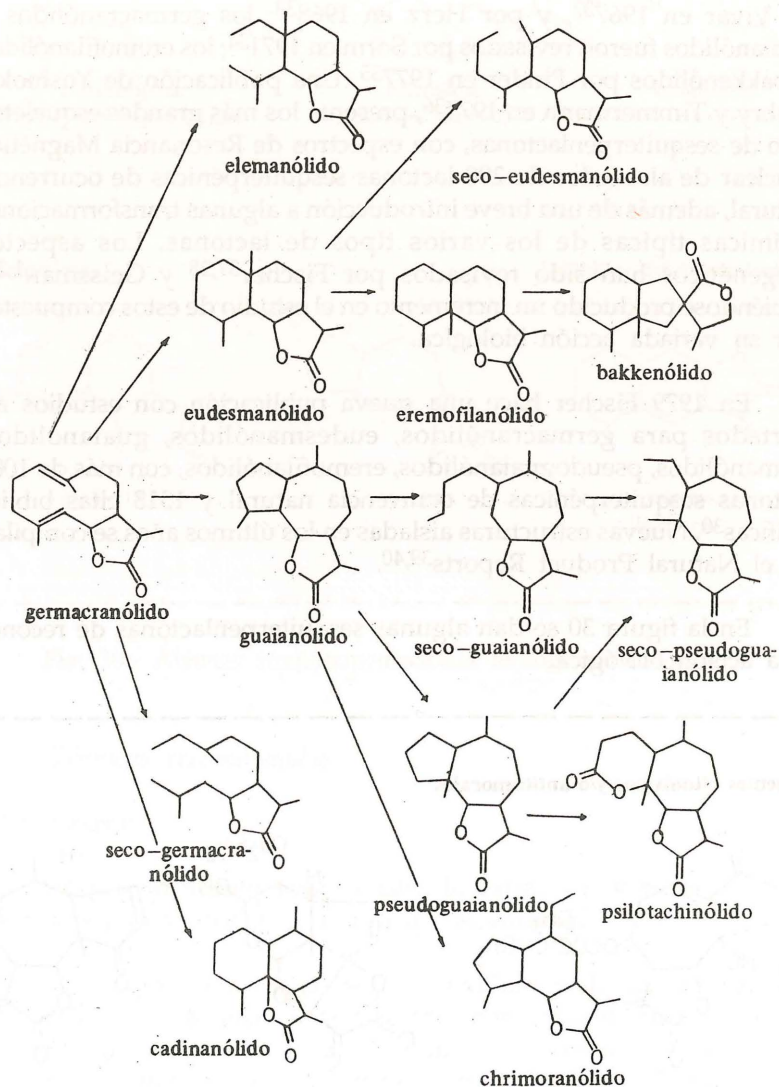


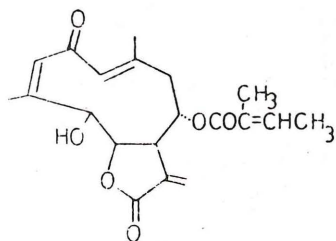
Fig. 29.- Relaciones biogénicas del germacranólido con otras sesquiterpenolactonas

Durante los últimos años han aparecido muchas publicaciones relacionadas con el aislamiento, elucidación de estructura y, química de sesquiterpenlactonas. Los primeros estudios de este campo fueron resumizados por Korte en 1959³¹; los pseudoguaianólidos por Romo de Vivar en 1967³², y por Herz en 1968³³; los germacranólidos y guaianólidos fueron revisados por Sorm en 1971³⁴; los eremofilanólidos y bakkenólidos por Pinder en 1977³⁵. Una publicación de Yoshioka, Mabry y Timmermann en 1973³⁶, presenta los más grandes esqueletos tipo de sesquiterpenlactonas, con espectros de Resonancia Magnética Nuclear de alrededor de 200 lactonas sesquiterpénicas de ocurrencia natural, además de una breve introducción a algunas transformaciones químicas típicas de los varios tipos de lactonas. Los aspectos biogénéticos han sido revisados por Fischer^{37,38} y Geissman^{1,29}, habiéndose producido un incremento en el estudio de estos compuestos por su variada acción biológica.

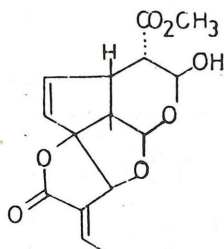
En 1979 Fischer hace una nueva publicación con estudios reportados para germacranólidos, eudesmanólidos, guaianólidos, elemanólidos, pseudoguaianólidos, eremofilanólidos, con más de 1000 lactonas sesquiterpénicas de ocurrencia natural y 1313 citas bibliográficas³⁰. Nuevas estructuras aisladas en los últimos años se compilan en el Natural Product Reports^{39,40}.

En la figura 30 se dan algunas sesquiterpenlactonas de reconocida acción biológica.

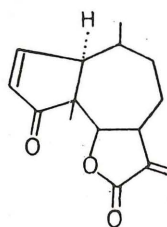
Agentes citotóxicos y/o antitumorales



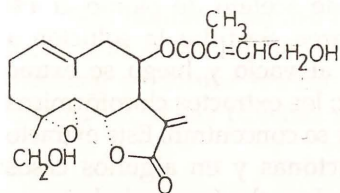
molefantinina
Elephantus mollis



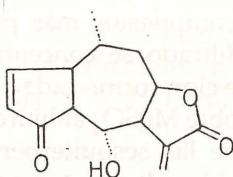
allamandina
Allamanda cathartica



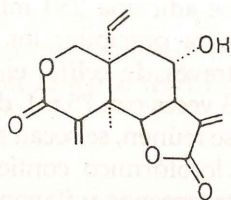
ambrosina
Ambrosia cumanensis



eupahispina
Eupatorium hyssopifolium

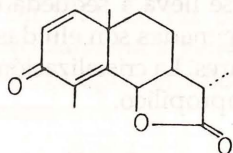


helenalina
Helenium autumnale

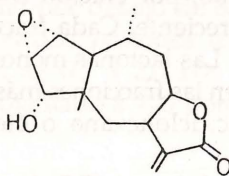


vernolepina
Vernonia hymenolepsis

Analgésicos

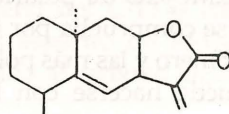


santonina



amatolina

Inhibidor del crecimiento



alantolactona
Inula sp.

Fig. 30.- Algunas sesquiterpenlactonas biológicamente activas

4.1. Técnicas recomendadas

4.1.1. General

Un procedimiento general para la extracción y separación de las sesquiterpenlactonas se indica a continuación:

A 100 gramos de hojas secas y molidas se le agrega 500 mL de CHCl_3 grado técnico, y se deja en reposo durante una noche. El extracto clorofórmico se filtra, el filtrado verde oscuro se evapora a una masa resinosa, la cual es disuelta en EtOH 95% (250 mL). Si el jarabe espeso no se disuelve fácilmente la solución se calienta a baño de vapor por 5 minutos, y se deja luego a temperatura ambiente.

Se adiciona 250 mL de solución acuosa de acetato de plomo al 4% para precipitar los compuestos más polares. Se filtra la solución a través de celita, el filtrado se concentra al vacío y luego se extrae 3 veces con 75 mL de cloroformo cada vez; los extractos clorofórmicos se reúnen, se secan sobre MgSO_4 anhidro y se concentran. Este extracto clorofórmico contiene las sesquiterpenlactonas y en algunos casos triterpenos y flavonoides altamente metilados; el número de lactonas se determina por CCD usando silicagel G con sistemas como $\text{bz}:\text{Me}_2\text{CO}$ (4:1) o $\text{CHCl}_3:\text{Et}_2\text{O}$ (5:1) y revelando con vapores de yodo o con solución acuosa de KMnO_4 al 5%²¹.

La separación de las lactonas puede hacerse por CC disolviendo 5 g del extracto en $\text{bz}:\text{Me}_2\text{CO}$ (2:1) y cromatografiando sobre gel de sílice empacada en benceno, por elución con benceno y mezclas de $\text{bz}:\text{Me}_2\text{CO}$ de polaridad creciente. Cada fracción se lleva a sequedad y se comprueba por CCD. Las lactonas menos oxigenadas son eluidas primero y las más polares en las fracciones más polares. La cristalización puede hacerse con $\text{EtOAc}:\text{ciclohexano}$ o éter isopropílico.

Otros sistemas para eluir una CC de un extracto clorofórmico o diclorometano, tratado o no previamente con soluciones acuosas de acetato de plomo, son: $\text{CHCl}_3:\text{Me}_2\text{CO}$ (95:5, 90:10, 80:20,...)⁴¹, $\text{CHCl}_3:\text{acetato de n-propilo}$ (7:3, 1:1, 2:3, 1:2)⁴², $\text{bz}:\text{EtOAc}$ (8:2, 7:3,...)⁴³, $\text{EP}:\text{Et}_2\text{O}$ (3:1, 2:1,...)⁴⁴.

En la CCD se utiliza además otros sistemas como $\text{bz}:\text{MeOH}$ (9:1), $\text{bz}:\text{Et}_2\text{O}$ (2:3), $\text{CHCl}_3:\text{Et}_2\text{O}$ (4:1), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99:1), $\text{EP}:\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ (2:2:1), y aunque la gel de sílice es el adsorbente más usual también se reporta el uso de alúmina en sistemas como $\text{bz}:\text{CHCl}_3$, en mezclas de polaridad creciente.

La técnica de HPLC ha dado buenos resultados para la separación de mezclas de sesquiterpenlactonas, utilizando columnas de fase reversa $\mu\text{-Bondapak C-18}$ y eluidas con una mezcla de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1)⁴⁵.

Como agentes cromogénicos aparte de los ya señalados, puede utilizarse H_2SO_4 conc. o al 50%, o vainillina al 1% en etanol; luego del calentamiento de la placa por 5 min a 100-105°C aparecerán manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules.

Son también usuales las reacciones químicas de color para detectar el anillo de lactona, entre ellas la reacción con cloruro de hidroxilamina y cloruro férrico para producir los hidroxamatos férricos coloreados, o las pruebas de Baljet y de Legal^{5,6}.

4.1.2. Análisis espectrométricos

Debido a la gran variedad de esqueletos carbonados no es posible dar características espectrales de un único esquema; sin embargo, algunos valores pueden ser característicos como la absorción UV entre 205-212 nm (ϵ 14000-5000), la señal a 1750 cm^{-1} en el IR para el anillo de γ -lactona- α,β -insaturada y la aparición en el RMN- ^1H de dos dobletes generalmente uno por debajo de 6,0 ppm y otro por encima con $J=1,0-4,0$ Hz para los dos protones α -metileno del C-13 y con acoplamientos geminales de 0,7 a 2,0 Hz. En el espectro de RMN- ^{13}C es típico el valor aproximado a 170 ppm debido al carbono lactónico.

En el EM también los modelos de fragmentación son bastante diferentes, de acuerdo al tipo de sesquiterpenlactona; por ejemplo, para esqueletos pseudoguaianólidos puede revisarse las referencias 46 y 47.

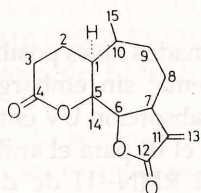
Algunos ejemplos de sesquiterpenlactonas con sus valores espectroscópicos reportados se muestran en las Tablas 1^{48,49}, 2⁴¹, 3^{48,50}.

4.2. Ejemplos de aplicación

- *Sesquiterpenlactonas de Neurolaena lobata* (L.) R.Br.

250 g de hojas secas y molidas de *Neurolaena lobata* se extrae con éter de petróleo (40-60°C, 500 mL) y luego con cloroformo (500 mL). El extracto clorofórmico se filtra, concentra (8 g) y cromatografía en silicagel con bz:EtOAc (8:2 y 7:3). De la primera fracción se aísla 100 mg de neurolanina-B y de la fracción bz:EtOAc (7:3) una mezcla de lobatina-A y lobatina-B; esta mezcla fue posteriormente separada por CCDP con bz: EtOAc (7:3) obteniéndose 28 y 21 mg respectivamente (Fig. 31)⁴³.

Tabla 1.- Valores espectroscópicos reportados para la psilotachina C y altamisina^{48,49}



psilotachina C⁴⁸

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ nm 220 (ϵ 10000)

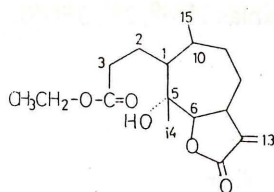
IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ (nujol) cm^{-1} 1775 γ -lactona
1730 δ -lactona
1665 estir. C=C

RMN-¹H, δ ppm, CDCl_3 , TMS est.int.

H-15 1,00 (3H, d, $J=7,0$ Hz)
H-14 1,27 (3H, s)
H-7 3,40 (H, m)
H-6 4,66 (1H, d, $J=9,0$ Hz)
H-13a 5,64 (1H, d, $J=3,5$ Hz)
H-13b 6,20 (1H, d, $J=3,5$ Hz)

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ nm 212 (ϵ 12700)

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 1768 γ -lactona
1725 C=O éster
3530 OH_3°



altamisina⁴⁹

RMN-¹H, δ ppm, CDCl_3 , TMS est. int.

H-14 1,2 (3H, s)
H-15 1,72 (3H, s.a.)
H-6 4,70 (1H, d, $J=9,0$ Hz)
H-13a 5,46 (1H, d, $J=3,5$ Hz)
H-13b 6,16 (1H, d, $J=3,5$ Hz)
OH *4,88 (s, intercambia

con D_2O)

OCH_2CH_3 4,10 (2H, c,
 $J=7,0$ Hz)

OCH_2CH_3 1,24 (3H, t,
 $J=7,0$ Hz)

* (en DMSO-d_6)

Tabla 2.- Desplazamientos químicos de los protones del linearilobin-A⁴¹

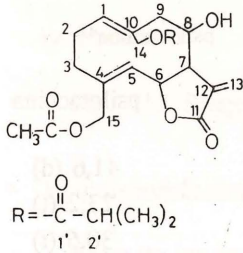
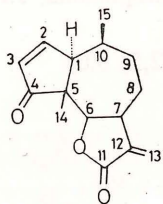
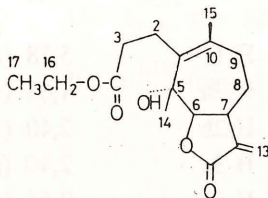
	Protón	δ ppm, (multiplicidad, J:Hz)
 <p>linearilobin-A</p>	H-1	5,18 (dd, 12,5, 5,0)
	H-2a	1,63 (m)
	H-2b	2,40 (m)
	H-3a	2,40 (m)
	H-3b	2,64 (m)
	H-5	5,04 (a.d., 10,5)
	H-6	5,27 (dd, 10,5, 8,5)
	H-7	2,79 (m)
	H-8	4,62 (m)
	H-9a	2,22 (m)
	H-9b	2,96 (dd, 15,0, ca 6,0)
	H-13a	5,62 (d, 3,0)
	H-13b	6,38 (d, 3,5)
	H-14a	4,56 (d, 12,5)
	H-14b	4,73 (d, 12,5)
	H-15a	4,51 (d, 13,0)
	H-15b	4,63 (d, 13,0)
	H-2'	2,50 (m)
	C2'- <u>CH</u> ₃	1,18 (d, 7,0)
	1,19 (d, 7,0)	
acetato (en C-15)	2,12	

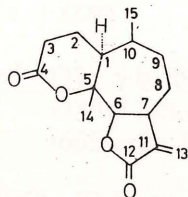
Tabla 3.- Desplazamientos químicos (multiplicidad) de los carbonos de algunos pseudoguaianólidos (en ppm relativos al TMS)⁴⁸⁻⁵⁰



ambrosina⁵⁰



altamisina^{48, 49}



psilotachina⁴⁸

	ambrosina	altamisina	psilotachina
C-1	47,4	134,3 (s)	41,6 (d)
2	163,4	25,7 (t)	23,2 (t)
3	130,9	34,3 (t)	30,6 (t)
4	210,5	173,9 (s)	168,9 (s)
5	56,0	86,5 (s)	89,4 (s)
6	80,1	85,9 (d)	85,7 (s)
7	44,5	41,9 (d)	40,6 (d)
8	29,6	25,7 (t)	21,8 (t)
9	24,7	35,0 (t)	30,9 (t)
10	33,7	112,4 (s)	34,6 (d)
11	170,3	170,2 (s)	138,7 (s)
12	138,0	138,8 (s)	170,6 (s)
13	119,8	120,1 (t)	120,0 (t)
14	17,4	24,7 (c)	18,4 (c)
15	17,2	22,8 (c)	14,1 (c)
16		60,2 (t)	
17		14,3 (c)	

La *Neurolaena lobata* es usada en la medicina popular como hipoglicemiante.

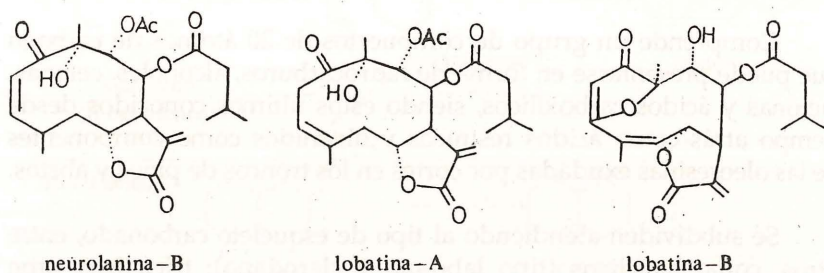
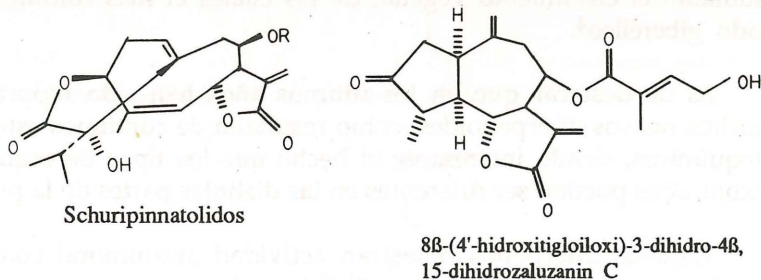


Fig. 31.- Sesquiterpenlactonas aisladas de *Neurolaena lobata*

• *Sesquiterpenlactonas de Schkuhria pinnata var. pinnata*⁵¹

200 g de las partes aéreas fueron extraídas con Et₂O: MeOH:éter de petróleo (1:1:1). El extracto fue cromatografiado en columna de silicagel. Las fracciones resultantes fueron sometidas posteriormente a CCD y/o HPLC (RP₈, MeOH:H₂O,3:2), obteniendo diversas sesquiterpenlactonas, entre ellas las schkuhripinnatólidos A, B y C, y el 8β-(4'-hidroxitigloiloxi)-3-dihidro-4β, 15-dihidrozaluzanin C (Fig. 32).



R = H, A

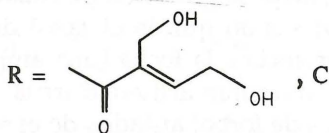
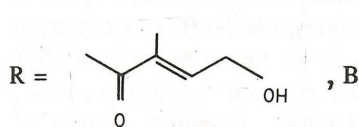


Fig. 32.- Sesquiterpenalctonas aisladas de *Schkuhria pinnata*

5. DITERPENOS

5.1. Generalidades

Comprende un grupo de compuestos de 20 átomos de carbono que puede presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, siendo estos últimos conocidos desde tiempo atrás como ácidos resínicos y obtenidos como componentes de las oleoresinas exudadas por cortes en los troncos de pinos y abetos.

Se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado, entre otros, como bicíclicos (tipo labdano y clerodano); tricíclicos (tipo pimarano, abietano, cassano, totarona y podocarpano); tetracíclicos (tipo kaurano, beyerano, atisano, giberelano). En la figura 33 se señalan las estructuras de los hidrocarburos base y la relación que existe entre los diversos esqueletos¹.

Los diterpenos, han sido clasificados también en base a sus propiedades; entre los ácidos resínicos ya nombrados, tenemos los ácidos abiético y agático a los que se les atribuye función protectora en la planta; los diterpenos tóxicos como los grayanotoxinas que ocurren en las hojas de *Rhododendron* y son los responsables de la naturaleza venenosa de ellas; y las giberelinas, un grupo de hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, de las cuales el más común es el ácido giberélico⁴.

Es de destacar que en los últimos años han sido reportados muchos nuevos diterpenoides, como resultado de continuos estudios fitoquímicos, siendo interesante el hecho que los tipos de esqueleto encontrados pueden ser diferentes en las distintas partes de la planta.

Algunos diterpenos muestran actividad antitumoral como la taxodiona aislada de *Taxodium distichum*, la jatrofona de *Jatropha gossypifolia*, la gnidicina de *Gnidia lamprantha*, el ingenol del *Euphorbia escula*; siendo quizás el taxol del *Taxus brevifolia* Nutt, el de mayor importancia a la fecha (una amplia revisión se presenta en la ref.54); otros, muestran actividad irritante, tóxica o cocarcinogénica como los ésteres de forbol aislados de especies de *Croton* y *Euphorbia*, actividad anti-inflamatoria como el cajucarínolido de *Croton cajucara*; edulcorante como el steviosido de *Stevia rebaudiana*. Otro ejemplo es el forskolin

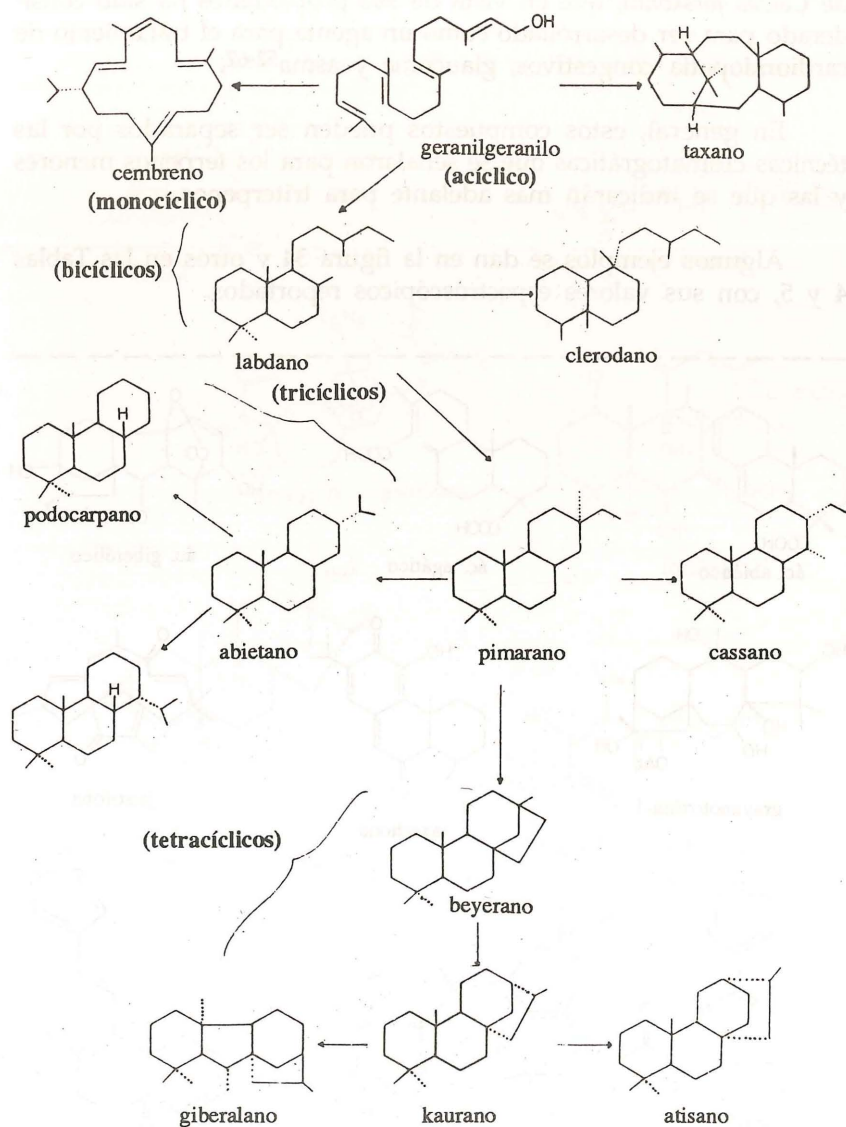
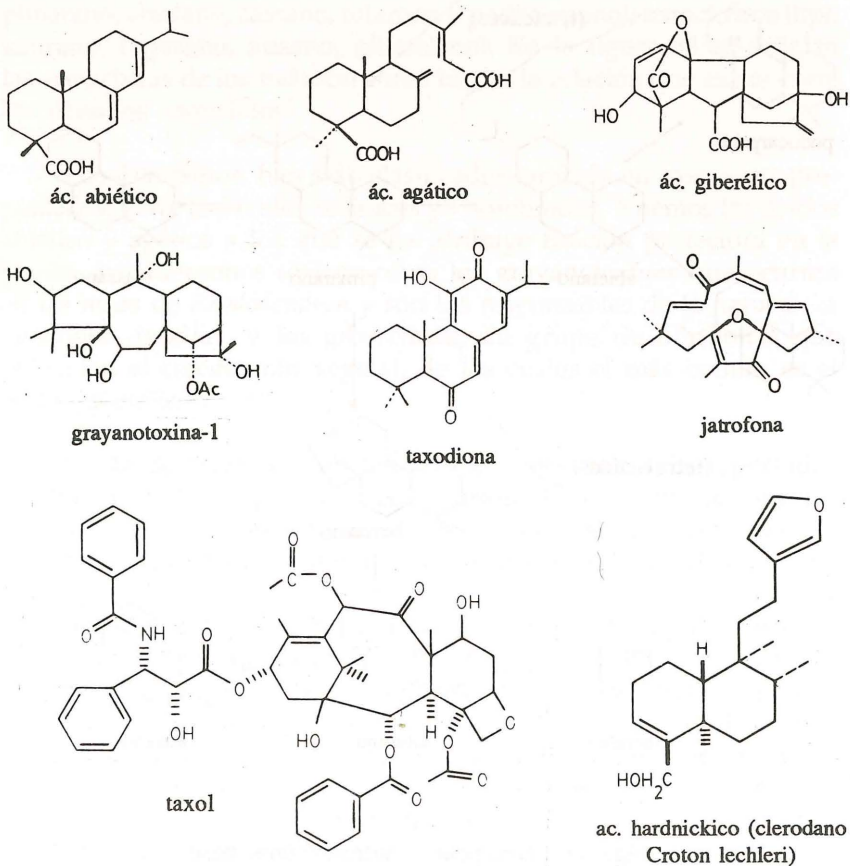


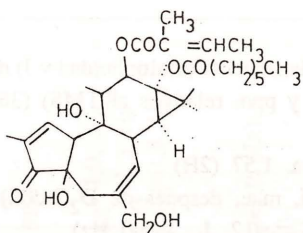
Fig. 33.- Diterpenos: hidrocarburos base

de *Coleus forskohlii*, que en vista de sus propiedades ha sido considerado para ser desarrollado como un agente para el tratamiento de cardiomiopatía congestivos, glaucoma y asma⁵²⁻⁶².

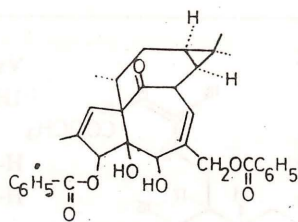
En general, estos compuestos pueden ser separados por las técnicas cromatográficas que se señalaron para los terpenos menores y las que se indicarán más adelante para triterpenos.

Algunos ejemplos se dan en la figura 34 y otros en las Tablas 4 y 5, con sus valores espectroscópicos reportados.

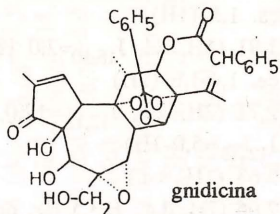




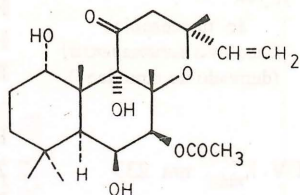
forbol



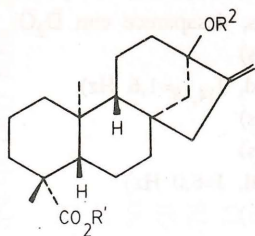
ingenol



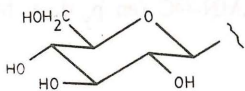
gnidicina



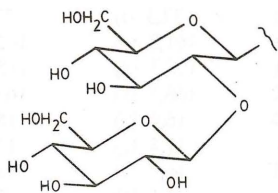
forskolin



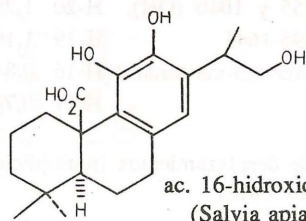
R¹ =



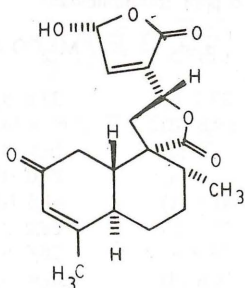
R² =



steviosido



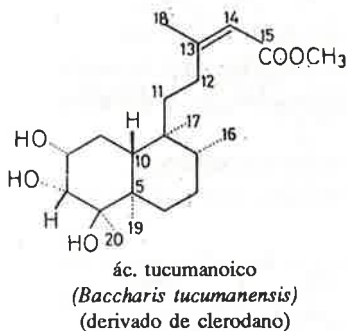
ac. 16-hidroxicarnósico
(*Salvia apianor*)



cajucarínolido

Fig. 34.- Diterpenos oxigenados

Tabla 4.- Valores espectroscópicos reportados para el ac. tucumanoico⁶³



Valores de desplazamiento (multiplicidad y J) de RMN-¹H (en CDCl₃ y ppm relativos al TMS) (360 MHz)

H-1	1,75 y ca. 1,57 (2H)
H-2	4,13 (1H, m.a., después de D ₂ O:ddd) J _{2,3} =4, J _{18,2} =12, J _{1α,2} =5,0 Hz)
H-3	3,61 (1H, t.a., después de D ₂ O:d, J _{2,3} =4,0 Hz)
H-8	ca. 1,5 (1H)
H-10	1,81 (1H, dd, J _{18,10} =2,0 Hz)
H-11	ca. 1,4-1,6 (2H)
H-12	2,71 (2H, 2td, J _{12,12'} =12,0, J _{12,13} =J _{12,13'} = J _{12',13} =5,0 Hz)
H-14	5,63 (1H, s.a.)
2-OH	2,06 (1H, d.a., J=3,5 Hz, desaparece con D ₂ O)
3-OH	2,36 (1H, d, J=2,5 Hz, desaparece con D ₂ O)
4-OH	1,25 (1H, s, desaparece con D ₂ O)
OCH ₂	3,67 (3H, s)
H-18	1,89 (3H, d, J _{14,18} =1,6 Hz)
H-20	1,29 (3H, s)
H-19	1,10 (3H, s)
H-16	0,84 (3H, d, J=6,0 Hz)
H-17	0,74 (3H, s)

UV. λ_{máx}^{EtOH} nm 233

IR. ν_{máx}^{KBr} cm⁻¹ 3400-3200,
1155 y 1040 (OH),
1695-1645
(éster-α,β-insaturado)

Valores de desplazamientos (multiplicidad) de RMN-¹³C (en p_y-d₅ y Me₂CO-d₆, relativos al TMS)

δ ppm (multiplicidad)

C	p _y -d ₅	Me ₂ CO-d ₆	C	p _y -d ₅	Me ₂ CO-d ₆
1	27,4 (t)	27,6 (t)	12	37,3 (t)	37,7 (t)
2	69,6 (d)	69,4 (d)	13	161,5 (s)	162,2 (s)
3	79,5 (d)	79,5 (d)	14	115,7 (d)	115,9 (d)
4	77,0 (s)	77,0 (s)	15	166,5 (s)	167,0 (s)
5	41,5 (s)	41,5 (s)	16	16,4 (c)	16,4 (c)
6	28,1 (t)	28,2 (t)	17	17,8 (c)	17,7 (c)
7	26,9 (t)	26,6 (t)	18	16,7 (c)	18,7 (c)
8	36,6 (d)	36,9 (d)	19	22,2 (c)	21,7 (c)
9	39,3 (s)	39,6 (s)	20	25,2 (c)	25,3 (c)
10	39,1 (d)	39,2 (d)	OCH ₃	50,7 (c)	51,0 (c)
11	32,9 (t)	33,0 (t)			

5.2. Ejemplos de aplicación

- Diterpenos óxido de manoilo de *Werneria dactylophylla* D.C.⁶⁵

550 g de la parte aérea de *W. dactylophylla* o "conuca", fueron extraídos en un soxlhet sucesivamente con éter de petróleo (6 g) y cloroformo (36 g). 3 g del extracto cloroformico fue cromatografiado en una columna de silicagel usando cloroformo con cantidades crecientes de metanol como solventes de elución. Las fracciones colectadas fueron reunidos de acuerdo a su comportamiento cromatográfico en capa delgada y posteriormente purificada por HPLC (columna RP₁₈, MeOH:H₂O, 17:3) obteniendo cuatro diterpenos óxidos de manoilo (Fig. 35).

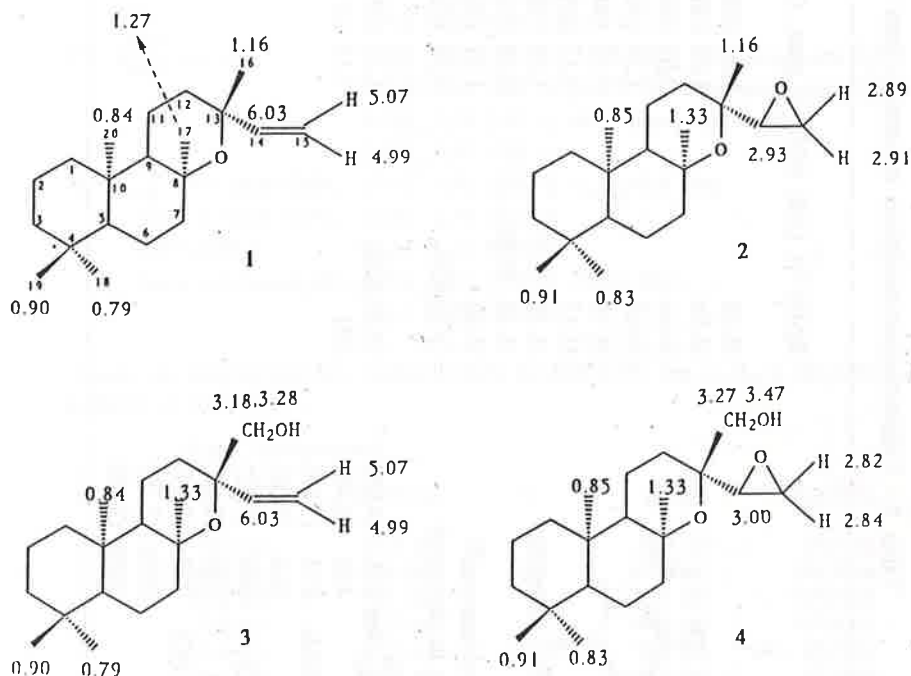
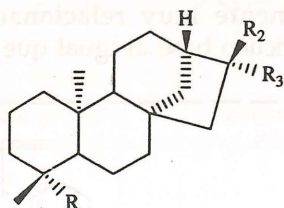


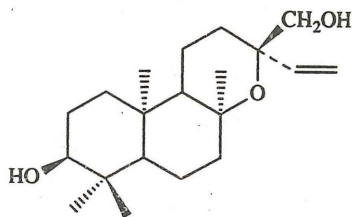
Fig. 35.- Diterpenos de *W. dactylophylla*

• *Diterpenos de Werneria ciliolata* A. Gray 66

Las partes aéreas secas (1 kg) de *W. ciliolata* fueron extraídas sucesivamente con éter de petróleo y cloroformo (32 g). El extracto clorofórmico fue cromatografiado en una columna de silicagel usando cloroformo con cantidades crecientes de metanol como sistema de elución. Las fracciones resultantes fueron reunidas en 8 fracciones, A a H, de acuerdo a su comportamiento en CCD y luego purificadas por HPLC (RP₁₈) con MeOH:H₂O 85:15 (A y B), 80:20 (C), 70:30 (D y E), 65:35 (F), 70:30 (G y H), obteniéndose diterpenos derivados de kaurano (1-4) y de óxido de manoilo 5 (Fig. 36).



	R	R ₂	R ₃
1	-COOH	-CH ₂ OH	H
2	-CHO	-CH ₂ OH	-OH
3	-CHO	-CH ₂ OH	-OCH ₃
4	-COOH	= O	



5

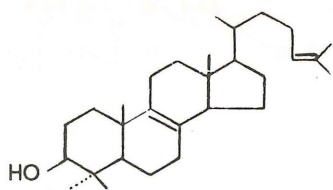
Fig. 36.- Diterpenos de *W. ciliolata*

6. TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES

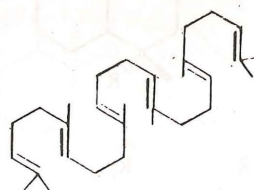
6.1. Generalidades

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos, y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides. En la figura 37 se muestran algunas estructuras típicas, y en la figura 38 rutas biosintéticas propuestas a partir de dos unidades de pirofosfato de farnesilo^{1,67}.

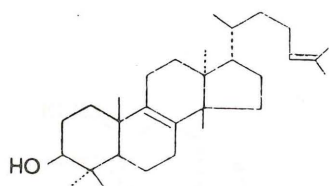
Los esteroides, biogenéticamente muy relacionados a los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base al igual que los triter-



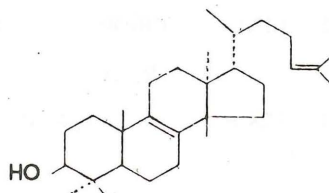
lanosterol



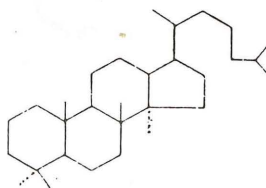
escualeno



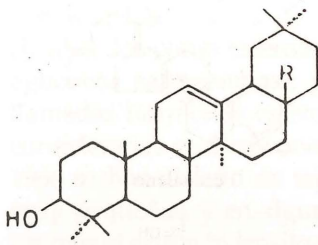
tirucalol



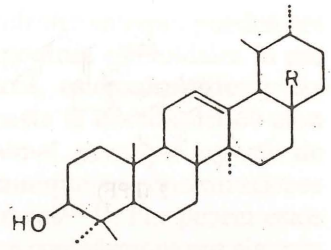
eufol



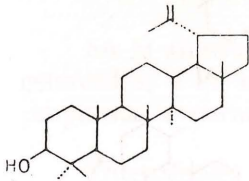
damnarano



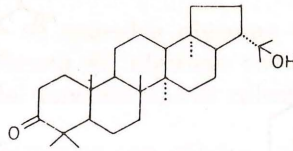
β -amirina R=Me
 ác. oleanólico R=CO₂H
 (serie oleanano)



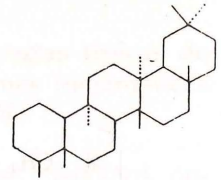
α -amirina R=Me
 ác. ursólico R=CO₂H
 (serie ursano)



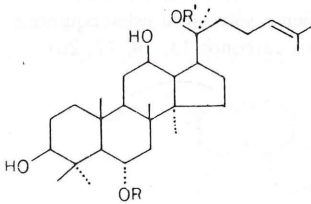
lupeol
 (serie lupano)



hidroxihopanoona
 (serie hopano)



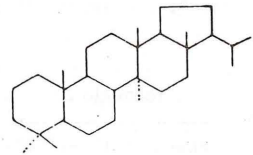
friedelano



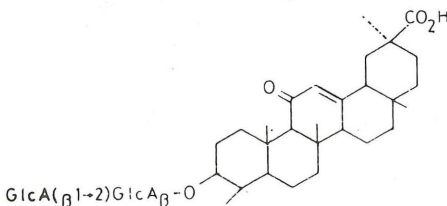
ginsenosido Rx

x=0, a, b₁, b₂, c, d, e, etc.

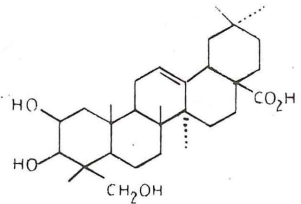
ejm: ginsenosido Re R=L-ramn-(α 1 \rightarrow 2)-D-glc
 R'=D-glc



arborano



GlcA(β 1 \rightarrow 2)GlcA β -O
 glicirricina



ác. arjunólico

Fig. 37.- Algunos triterpenos

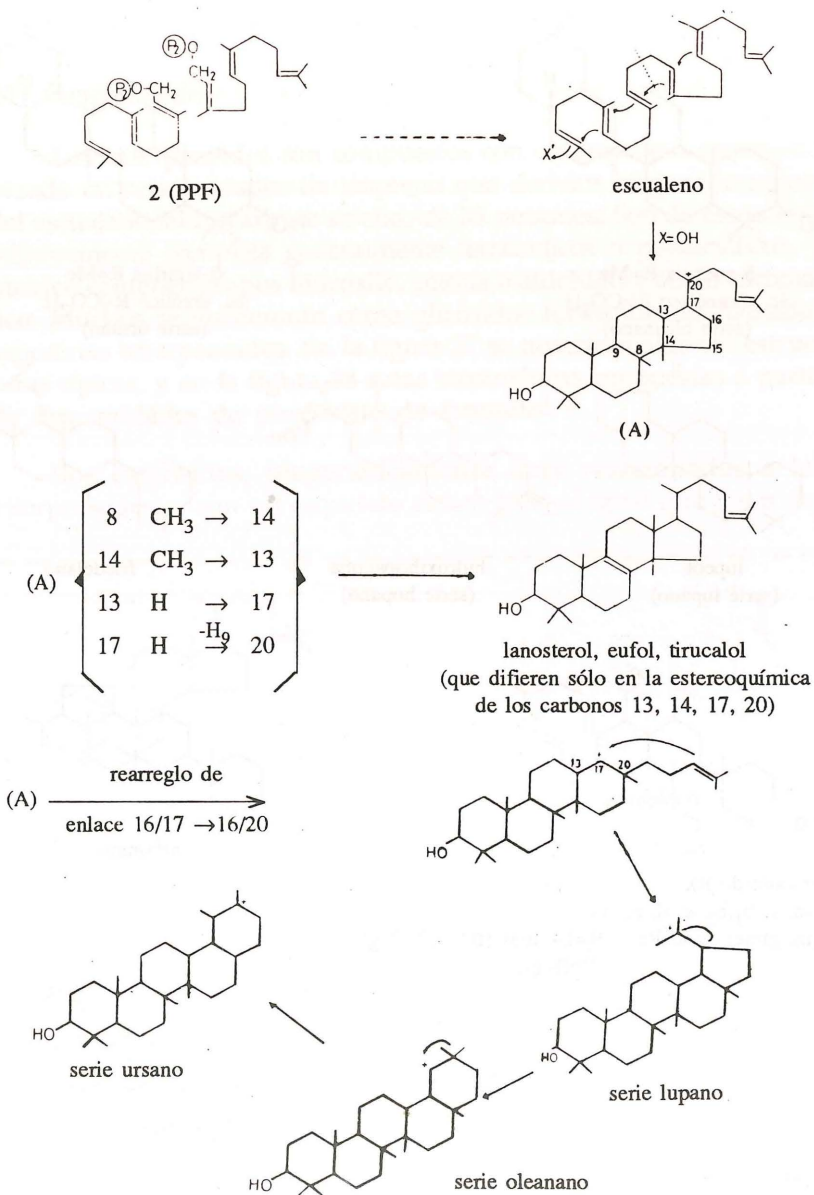


Fig. 38.- Biosíntesis del lanosterol y su conversión biosintética a otros triterpenos

penoides tetracíclicos, de ciclopentanoperhidrofenantreno, pueden ser clasificados como esteroides (C_{27} o más), saponinas esteroidales (o sus agliconas sapogeninas), glicósidos cardíacos, esteroalcaloides y las llamadas hormonas esteroidales, las que hasta la década del 60 eran consideradas exclusivamente de origen animal, pero que a partir de 1966 se han aislado de tejidos de plantas aunque en concentraciones muy pequeñas, y en algunos casos como trazas⁶⁸⁻⁷¹. Por poseer estos últimos el grupo hidroxilo en el carbono-3 son considerados por algunos autores dentro del grupo de esteroides y más específicamente como zooesteroides para diferenciarlos de los fitoesteroides, aquellos que desde sus inicios son considerados de origen vegetal

En la figura 39 se muestra algunas estructuras típicas de esteroides, y en la figura 40 algunas conversiones biosintéticas propuestas a partir del lanosterol, vía colesterol^{1,67}.

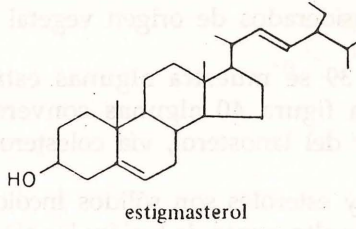
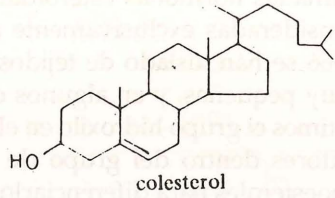
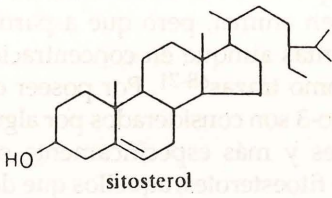
Triterpenoles y esteroides son sólidos incoloros, cristalinos, ópticamente activos, de alto punto de fusión; los esteroides, generalmente tienen punto de fusión menor que 200°C y los triterpenoles mayor que 200°C .

Las saponinas son glicósidos de ambos, triterpenos y esteroides, dan soluciones jabonosas, y algunos extractos crudos de plantas han encontrado uso como detergentes, y para la producción de espumas estables. Ellos causan hemólisis de la sangre aún en soluciones muy diluidas, una propiedad que ha sido utilizada para su detección en extractos de plantas. Las saponinas no son fáciles de aislar por ello muchas veces se prefiere hidrolizar el extracto crudo de la planta y aislar la sapogenina libre de azúcar. Con pocas excepciones el azúcar está unida a la aglicona a través del grupo $-\text{OH}$ en C-3.

Las saponinas del grupo triterpeno se encuentran extensamente distribuidas, y constituyen la mayoría de las saponinas encontradas en la naturaleza; una gran variedad de ellas difieren únicamente en el número y tipo de unidades de azúcar unidas a las sapogeninas; generalmente pertenecen al grupo de la β -amirina, otras pocas son derivadas de la α -amirina, del lupeol y del grupo de triterpenos tetracíclicos.

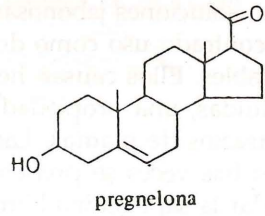
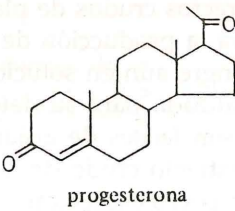
Fuentes ricas de saponinas triterpenoidales y sus geninas son el ginseng, la alfalfa, la avena, la quinua y la soya, entre otras.

Esteroles

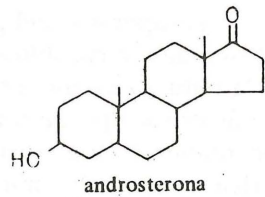
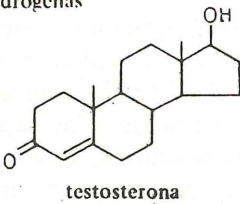


Hormonas sexuales

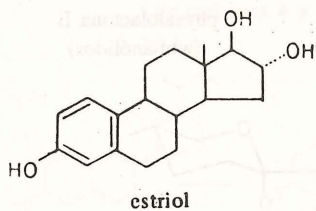
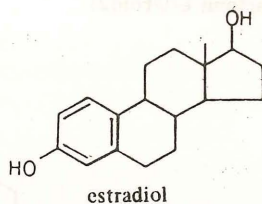
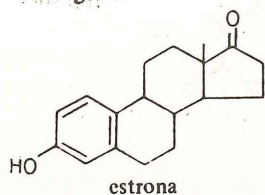
a. - gestógenas



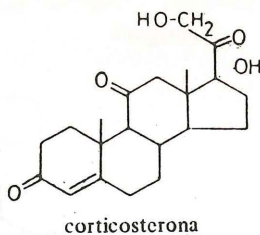
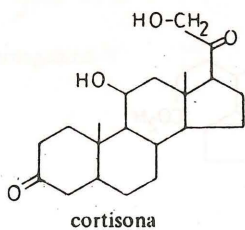
b. - andrógenas



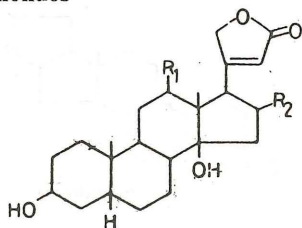
c. - estrógenas



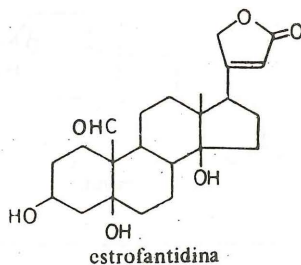
Hormonas corticoides



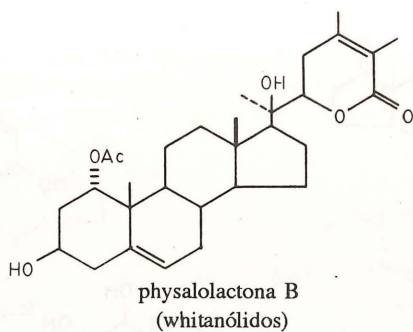
Cardenólidos



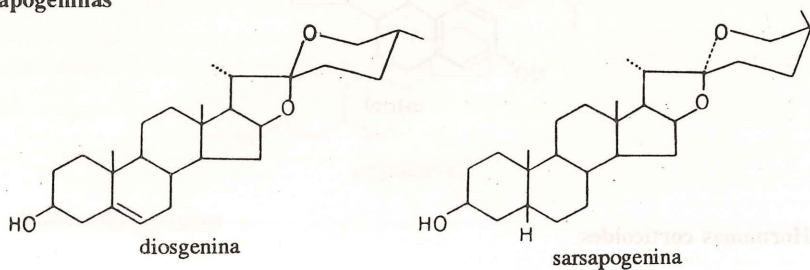
digitoxigenina $R_1=R_2=H$
 gitoxigenina $R_1=H, R_2=OH$
 digoxigenina $R_1=OH, R_2=H$



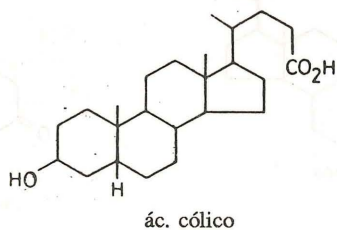
Lactona esteroidal



Sapogeninas



Ac. biliares



Esterocaloides

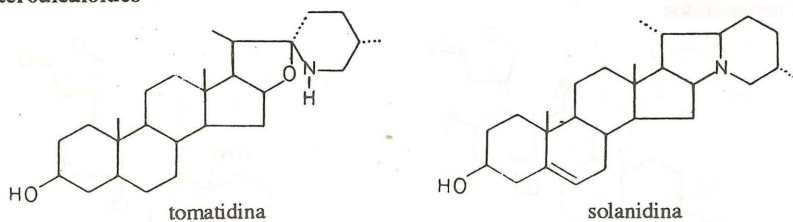


Fig. 39.- Esteroides

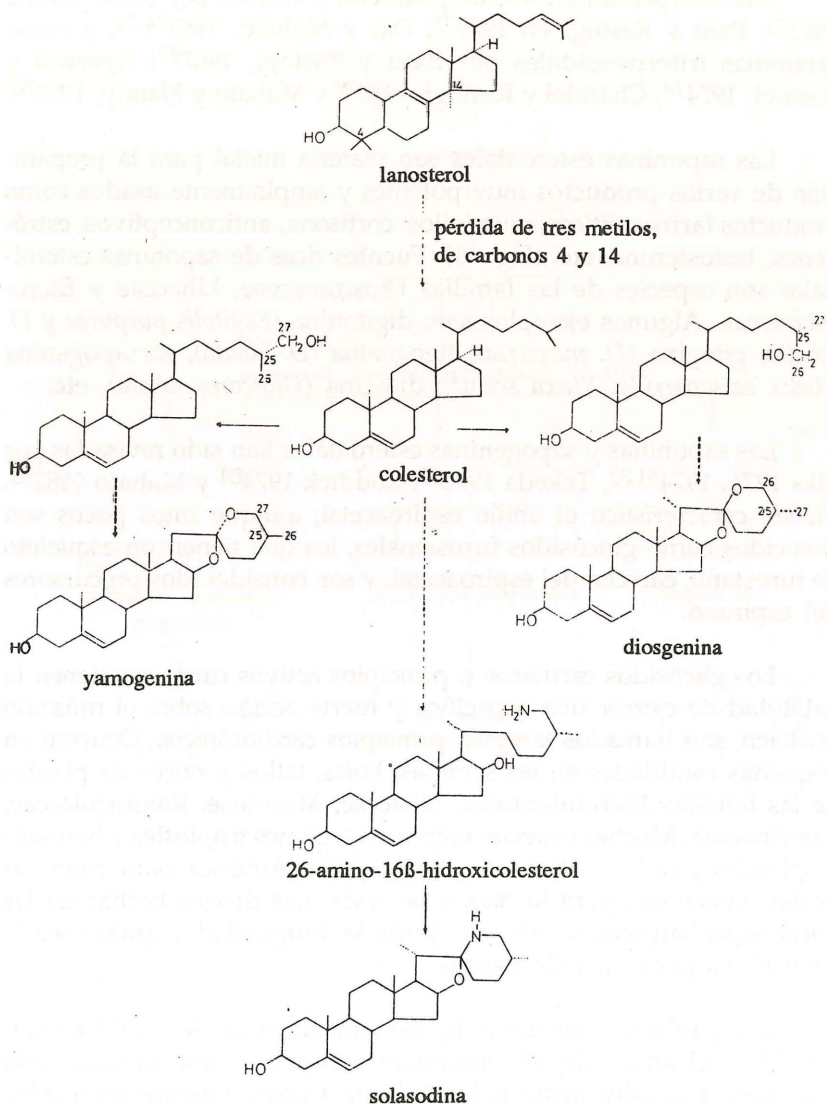


Fig. 40.- Conversiones biosintéticas de esteroides

Los triterpenos han sido ampliamente revisados por Kulshreshtha 1972⁷²; Pant y Rastogi en 1979⁷³; Das y Mahato, 1983⁷⁴⁻⁷⁶; y como saponinas triterpenoidales por Basu y Rastogi, 1967⁷⁷; Agarwal y Rastogi, 1974⁷⁸; Chandel y Rastogi, 1980⁷⁹ y Mahato y Nandy, 1991⁸⁰.

Las saponinas esteroidales son materia inicial para la preparación de varios productos muy potentes y ampliamente usados como productos farmacéuticos, entre ellos: cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona, etc. (Fig. 41). Fuentes ricas de saponinas esteroidales son especies de las familias Dioscoreaceae, Liliaceae y Escrofularaceae. Algunos ejemplos son: digitonina (*Digitalis purpurea* y *D. lanata*), gitogina (*D. purpurea*), tigogina (*D. lanata*), sarsapogenina (*Radix sarsaparrilla*, *Yucca schott*); dioscina (*Dioscorea tokora*), etc.

Las saponinas y sapogeninas esteroidales han sido revisadas por Elks 1971, 1974^{81,82}, Takeda 1972⁸³, Roddick 1974⁸⁴ y Mahato 1982⁸⁵. Tienen característico el anillo espiroacetal; aunque unos pocos son conocidos como glucósidos furostenales, los que tienen un esqueleto de furostano, carecen del espiroacetal, y son considerados precursores del espirano.

Los glicósidos cardíacos o principios activos cardíacos tienen la habilidad de ejercer una específica y fuerte acción sobre el músculo cardíaco, son llamados también principios cardiotónicos. Ocurren en pequeñas cantidades en las semillas, hojas, tallos y raíces de plantas de las familias Escrofularaceae, Liliaceae, Moraceae, Ranunculaceae, Apocinaceae. Muchas especies crecen en regiones tropicales y han sido empleadas por los nativos de Africa y Sur-América para preparar flechas venenosas para la caza y la pesca. Las drogas hechas de las hojas secas han encontrado uso desde la antigüedad y quizás sea la *Digitalis purpurea* la más usada.

Los glicósidos cardíacos tienen característicos los -OH en C-3 y C-14, y el anillo de γ -lactona- α,β -insaturado unido al C-17. Son compuestos relativamente polares y son frecuentemente analizados por cromatografía de papel.

Los esteroalcaloides ocurren frecuentemente como glicósidos en especies del género *Solanum* y otros. La solanidina y tomatidina son dos ejemplos típicos de este grupo de compuestos.

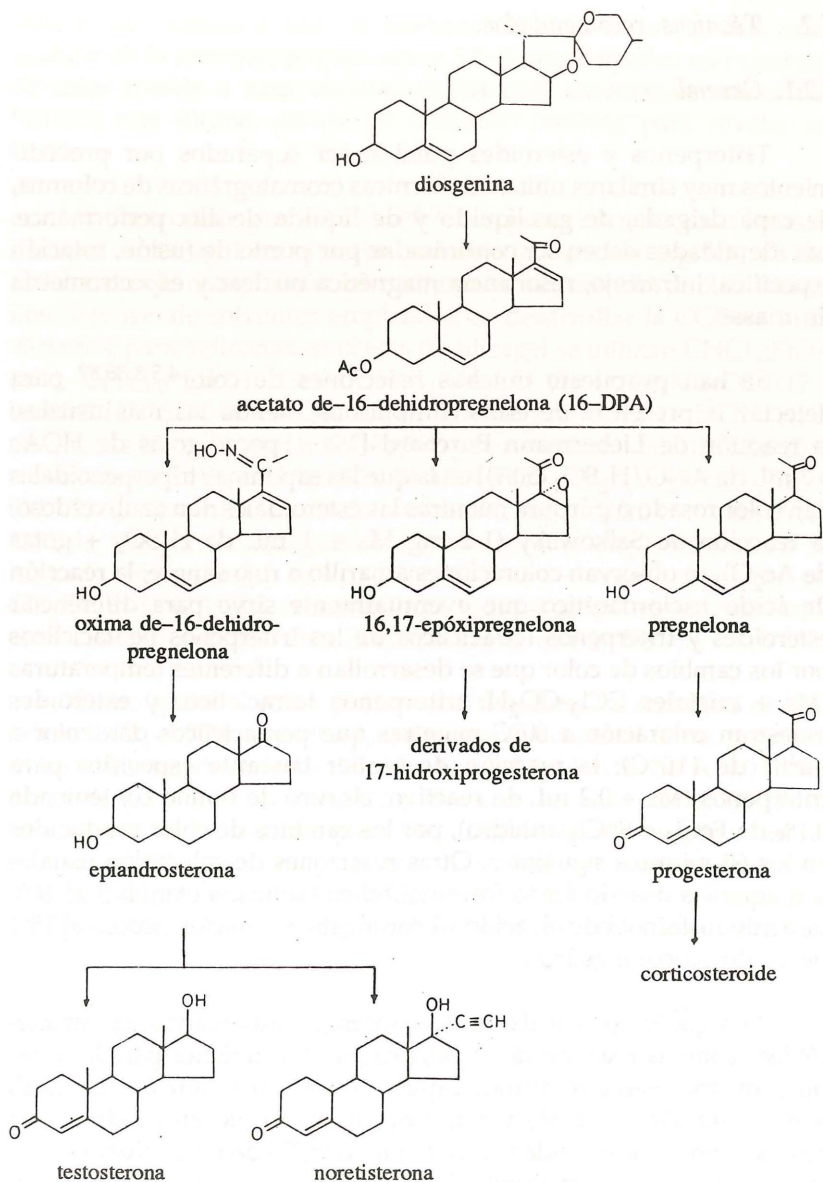


Fig. 41.- Conversión de diosgenina a otros esteroides

6.2. Técnicas recomendadas

6.2.1. General

Triterpenos y esteroides pueden ser separados por procedimientos muy similares utilizando técnicas cromatográficas de columna, de capa delgada, de gas-líquido y de líquida de alta performance. Las identidades deben ser confirmadas por punto de fusión, rotación específica, infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Se han propuesto muchas reacciones de color^{4,5,8,86,87} para detectar la presencia de estos compuestos, siendo las más usuales: la reacción de Liebermann Burchard [Ms + pocas gotas de HOAc + 3 mL de $\text{Ac}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (50:1)] en la que las saponinas triperpenoidales dan color rosado o púrpura mientras las esteroidales dan azul-verdoso; la reacción de Salkowsky (1-2 mg Ms + 1 mL de H_2SO_4 + gotas de Ac_2O), se observan coloraciones amarillo a rojo sangre; la reacción de ácido tricloroacético que eventualmente sirve para diferenciar esteroides y triterpenos tetracíclicos de los triterpenos pentacíclicos por los cambios de color que se desarrollan a diferentes temperaturas (Ms + cristales $\text{CCl}_3\text{-CO}_2\text{H}$: triterpenos tetracíclicos y esteroides muestran coloración a 60°C mientras que pentacíclicos dan color a partir de 110°C); la reacción de Noller bastante específica para triterpenos (Ms + 0,2 mL de reactivo: cloruro de tionilo conteniendo 0,1% de FeCl_3 o SbCl_3 anhidro), por los cambios de color producidos en los 60 minutos siguientes. Otras reacciones de coloración usuales son aquellas usando ácido fosfomolibdico (solución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico), ácido silicotungstico (solución acuosa al 15% de ácido silicotungstico).

Los glicósidos cardíacos dan además otras reacciones características como la reacción de Legal, prueba característica para lactonas de 5 miembros- α,β -insaturada, que consiste en la adición de álcali a una solución de la Ms y nitroprusiato de sodio en piridina, una reacción positiva se evidencia por el desarrollo de un profundo color rojo; la prueba de Raymond (Zimmermann) que involucra reacción con m-dinitrobenceno en álcali metanólico caliente y es debido a la presencia de un grupo metileno activado en este caso en el C-21 de la cadena lateral, una reacción positiva produce una coloración

violeta que cambia a azul; la reacción de Kedde, que es una modificación de la anterior, emplea ácido 3,5-dinitrobenzoico con aparición de color rosado a azul violeta, es útil para detectar el anillo de γ -lactona; este último, puede ser utilizado también para revelar una CCD.

La detección por CCD^{7,8,88-93} es generalmente en placas de silicagel o silicagel tratada con solución acuosa de AgNO_3 (7-15%) en el caso de compuestos con diferente número de dobles enlaces. Los sistemas de solventes empleados en desarrollar la CCD son muy variados, para agliconas en placas de silicagel se utilizan CHCl_3 :EtOAc (1:1), CHCl_3 : EtOH (19:1), CHCl_3 : Me_2CO (9: 1), bz: Me_2CO (17:3), bz: MeOH (23:2), hex:EtOAc (1:1), hex: Me_2CO (4:1), bz:EtOH (17:3); en placas de silicagel con AgNO_3 se emplean hex:EtOAc (5:1), ciclohexano: CHCl_3 :EtOAc (20:4:3), tol: CHCl_3 (10:3), tol: CHCl_3 :EtOAc (20:4:3). El desarrollo continuo favorece la separación, como en el caso de una mezcla de diosgenina y yamogenina, cuya separación fue lograda sólo por el desarrollo continuo durante 8 horas con CH_2Cl_2 :Et₂O (4:1). La cromatografía bidimensional es también usual para separar mezclas de triterpenoides y esteroides.

Como agentes cromogénicos son frecuentes los reactivos de: Carr Price (SbCl_3 al 20% en CHCl_3), Liebermann-Burchard (1 mL de H_2SO_4 conc. + 20 mL de Ac_2O + 50 mL de CHCl_3 , ó 10% de Ac_2O + 10% de H_2SO_4 en etanol absoluto), cloruro de zinc (30 g de ZnCl_2 completando a 100 mL con MeOH), vainillina- H_2SO_4 (1 g de vainillina en 100 mL de H_2SO_4 conc.), H_2SO_4 conc. o al 50%, sulfato de amonio y sulfato ácido de amonio (1:1). En todos los casos el calentamiento de la placa por unos minutos origina el desarrollo de colores variados.

Las saponinas pueden separarse mejor en CP o CCD en celulosa, aunque también da buenos resultados el uso de silicagel en sistemas como n-buOH saturado con agua, CHCl_3 : MeOH : H_2O (13:7:2, fase superior), o EtOAc: MeOH : H_2O (81:11:8).

La técnica de HPLC está siendo actualmente muy aplicada para la separación de varios compuestos incluyendo saponinas, usando una variedad de fases estacionarias y móviles, por ejemplo: columnas de silicagel octadecilsililado (ODS) LS-410 con una mezcla de MeOH : H_2O :HOAc: Me_3N como fase móvil o columnas de μ -Bondapak C₁₈

usando MeOH o una mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ como fase móvil; este último sistema en proporción 83:10:7 ha sido utilizado para separar una mezcla de hecogenina, tigogenina, diosgenina y estigmasterol. Esta técnica de HPLC con columnas de fase reversa, en combinación con CC de silicagel y cromatografía en gel de Sephadex LH-20, son ahora usuales para separar mezclas complejas que no pudieron ser separadas antes por los métodos clásicos^{85,94}.

La CGL ha sido muy útil para separar mezclas de ésteres metílicos de ácidos triterpénicos en columnas empacadas con OV-17 o SE-30 en Chromosorb W o para derivados trimetilsililados en columnas XE-60 en Chromosorb Q. Se necesitan temperaturas relativamente altas (250-280°C) y flujo de gas de 50-100 mL/min. Valores de t_r para un gran número de compuestos esteroidales han sido reportados^{95,96}.

6.2.2. Análisis espectrométricos

El espectro UV es muy útil para deducir la presencia y ubicación de grupos cromóforos por aplicación de las reglas de Woodward.

Compuestos triterpenoides y esteroides en general muestran en el IR⁵ señales a 3650-3590 cm^{-1} y a 1055 cm^{-1} correspondientes a -OH secundarios; señales a 2960-2850 cm^{-1} y 1485-1445 cm^{-1} correspondientes a estiramientos de -CH- y flexiones de -CH₂-; señales a 1385-1380 cm^{-1} y 1370-1365 cm^{-1} de gem-dimetil; insaturaciones podrían observarse a 3040-3010 cm^{-1} correspondientes a estiramientos =C-H y a 1680-1620 cm^{-1} de estiramientos C=C. La conversión de hidroxilos a cetonas elimina las bandas de -OH, apareciendo las absorciones del carbonilo a 1718-1704 cm^{-1} si es una ciclohexanona o a 1738-1749 cm^{-1} para las ciclopentanonas; la conjugación con dobles enlaces provoca desplazamientos a 1680-1660 cm^{-1} ; los acetatos absorben a 1733-1739 cm^{-1} y a 1250-1200 cm^{-1} ; los anillos de lactona a 1725-1715 cm^{-1} .

Los ácidos triterpencarboxílicos en los que el grupo -CO₂H está rodeado de grupos voluminosos como en el ácido oleanólico se encuentran como monómeros y absorben a 1678-1690 cm^{-1} con señales adicionales a 3620 cm^{-1} ; si es dímero la absorción es a 1742-1745 cm^{-1} .

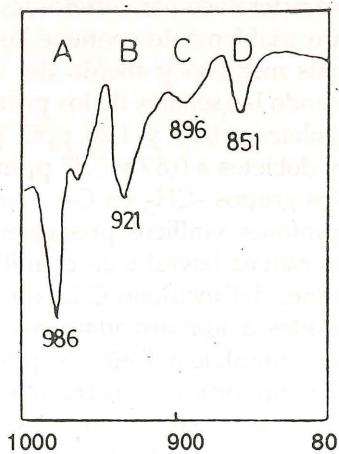
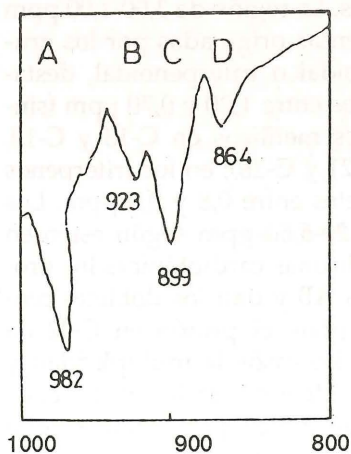
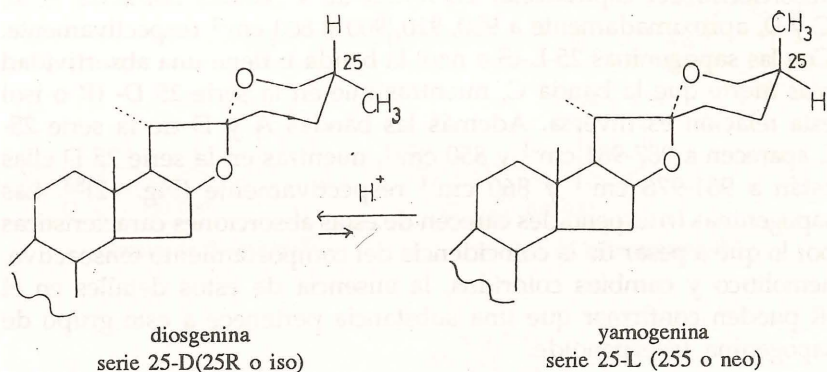


Fig. 42.- Absorciones características en el IR del anillo espiroacetal en la región de 1000-800 cm^{-1}

En las sapogeninas esteroidales son además características las absorciones del espiroacetal en forma de 4 bandas llamadas A, B, C y D, aproximadamente a 980, 920, 900 y 860 cm^{-1} respectivamente. Con las sapogeninas 25-L-(S o neo) la banda B tiene una absorptividad más fuerte que la banda C, mientras que en la serie 25 D- (R o iso) esta relación es inversa. Además las bandas A y D de la serie 25-L aparecen a 987-984 cm^{-1} y 850 cm^{-1} , mientras en la serie 25 D ellas están a 981-976 cm^{-1} y 860 cm^{-1} respectivamente (Fig. 42)⁸³. Las sapogeninas triterpenoides carecen de estas absorciones características por lo que a pesar de la coincidencia del comportamiento tensoactivo, hemolítico y cambios coloridos, la ausencia de estos detalles en el IR pueden confirmar que una sustancia pertenece a este grupo de sapogenina triterpenoide.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear⁵ de protón es muy característico para esteroides y triterpenos. La región de 3,00-1,00 ppm invariablemente contiene las señales intensas originadas por los grupos metileno y metilo del núcleo esteroideal o triterpenoidal, destacando las señales de los protones metílicos entre 1,20 y 0,70 ppm (singuletes a 0,73 y 1,20 ppm para protones metílicos en C-18 y C-19, y dobletes a 0,89 y 0,87 ppm para los C-21 y C-26); en los triterpenos los grupos $-\text{CH}_3$ en C-4 originan singuletes entre 0,8 y 0,9 ppm. Los protones vinílicos producen señales a 5,20-5,50 ppm según estén en la cadena lateral o en el anillo. En las agliconas cardiotónicas los protones del metileno C-21 forman sistemas AB y dan los dobletes centrados a aproximadamente 3,80 y 4,40 ppm; el protón en C-22 da un singulete a 5,80-6,10 ppm. En todos los casos la multiplicidad y las constantes de acoplamiento ayudan a determinar la substitución. Algunos valores típicos especialmente de los grupos metilo se dan en la figura 43⁹⁷⁻¹⁰⁰. En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C-13¹¹, los diferentes carbonos pueden encontrarse en los siguientes rangos:

C alquilico primario	12-24 ppm
C alquilico secundario	20-41 ppm
C alquilico terciario	35-57 ppm
C alquilico cuaternario	27-43 ppm
C conteniendo OH	65-91 ppm
C olefínico	119-172 ppm
C carbonílico	177-220 ppm

Algunos valores típicos se dan en la figura 44¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

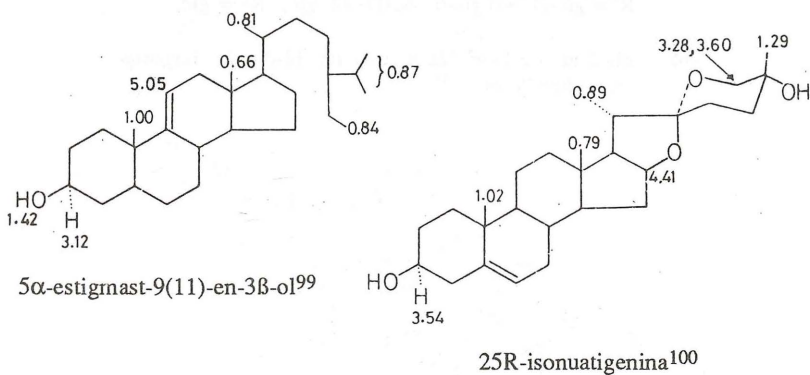
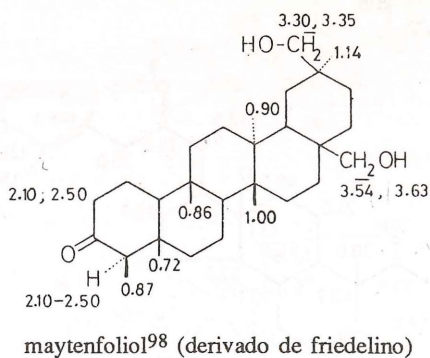
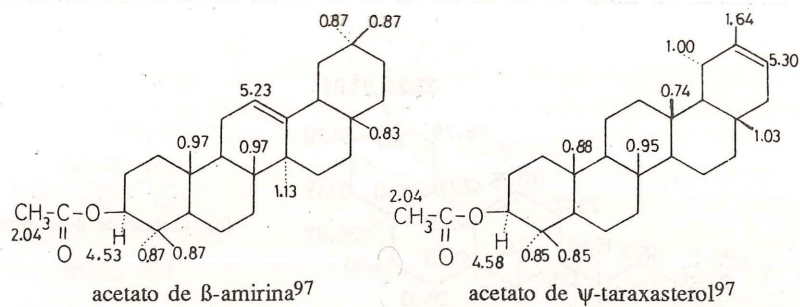
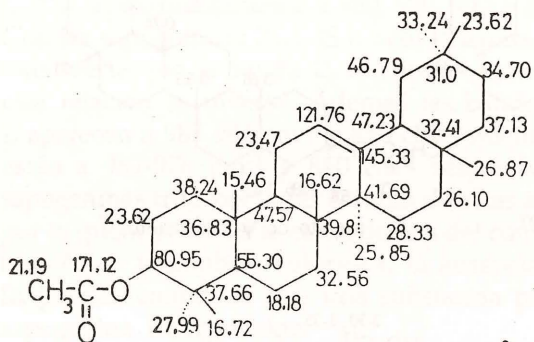
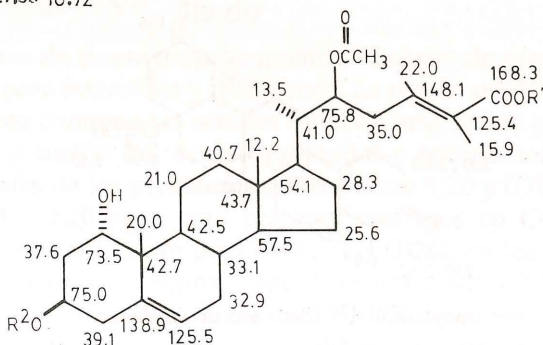


Fig. 43.- Desplazamientos químicos de algunos protones de triterpenos y esteroides (en ppm)

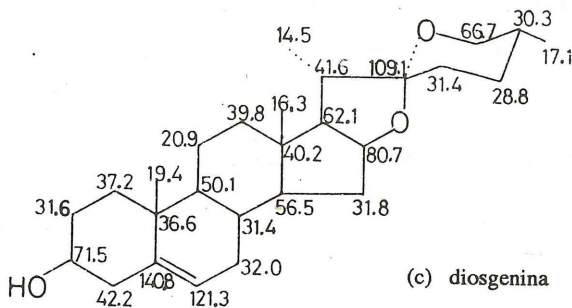


(a) acetato de β -amirina



$R^1 = \text{glc-(1}\rightarrow\text{4)-glc-6''-Ac-(1}\rightarrow\text{2)-glc}$, $R^2 = \text{glc}$,

(b) glicósido de-24-E-22 ϵ -acetoxi-1 α , 3 β -dihidroxi ergosta-5,24-dien-26-oico¹⁰⁵



(c) diosgenina

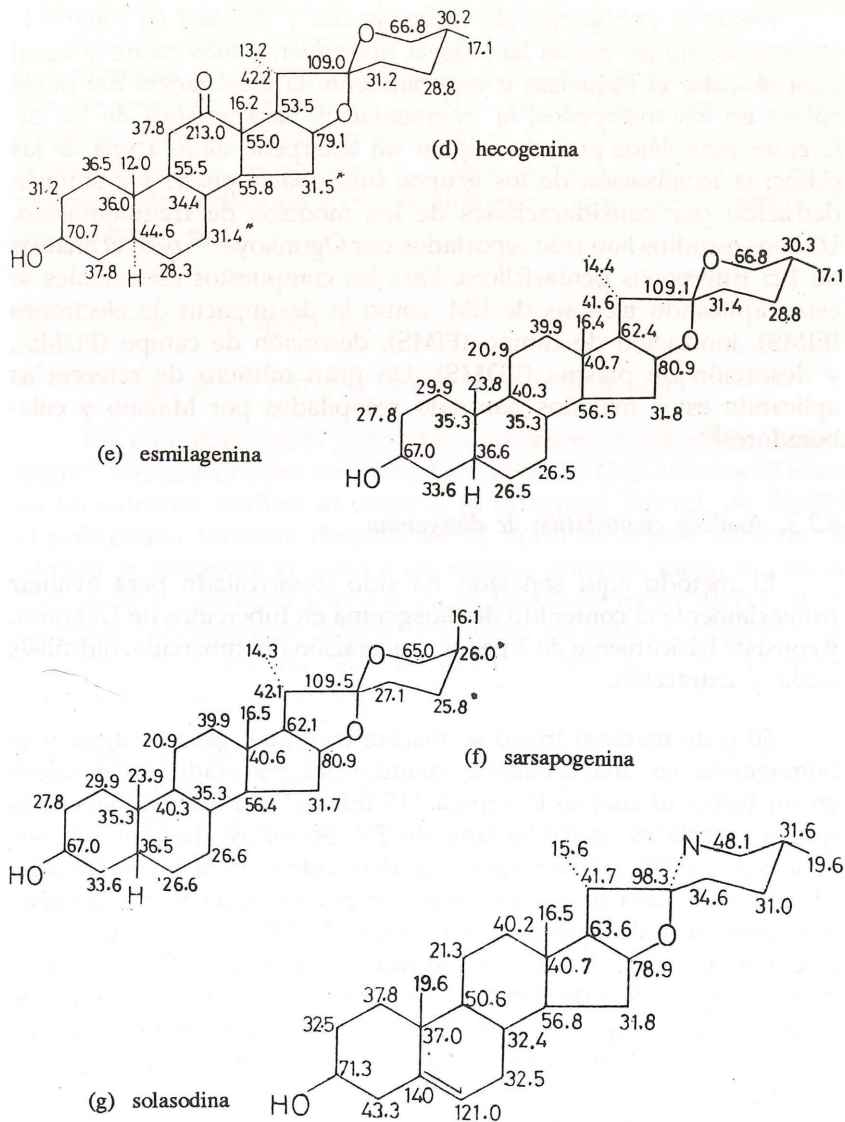


Fig. 44.- Valores de desplazamiento de RMN- ^{13}C para triterpenos (a) y esteroides (b-g)

Desde la publicación de Budzikiewics y Djerassi en 1963¹⁰⁶ la espectrometría de masas ha sido la herramienta más fuerte y usual para elucidar el esqueleto y especialmente la localización del doble enlace en los triterpenos; la fragmentación característica de los diferentes esqueletos permite asignar un triterpeno dado a una de las clases; la localización de los grupos funcionales puede ser también deducido por consideraciones de los modelos de fragmentación. Ultimos estudios han sido reportados por Ogunkoya¹⁰⁷ para el análisis de 105 triterpenos pentacíclicos. Para los compuestos esteroidales se están aplicando técnicas de EM, como la de impacto de electrones (EIMS), ionización de campo (FIMS), desorción de campo (FDMS), y desorción de plasma (PDMS). Un gran número de referencias aplicando estos métodos han sido recopilados por Mahato y colaboradores⁸⁵.

6.2.3. Análisis cuantitativo de diosgenina

El método aquí señalado ha sido desarrollado para evaluar rutinariamente el contenido de diosgenina en tubérculos de *Dioscorea*, y consiste básicamente de 3 pasos: maceración del tubérculo, hidrólisis ácida y extracción.

50 g de material fresco se macera con igual peso de agua y se homogeniza en una licuadora; cuando está macerado, se le coloca en un balón, al cual se le agrega 115 mL de HCl 3,5N de tal modo que la mezcla es aproximadamente 2N. Se refluja durante 3 horas, se le agrega 250 mL de agua y se deja enfriar para luego filtrarlo. El residuo se lava de 8 a 10 veces con porciones de 50 mL de agua y se deja secar durante toda la noche a 65°-70°C. El residuo seco se coloca en un soxlhet y se extrae durante 8 horas con 100 mL de éter de petróleo; después de la extracción se reduce el volumen del solvente a aproximadamente 10 mL y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas, tiempo en el cual los cristales de diosgenina deben precipitar. Se filtra, seca y pesa. Paralelamente debe determinarse la humedad de la muestra¹⁰⁸.

Otros métodos de análisis se han desarrollado posteriormente, utilizando: la espectrofotometría IR, principalmente para conocer el porcentaje de sapogeninas epiméricas en el C-25^{109,110}; la absorción en el visible, por formación previa de un derivado coloreado por

reacción con anisaldehído¹¹¹; la cromatografía gas-líquida utilizando columnas SE-30 en Chromosorb Q o W^{112,113} y últimamente el HPLC con columnas de silicagel (μ -Porasil) y como fase móvil el sistema éter de petróleo: isopropanol (12:1)¹¹⁴. La ventaja de estos últimos métodos sobre el método gravimétrico es la pequeña cantidad de tubérculo necesario, menos de 5 g, lo que permite su aplicación en su programa de evaluación para las diferentes etapas del desarrollo de un sembrío.

6.3. Ejemplos de aplicación

- *Triterpenos de la Vernonia baccharoides "ocuera negra":*

100 g de hojas secas y molidas de *Vernonia baccharoides* "ocuera negra", fueron extraídas con 600 mL de EP:Et₂O (2:1) durante 30 horas en un extractor soxhlet; al extracto se le agregó 300 mL de MeOH, el precipitado formado después de 12 horas de reposo se filtra. El filtrado se concentra al vacío a un residuo gomoso, luego es cromatografiado en columna sobre silicagel 60 (35-70 mesh ASTM, 60 g) en tolueno y eluido con tolueno y mezclas de polaridad creciente de tol:EtOAc. De la fracción (9:1), se obtuvo 50 mg de acetato de lupeol y de la fracción (7:3) 15 mg de lupeol.

El acetato de lupeol de pf 219-220°C (lit. 220°C) fue recrystalizado en hex:MEK (1:1), y el lupeol de pf 215°C (lit. 215°C) se purificó por recromatografía sobre silicagel. De los extractos clorofórmicos y etanólicos se aislaron los mismos dos triterpenos¹¹⁵.

- *Triterpenos en Perezia coerulescens Wedd:*

400 g de raíces secas y molidas fueron extraídas durante 33 horas con 1,2 L de hexano, concentrando luego el extracto a un volumen aproximado de 50 mL. El extracto concentrado se cromatografía sobre una columna de silicagel-60 (Merck) por elución con mezclas de polaridad creciente de hex:hz. De las fracciones (5:5) y (3:7) se obtuvieron sólidos blancos, que luego de sucesivas separaciones y purificaciones por cromatografía de capa delgada y de columna, y recrystalizaciones en mezclas de bz: EtOH, se aislaron 86 mg de acetato de β -amirina y 89 mg de acetato de ψ -taraxasterol. La caracterización de estos dos triterpenos fueron basados en los siguientes análisis:

Acetato de β -amirina.- Agujas cristalinas de pf 233-243°C. Dio positiva las pruebas de Rosenheim, Liebermann-Burchard y KMnO_4 . El espectro IR confirma la presencia del grupo éster por las señales a 1725 y 1240 cm^{-1} . Se observa además señales a 2920 y 2880 cm^{-1} de estiramiento C-H de grupos metilo y metileno, a 1470 cm^{-1} de deformación C-H de grupo metilo y a 1380 y 1370 cm^{-1} de deformación C-H de grupo gem-dimetilo, entre otros. El espectro de RMN- ^1H es característico para compuestos triterpenoides (o esteroides) destacándose las señales (δ ppm) de protones olefínicos (5,23, t, 1H), de protón metínico adyacente al acetato (4,53, t, 1H), de metilo del acetato (2,04, s, 3H), y señales para 8 grupos metilos a 1,13 (s, 3H), 0,97 (s, 6H), 0,87 (s, 12H) y 0,83 (s, 3H). El espectro de RMN- ^{13}C presenta 31 señales; los valores de desplazamientos (δ ppm) y su asignación a cada uno de los carbonos, así como la multiplicidad (acoplamiento spin-spin ^{13}C -H) y la constante de acoplamiento residual J^r en Hz se indican en la Tabla 6.

Acetato de ψ -taraxasterol.- Escamas brillantes de pf 218-220°C. Dio positiva las pruebas de Rosenheim, Liebermann-Burchard y de KMnO_4 . El espectro IR confirma la presencia del acetato por las señales a 1720 y 1240 cm^{-1} . El espectro RMN- ^1H muestra señales (δ ppm) de un protón olefínico (5,30, t, 1H), de protón metínico adyacente al acetato (4,38, t, 1H), metilo del acetato (2,04, s, 3H), metilo en carbono metínico (1,00, d, 3H, $J=8\text{Hz}$), y otras 6 señales singuletes de metilos a 1,03 (3H), 0,95 (3H), 0,88 (3H), 0,85 (6H) y 0,74 (3H), entre otras. El espectro de RMN- ^{13}C "noise decoupled" presenta 31 señales destacando entre ellos las del acetato (171,08 y 21,19 ppm), de carbonos olefínicos (139,90 y 118,99 ppm), de carbono enlazado al acetato (80,95 ppm), se observa también las señales restantes entre 55,40 y 14,63 ppm correspondientes a carbonos metilénicos y metínicos del esqueleto triterpénico.

A partir del espectro "off resonance" se hallaron 5 singuletes (C cuaternarios), 6 dobletes (C terciarios), 9 tripletes (C secundarios) y 8 cuádrupletes (grupos metilo). Se observó además que el doble enlace era trisustituido. La asignación de los datos de desplazamientos químicos de ^{13}C para el acetato de ψ -taraxasterol, se ha propuesto por correlación de los valores obtenidos con los reportados para el acetato de α -amirina, morolato de metilo, glutinol y ment-1-eno-4-ol (Fig. 45); estos datos se sintetizan en la Tabla 7. El EM con un

pico molecular a m/z 468 y fórmula empírica correspondiente a $C_{32}H_{52}O_2$, de un acetato triterpénico con una insaturación, presenta un pico base a m/z 189 y otros que coinciden con los reportados para el acetato de ψ -taraxasterol⁹⁷.

Tabla 6.- Valores de desplazamiento (δ ppm), multiplicidad y J_r en Hz, en RMN-¹³C para el acetato de β -amirina, comparados con valores reportados

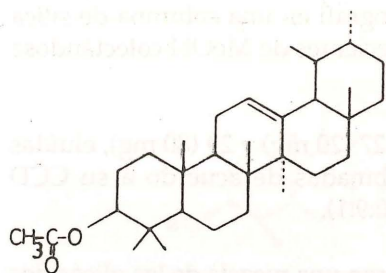
<i>C</i>	δ (ppm) <i>experimental</i>	<i>multiplicidad</i> (<i>off resonance</i>)	J_r (Hz)	δ (ppm) <i>reportado</i>
1	38,24	t	10,5	38,2
2	23,62	t	14,7	23,6
3	80,95	d	31,3	80,7
4	37,55	s	-	37,6
5	55,30	d	13,3	55,3
6	18,18	t	15,8	18,3
7	32,56	t	10,5	32,6
8	39,80	s	-	39,7
9	47,57	d	19,3	47,6
10	36,83	s	-	36,8
11	23,47	t	14,0	23,4
12	121,76	d	37,1	121,5
13	145,33	s	-	144,9
14	41,69	s	-	41,7
15	28,33	t	9,8	28,3
16	26,10	t	10,5	26,2
17	32,41	s	-	32,5
18	47,23	d	19,3	47,2
19	46,79	t	10,5	46,8
20	31,00	s	-	31,1
21	34,70	t	10,5	34,8
22	37,13	t	11,4	37,1
23	27,99	q	14,0	28,1
24	16,72	q	15,1	16,8
25	15,46	q	14,0	15,7
26	16,62	q	16,1	16,8
27	25,85	q	14,0	26,0
28	26,87	q	21,0	27,0
29	33,24	q	14,0	33,4
30	23,62	q	17,5	23,6
\underline{CH}_3^-	21,19	q	17,5	21,2
\underline{CO}_2^-	171,12	s	-	170,5

Tabla 7.- Valores de desplazamiento (δ ppm), multiplicidad, y J^r en Hz, en RMN- ^{13}C para el acetato de ψ -taraxasterol determinados por comparación con compuestos modelos

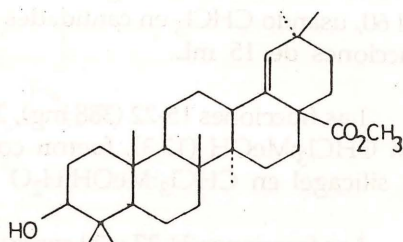
C	δ (ppm) experimental	multiplicidad (off resonance)	J^r (Hz)	δ (ppm) reportado	Referencia (Fig. 37)	
1	38,44	t	11,6	38,4	C-1	(I)
2	23,62	t	9,7	23,6	C-2	(I)
3	81,00	d	23,4	80,7	C-3	(I)
4	37,76	s	-	37,6	C-4	(I)
5	55,40	d	10,5	55,3	C-5	(I)
6	18,13	t	14,0	18,3	C-6	(I)
7	34,16	t	10,5	34,5	C-7	(II)
8	41,06	s	-	40,6	C-8	(II)
9	50,34	d	10,5	51,1	C-9	(II)
10	36,98	s	-	36,8	C-10	(I)
11	21,48	t	10,5	20,9	C-11	(II)
12	26,97	t	8,8	25,9	C-12	(II)
13	42,13	d	23,9	41,2	C-13	(II)
14	42,33	s	-	42,5	C-14	(II)
(15)	27,56	t	12,3	29,3	C-15	(II)
16*	36,69	t	11,6	35,2	C-11	(III)
17	34,36	s	-	33,8	C-17	(I)
18	48,74	d	10,5	49,9-47,6	C-8	(III)
19	39,22	d	14,1	39,7	C-19	(I)
20	139,93	s	-	139,4	C-13	(I)
21	118,99	d	29,3	118,7	C-2	(IV)
22*	36,30	t	18,6	34,5	C-3	(IV)
23	27,90	q	12,3	28,1	C-23	(I)
24	16,38	q	14,1	16,8	C-24	(I)
25	15,99	q	15,8	15,7	C-25	(I)
26	16,23	q	17,6	15,9	C-26	(II)
27	14,63	q	10,5	14,9	C-27	(II)
28	27,56	q	12,3	28,1	C-28	(I)
29	17,60	q	10,5	17,5	C-29	(I)
30	22,45	q	21,8	23,3	C-7	(IV)
$\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -	21,19	q	15,8	21,2	acetato	(I)
$\underline{\text{C}}\text{O}_2$ -	171,08	s	-	170,4	acetato	(I)

* Puede estar intercambiado

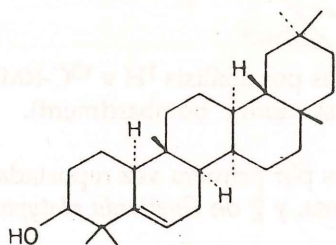
() No bien definido



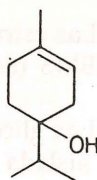
(I) acetato de α -amirina



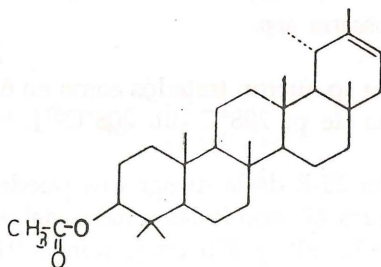
(II) morolato de metilo



(III) glutinol



(IV) ment-1-en-4-ol



(V) acetado de ψ -taraxasterol

Fig. 45.- Moléculas modelo (I-IV) utilizadas para asignar valores de RMN- ^{13}C al acetato de ψ -taraxasterol (V)

• Glicosidos del ácido quinóico de *Uncaria guianensis*¹¹⁶

La corteza seca y molida de *U. guianensis* (250 g) se maceró en AcOEt durante 10 días, obteniéndose 4,97 g de extracto seco. Una

porción del extracto (3,64 g) se cromatografió en una columna de sílica gel 60, usando CHCl_3 en cantidades crecientes de MeOH colectándose fracciones de 15 mL.

Las fracciones 15-22 (388 mg), 24-27 (20 mg) y 29 (80 mg), eluidas con CHCl_3 :MeOH (17:3), fueron combinadas de acuerdo a su CCD en silicagel en CHCl_3 :MeOH:H₂O (40:9:1).

Las fracciones 24-27 y 29 contuvieron una mezcla de los glicósidos 4 y 1 y la fracción 15-22 los glicósidos 2 y 3. Posterior fraccionamiento por HPLC (columna C₁₈- μ Bondapak, MeOH:H₂O, 7:3) produjo 1 (25 mg) y 3 (15 mg) de la fracción más polar y 2 (12 mg) y 3 (15 mg) de la fracción menos polar.

Las estructuras fueron determinadas por análisis ¹H y ¹³C-RMN y FABMS (espectrometría de masa, fast atomic bombardment).

Los glicósidos 3 y 4 son estructuras por primera vez reportadas, 1 fue aislada previamente de *U. tomentosa*, y 2 de *Guettarda platypoda* (Fig. 46).

- *Diosgenina de Dioscorea spp.*

50 g de *Dioscorea* sp. fueron tratados como en 6.2.3 obteniéndose 65 mg de diosgenina de pf 208°C [lit. 208°C⁸¹].

La configuración 25-R de la diosgenina puede apreciarse en el espectro IR de la figura 47, donde las señales del anillo espiroacetal se observan a 990, 930, 910 y 870 cm⁻¹, siendo 910>930.

La acetilación de 20 mg de diosgenina con anhídrido acético y piridina durante 16 horas a temperatura ambiente produjo el acetato de diosgenina de pf 200°C [lit. 199-202°C⁸¹]. En el espectro IR de la figura 48 se observa la disminución de la señal a 3450 cm⁻¹ correspondiente al grupo -OH y la aparición de las señales a 1720 y 1240 cm⁻¹ del grupo éster. El espectro RMN-¹H de la diosgenina se muestra en la figura 49¹⁷.

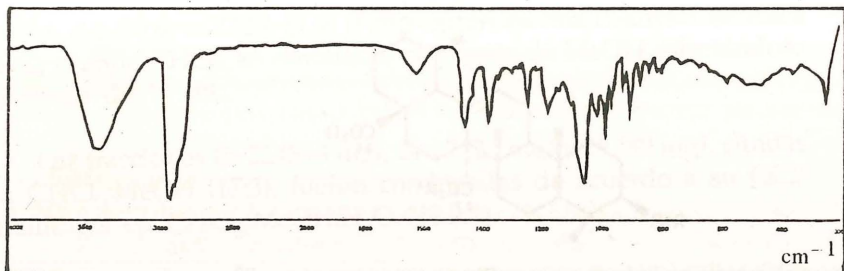


Fig. 47.- Espectro IR de la diosgenina

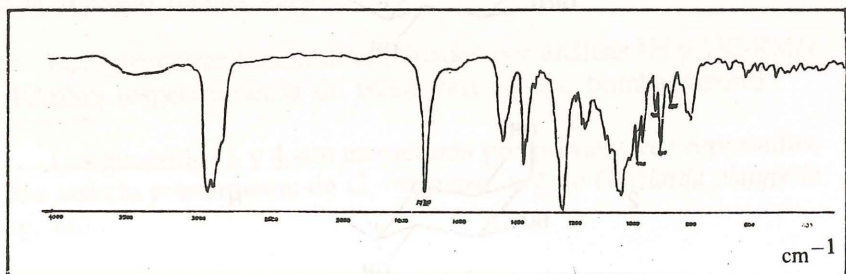


Fig. 48.- Espectro IR del acetato de diosgenina

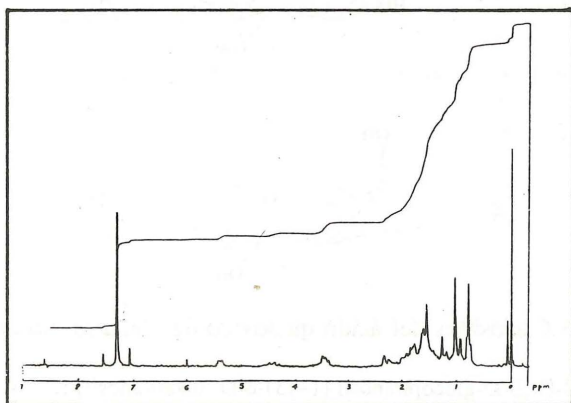


Fig. 49.- Espectro RMN-¹H de la diosgenina

• *Sarsapogenina de Smilax spp.*¹¹⁸

50 g de *Smilax* sp. fueron tratados como en 6.2.3. obteniéndose 46 mg de sarsapogenina de pf 198-199°C [lit. 198-199°C⁸¹].

La configuración 25-S de la sarsapogenina puede apreciarse en el espectro IR de la figura 50, en el que las señales del anillo espiroacetal se observan a 990, 925, 905, 855 cm^{-1} siendo 925>905.

La acetilación de 20 mg de sarsapogenina con anhídrido acético y piridina durante 16 horas a temperatura ambiente produjo el acetato de pf 143-144°C [lit. 143-144°C⁸¹] (Fig. 51).

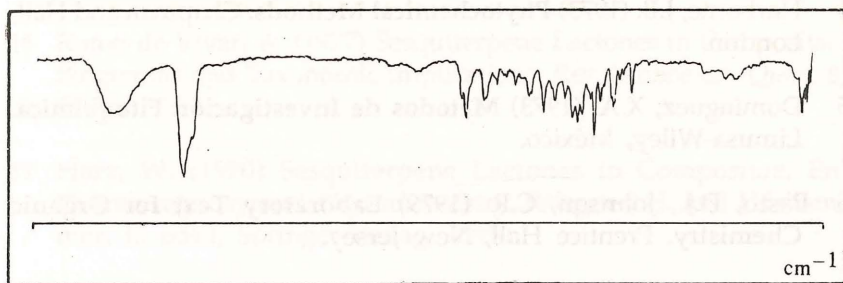


Fig. 50.- Espectro IR de la sarsapogenina

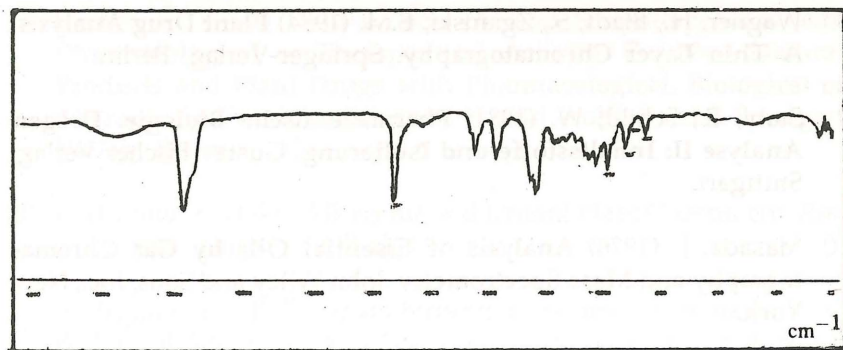


Fig. 51.- Espectro IR del acetato de sarsapogenina

REFERENCIAS

- 1 Geissman, T.A. (1969) **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. Freeman, Cooper & Company, San Francisco.
- 2 Richards, J.H. and Hendrickson, J.B. (1969) **The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins**. Benjamin, W.A., Inc., New York.
- 3 Lawrence, B.M. (1971) Techniques used in Essential Oil Analysis. *Can. Inst. Food Technol. J.* 4, A44-A48.
- 4 Harborne, J.B. (1973) **Phytochemical Methods**. Chapman and Hall, London.
- 5 Domínguez, X.A. (1973) **Métodos de Investigación Fitoquímica**. Limusa-Wiley, México.
- 6 Pasto, D.J., Johnson, C.R. (1979) **Laboratory Text for Organic Chemistry**. Prentice Hall, New Jersey.
- 7 Coscia, C.J. (1975) Chromatography of Terpenoids. En: **Chromatography** (Heftmann, E., ed.). Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- 8 Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. (1984) **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography**. Springer-Verlag, Berlin.
- 9 Stahl, E., Schild, W. (1981) **Pharmazeutische Biologie. Drogen Analyse II: Inhaltsstoffe und Isolierung**. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 10 Masada, J. (1976) **Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 11 Breitmaier, E., Voelter, W. (1978) **^{13}C NMR Spectroscopy**. Verlag Chemie, New York.

- 12 Randriamiharisoa, R., Gaydou, E.M., Faure, R. and Bianchini, J.P. (1986) Carbon-13 NMR Spectra of Five Sesquiterpenes Isolated from Ylang-Ylang Essential Oil. *Mag. Reson. Chem.* 24, 275-276.
- 13 Peralta, J., Molina, M., Lock de Ugaz, O. Resultados no publicados.
- 14 Cabello, I., Zavaleta, M., Gamboa, N., Molina, M., Lock de Ugaz, O. (1993). Resultados no publicados.
- 15 Mango, R., Chavez, J., Lock de Ugaz, O., Holstein, U., Duesler, E. (1990) Sesquiterpene guaiol from *Lepechinia meyenii*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 21, 63-66.
- 16 Romo de Vivar, A. (1977) Sesquiterpene Lactones in Compositae. Biogenesis and Taxonomic Implications. *Rev. Latinoamer. Quim.* 8, 63-74.
- 17 Herz, W. (1970) Sesquiterpene Lactones in Compositae. En: *Pharmacognosy and Phytochemistry*. (Wagner, H. and Hörhammer, L. eds.), Springer-Verlag, Berlin.
- 18 Stuessy, T.F. (1977) *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.C. eds.) Academic Press, London. Vol. 2.
- 19 Sticher, O. (1977) Plant Mono-, Di- and Sesquiterpenoids with Pharmacological or Therapeutical Activity. En: *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity* (Wagner, H. and Wolff, P. eds). Springer-Verlag, Berlin.
- 20 Rodríguez, E. (1978) Allergenic and Irritant Plant Constituent. *Rev. Latinoamer. Quim.* 9, 125-131.
- 21 Rodríguez, E. (1977) Sesquiterpene Lactones: Chemotaxonomy, Biological Activity and Isolation. *Rev. Latinoamer. Quim.* 8, 56-62.
- 22 Rodríguez, E., Towers, G.N.H. and Mitchell, J.C. (1976) Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochem.* 15, 1573.

- 23 Kupchan, S.M. (1974) Novel Natural Products of Biological Interest. *Rev. Latinoamer. Quim.* 5, 133.
- 24 Kupchan, S.M., Fujita, T., Maruyama, M. and Britton, R.W. (1973) The Isolation and Structure Elucidation of Eupaserrin and Desacetylepaserrin, New Antileukemic Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium semiserratatum*. *J. Org. Chem.* 38, 1260.
- 25 Kupchan, S.M., Hemigway, R.J., Werner, D. and Karim, A. (1969) Vernolepin a Novel Sesquiterpene Dilactone Tumor Inhibitor from *Vernonia hymenolepis* A. *Rich. J. Org. Chem.* 34, 3903.
- 26 Lee, K.H., Ibuka, T., Huang, H.C. and Harris, D.L. (1975) Molephantenin a New Potent Antitumor Sesquiterpene Lactones from *Elephantopus mollis*. *J. Pharm. Sci.* 64, 1077.
- 27 Lee, K.H., Kimura, T., Okamoto, M., CowKard, C.M., Mc Phail, A.T., Onan, K.D. (1976) The Structure and Stereochemistry of Eupahysosopin, A New Antitumor Germacranolide from *Eupatorium hyssopifolium*. *Tetrahedron Letters*, 1051.
- 28 Dосkotch, R.W., Hufford, C.D. (1969) Damsin, the Cytotoxic Principle of *Ambrosia ambrosioides* (Cav.) Payne. *J. Pharm. Sci.* 58, 186-188.
- 29 Geissman, T.A. (1973) The Biosynthesis of Sesquiterpene Lactone of the Compositae. En: **Recent Advances in Phytochemistry** (Recneckles, V.C. and T.J. Mabry, eds.). Vol. 6, Academic Press N.Y. and London.
- 30 Fischer, N.H., Olivier, E.J. and Fischer, H.D. (1979) The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. En: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products** (Herz, W., Grisebach, H. and Kirby, G.W., eds.). Vol. 38, Springer-Verlag, Viena.
- 31 Korte, F., Barkemeyer, H. and Korte, I. (1959) Pflanzliche Bitterstoffe. En: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. (Zechmeister, L. ed.) Vol. 17. Springer-Verlag, Viena.

- 32 Romo, J. and Romo de Vivar, A. (1967) The Pseudoguaianolides. En: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.** (Zechmeister, L. ed.) Vol, 25. Springer-Verlag, Viena.
- 33 Herz, W. (1968) Pseudoguaianolides in Compositae. En: **Recent Advances in Phytochemistry** (Mabry, T.J., Alston, R.E., Recneckles, V.C., eds.) Vol. 1. Appleton-Century-Crofts, N.Y.
- 34 Sorm, F. (1971) Sesquiterpenes with Ten-Membered Carbon Rings. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 6.
- 35 Pinder, A.R. (1977) The Chemistry of the Eremophilane and Related Sesquiterpenes. En: **Progress in the Chemistry of Natural Products.** (Herz, W., Grisebach, H. and Kirby, G.W., eds.) Vol 34. Springer-Verlag, Viena.
- 36 Yoshioka, H., Mabry, T.J. and Timmermann, B.N. (1973) Sesquiterpene Lactones Chemistry, NMR and Plant Distribution. Tokio: University of Tokio Press.
- 37 Fischer, N.H. (1978) On the Biogenesis of Pseudoguaianolides, *Rev. Latinoamer. Quim.* **9**, 41.
- 38 Fischer, N.H., Wiley, R.A. and Perry, D.L. (1976) Sesquiterpene Lactones from *Melampodium* (Compositae, Heliantheae) Structural, and Biosynthetic Considerations. *Rev. Latinoamer. Quim.* **7**, 87.
- 39 Fraga, B.M. (1992) Natural Sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Reports*, **9**, 217-241.
- 40 Fraga, B.M. (1992) Natural Sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Reports*, **9**, 557-580.
- 41 Seaman, F.C., Fischer, N.H. (1980) New Germacranolide and Heliangolide-Type Sesquiterpene Lactones from *Melampodium linearilobum*. *Phytochem.* **19**, 849-856.
- 42 Malcom, A., Difeo, D., Fischer, N.H. (1982) Germacranolides from *Melampodium pilosum*. *Phytochem.* **21**, 151-155.

- 43 Borges del Castillo, J., Manresa, M.T., Rodríguez Luis, F., Vázquez, P., Gupta, M., Joseph-Nathan, P. (1982) New Sesquiterpene Lactones from *Neuroleana lobata*. *J. of Nat. Prod.* **45**, 762-765.
- 44 Bohlmann, F., Jakupovic, J., Hartono, L., King, R.M., Robinson, H. (1985) A further Steiractinolide Derivative from *Spilanthes leiocarpa*. *Phytochem.* **24**, 1100-1101.
- 45 Klimash, J.W., Fischer, N.H. (1981) Four New cis-cis-Germacranolides from Citotoxic Fractions of *Melampodium cinereum*. *Phytochem.* **20**, 840-842.
- 46 Cortés, E., Miranda, R., Romo, J. (1977) Espectrometría de Masas de Lactonas Sesquiterpénicas de la Serie Pseudoguaianólidos II. *Rev. Latinoamer. Quim.* **8**, 168-171.
- 47 Cortés, E., Miranda, R., Romo, J. (1977) Espectrometría de Masas de Lactonas Sesquiterpénicas de la Serie Pseudoguaianólidos I. *Rev. Latinoamer. Quim.* **8**, 39-45.
- 48 Borges del Castillo, J.... comunicación personal.
- 49 Borges, J., Manresa, M.T., Martín, J.L., Pascual, C., Vázquez, P. (1978) Altamisin, a New Sesquiterpene Lactone from *Ambrosia cumanensis* H.B.K. *Tetrahedron Letters* 1513-1514.
- 50 Joseph-Nathan, P., Espiñeira, J., Gibaja, S. (1980) Resonancia Magnética Nuclear de C-13 de algunos Pseudoguaianólidos. *Rev. Latinoamer. Quim.* **11**, 35-44.
- 51 Ganzer, V., Jakupovic, J. (1990) Schkuhripinnatolides unusual Sesquiterpenlactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochem* **29**, 535-539.
- 52 Kupchan, S.M., Karim, A., Marcks, C. (1968) Taxodiones and Taxodone, Two Novel Diterpenoid Quinone Methide Tumor Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5923-5924.
- 53 Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Goggan, R., Mc. Phail, A. (1971) The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic

- and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2326.
- 54 *Fitoterapia* **64** Suplemento al N°1 1993. Todo el volumen de 81 páginas está referida al taxol, en artículos por diferentes autores.
- 55 Kupchan, S.M., Sigel, C.W., Matz, M.J., Gilmore, C.J., Bryan, R.F. (1976) Structure and Stereochemistry of Jatrophone, a Novel Macrocyclic Diterpenoid Tumor Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2295.
- 56 Kupchan, S.M., Siegel, C.W., Matz, M.J., Renault, L.A.S., Haltiwagen, R.C., Bryan, R.F. (1970) Jatrophone, a Novel Macrocyclic Diterpenoid Tumor Inhibitor from *Jatropha gossypifolia* L. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4476-4477.
- 57 Kupchan, S.M., Sweeny, J.G., Bate, R.L., Murae, T., Zimmerly, V.A., Sickles, B.R. (1975) Gnididin, Gnidetrin and Gnidicin, Novel Potent Antileukemic Diterpenoid Esters from *Gnidia lamprantha*. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 672.
- 58 Kupchan, S.M., Uchida, I., Branfman, A.R., Dailey, R.G.Jr., Yu Fei, B. (1976) Antileukemic Principle Isolated from Euphorbiaceae Plants, *Science* **191**, 571-572.
- 59 Ichihara, Y., Takeiza, K., Hitotsuyanagi, Y., Morita, H., Okuyama, S., Suganuma, M., Fujiki, H., Motidome, M., Itokawa, H. (1992) Cajucarinolide and Isocajucarinolide: Antiinflammatory Diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Médica* **58**, 549-551.
- 60 Cal, Y., Chen, P.Z., Phillipson, J.D. (1993) Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochem.* **32**, 755-760.
- 61 De Souza, N.J. (1993) Industrial Development of Traditional Drugs: The Forskolin Example: A Mini Review (1993), 112. *J. of Ethnopharmacology* **38**, 177-180.
- 62 Hanson, J.R. and Olivera, B.H. (1993) Stevioside and Related Sweet Diterpenoid Glycosides. *Nat. Prod. Reports* **10**, 301-309, y todas las referencias allí incluidas.

- 63 Rossomando, P.C., Giordano, O.S., Espiñeira, J. and Joseph-Nathan, P. (1985) A Diterpene Acid from *Baccharis tucumanensis*. *Phytochem.* **24**, 787-790.
- 64 Michavila, A., Fernandez-Gadea, F., Rodriguez, B. (1986) Abietane Diterpenoids from the Root of *Salvia lavandulaefolia*. *Phytochem.* **25**, 266-268.
- 65 De Tommasi, N., Aquino, R., De Simone, F., Piacente, S., Pizza, C. (1992) Diterpenes from *Werneria dactylophylla*. *Phytochem.* **31**, 1042-1043.
- 66 Piacente, S., Aquino, R., De Tommasi, N., Pizza, C., Lock de Ugaz, O., Chavez, H., Mahmood, N. Constituents of *Werneria ciliolata* and Their in Vitro Anti-HIV Activity. En prensa.
- 67 Richards, J.H. and Hendrickson, J.B. (1969) **The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenines**. Benjamin, W.A., Inc. New York.
- 68 Gawienowski, A. and Gibbs, C. (1969) The Isolation of Estrone from Apple seeds. *Phytochem.* **8**, 685-686.
- 69 Bennett, R.D., Ko, S.T., Heftmann, E. (1966) Isolation of Estrone and Cholesterol from the Date Palm, *Phoenix dactylifera* L. *Phytochem.* **5**, 231-235.
- 70 Van Rompuy, L.L. and Zeevaart, J.A.D. (1979) Are Steroidal Estrogens Natural Plants Constituents? *Phytochem.* **18**, 863-865.
- 71 Yamauchi, T., Abe, F., Nishishita, Y., Okabe, H., Shima, K. and Nishibe, S. (1979) Preganes from *Anodendron affine* Apocinaceae. *Phytochem.* **18**, 1240-1241.
- 72 Kulshreshtha, M.J., Kulshreshtha, D.K. and Rastogi, R.P. (1972) The Triterpenoids. *Phytochem.* **11**, 2369-81.
- 73 Pant, P. and Rastogi, R.P. (1979) The Triterpenoids. *Phytochem.* **18**, 1095-1108.

- 74 Das, M.C. and Mahato, S.B. (1983) Triterpenoids. *Phytochem.* **22**, 1071-1095.
- 75 Mahato, S.B., Nandy, A.K., Roy, G. (1992) Triterpenoids. *Phytochem.* **31**, 2199-2249.
- 76 Silva, M. (1992) **Química de los Triterpenos**. Monografía OEA. Serie Química N°24, EUA.
- 77 Basu, N., Rastogi, R.P. (1967) Triterpenoids Saponins and Sapogenins. *Phytochem.* **6**, 1249-1270.
- 78 Agarwal, S.K., Rastogi, R.P. (1974) Triterpenoids Saponins and their Genins. *Phytochem.* **13**, 2623-2645.
- 79 Chandel, R.S., Rastogi, R.P. (1980) Triterpenoids Saponins and Sapogenins: 1973-1978, *Phytochem.* **19**, 1889-1908.
- 80 Mahato, S.B., Nandy, A.K. (1991) Triterpenoid Saponins. *Phytochem.* **30**, 1357-1390.
- 81 Elks, J. (1971) Steroid Saponins and Sapogenins. En: **Rodd's Chemistry of Carbon Compounds** (Coffey, S. ed.) 2nd. ed. Vol. IIE. Elsevier, Amsterdam.
- 82 Elks, J. (1971) En: **Rodd's Chemistry of Carbon Compounds** (Ansell, M.F. ed.) Supplement to the 2nd. ed. Vol. IID. Elsevier, Amsterdam.
- 83 Takeda, K. (1972) The Steroidal Sapogenins of the Dioscoreaceae. En: **Progress in Phytochemistry** Vol. 3 (Reinhold, L. and Liwschitz, Y. eds.) Interscience, New York.
- 84 Roddick, J.G. (1974) The Steroidal glycoalkaloid- α -tomatina. *Phytochem.* **13**, 9-25.
- 85 Mahato, S.B., Ganguly, A.N., Sahu, N.P. (1982) Review. Steroid Saponins. *Phytochem.* **21**, 959-978.

- 86 Hashimoto, Y. (1970) Diferenciação de Esteróides e Triterpenoides pela Reacao Corada. *An. Acad. Brasil. Cienc.* **42**, (suplemento), 95-96.
- 87 Fieser, L.F. and Fieser, M. (1959) **Steroids**. Reinhold Publishing Corporation. New York.
- 88 Heftmann, E. (1976) **Chromatography of Steroids**. Journal of Chromatography Library, Vol. 8, Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.
- 89 Heftmann, E. (1975) Chromatography of Steroids. En: **Chromatography**. (Heftmann, E. ed.) Van Nostrand Reinhold-Co. E.U.A.
- 90 Heftmann, E., Ko, S.T., Bennett, R. (1966) Response of Steroids to Sulphuric Acid in Thin Layer Chromatography. *J. Chromatog.* **21**, 490-494.
- 91 Barua, A.K., Dutta, S.P., Pal, S.K. (1968) Thin Layer Chromatography of Pentacyclic Triterpenes. *J. Chromatog.* **31**, 569-571.
- 92 Ziminski, T. and Barowski, E. (1967) A New Spray Reagent Replacing Sulphuric Acid in Thin Layer Chromatography. *J. Chromatog.* **23**, 480-482.
- 93 Bennett, R.D. and Heftmann, E. (1966) Separation of Closely Related Steroids by an Improved Technique for Continuous Development of Thin Layer Chromatograms. *J. Chromatog.* **21**, 488-490.
- 94 Tal, B. and Goldberg, I. (1981) High Performance Liquid Chromatographic Separation of Steroidal Sapogenins. *Lloydia* **44**, 750-751.
- 95 Ikan, R. and Gottlieb, R. (1970) Gas Chromatography of Tetra and Pentacyclic Triterpenes. *Isr. J. Chem.* **8**, 685-689.
- 96 Glenn, P.W. (1971) Relation between Structure and Retention Time of Sterols in Gas chromatography. *Anal. Chem.* **70**, 1165.

- 97 Lock de Ugaz, O., Salked, C. (1982) Aislamiento e Identificación de dos Triterpenos de *Perezia coerulescens* Wedd. *Bol. Soc. Quim. del Perú*, **42**, 139-147.
- 98 Nozaki, H., Suzuki, H., Hirayama, T., Kasai, R., Wu, R.Y., Lee, K.H. (1986) Antitumor Triterpenes of *Maytenus diversifolia*. *Phytochem.* **25**, 479-483.
- 99 Gupta, M., Lal, R.N., Shukla, Y.N. (1981) 5 α -Stigmast-9(11)-en-3-ol, A Sterol from *Costus speciosus* Roots. *Phytochem.* **20**, 2257-2259.
- 100 Faini, F., Torres, R., Castillo, M. (1984). 25(R)-Isonuatigenin an Unusual Steroidal Sapogenin from *Vestia lycioides*. *Phytochem.* **23**, 1301-1303.
- 101 Wehrli, F.W., Nishida, T. (1979) The Use of C-13 NMR in Natural Products Chemistry. En: *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe* (Zechmeister, L. ed.) Vol. 36, Springer-Verlag, Viena.
- 102 Eggert, H. and Djerassi, C. (1975) ¹³C NMR Spectra of Sapogenins. *Tetrahedron Letters* **42**, 3635-3638.
- 103 Agrawal, P.K., Jain, D.C., Gupta, R.K., Thakur, R.S. (1985) Carbon-13 NMR Spectroscopy of Steroidal Sapogenins and Steroidal Saponins. *Phytochem.* **24**, 2479-2496.
- 104 Mahato, S.B., Sahu, N.P., Ganguly, A.N., Kasai, R., Tanaka, O. (1980) Steroidal Alkaloids from *Solanum khasianum*. Application of ¹³C NMR Spectroscopy to their Structural Elucidation. *Phytochem.* **19**, 2017-2020.
- 105 Waiss, A.C., Elliger, C.A., Haddon, W.F., Benson, M. (1993) Insect Inhibitory Steroidal Saccharide Esters from *Physalis peruviana*. *J. of Nat. Prod.* **56**, 1365-1372.
- 106 Budzikiewics, H., Wilson, J.M., Djerassi, C. (1963) Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII, Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688-3699.
- 107 Ogunkoya, L. (1981) Application of Mass Spectrometry in Structural Problems in Triterpenes. *Phytochem.* **20**, 121-126.

- 108 Morris, M.P., Roark, B.A., Cáncel, B. (1958) Simple Procedure for the Routine Assay of Dioscorea Tubers. *Agric. Food Chem.* 6, 856-858.
- 109 Brain, K.R., Fazli, F.R.Y., Hardman, R., and Wood, A.A. (1969) The Rapid Quantitative Determination of C₂₅ Epimeric Steroidal Sapogenins in Plants. *Phytochem.* 7, 1815-1823.
- 110 Jefferies, T.M. and Hardman, R. (1976) An Improved Column-Chromatography Quantitative Isolation of Diosgenin and Yamogenin from Plant Crude Extracts Prior to Their Determination by Infrared Spectrophotometry. *Analyst.* 101, 122-124.
- 111 Baccou, J.C., Lambert, F. and Sauvaire, Y. (1977) Spectrophotometric Method for the Determination of Total Steroidal Sapogenin. *Analyst.* 102, 458-465.
- 112 Cooke, B.K. (1970) Determination of Diosgenin in Dioscorea deltoidea and Dioscorea sylvatica by using Gas-Liquid Chromatography. *Analyst.* 95, 95-97.
- 113 Rozanski, A. (1972) A Simplified Method of Extraction of Gas-Liquid Chromatography. *Analyst.* 97, 968-972.
- 114 Mahato, S.B., Sahu, N.P., Roy, S.K. (1981) High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Diosgenin in Plants. *J. Chromatog.* 206, 169-173.
- 115 Lock de Ugaz, O., Fort, D. (1984) Triterpenos de Vernonia baccharoides. *Bol. Soc. Quim. del Perú,* 50, 258-261.
- 116 Yopez, A.M., Lock de Ugaz, O., Alvarez, C.M., De Feo, V., Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C. (1991) Quinovic Acid from Uncaria guianensis. *Phytochem.* 30, 1635-1637.
- 117 Lock de Ugaz, O., Arévalo, R., Chong, M. (1986) Resultados no publicados.
- 118 Lock de Ugaz, O., Arévalo, R. (1986) Resultados no publicados.

III

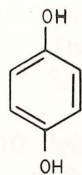
Compuestos fenólicos

1. INTRODUCCION

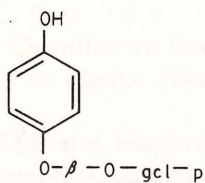
Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Dada la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos, ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo. Así mismo muestran desplazamiento batocrómico característico en presencia de álcalis.

Los compuestos fenólicos que se tratarán en este capítulo son los flavonoides, cumarinas, cromenos y benzofuranos, xantonas, y quinonas. Debemos destacar que^{1,2} a) algunos compuestos dentro de los arriba nombrados podrían no contener el OH fenólico libre, b)

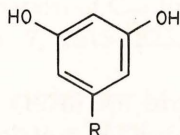
• Compuestos fenólicos monocíclicos simples



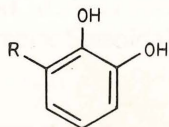
hidroquinona



arbutina

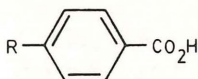


R = H, resorcinol
R = Me, orcinol
R = OH, florigucinol

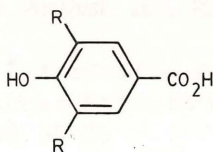


R = H, catecol
R = OH, pirogalol

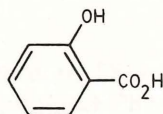
• Acidos fenólicos



R = OH, ac. p-hidroxibenzoico
R = OMe, ac. vainillico



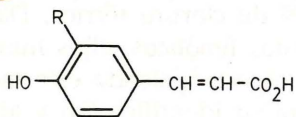
R = OH, ac. gálico
R = OMe, ac. siringico



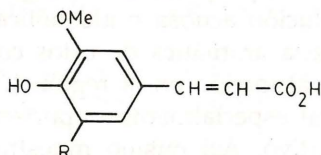
ac. salicilico

• Fenilpropanoides

ácidos hidroxicinámicos

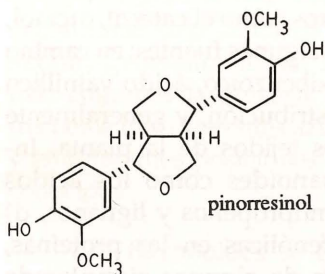


R = H, ac. p-coumarico
R = OH, ac. cafeico

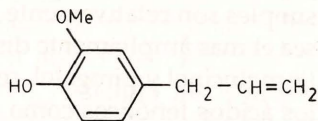


R = H, ac. ferulico
R = OMe, ac. sinápico

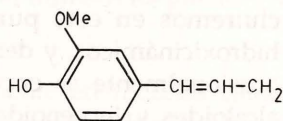
lignanós



fenilpropenos



eugenol



isoeugenol

• Taninos (hidrolizables)

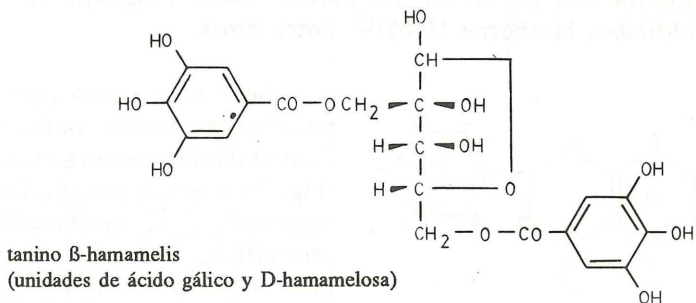
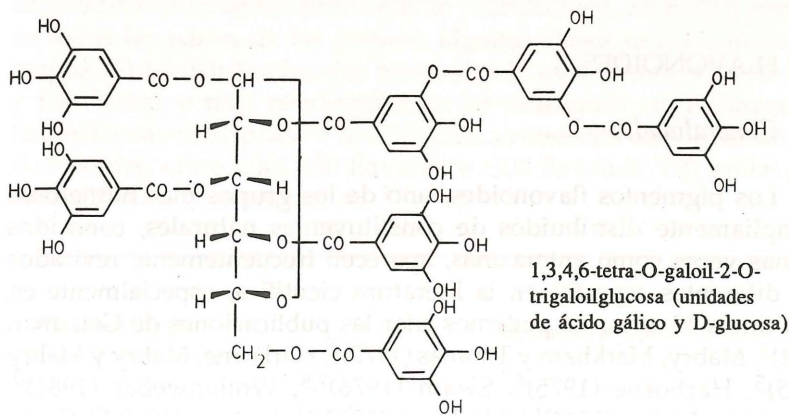


Fig. 1.- Algunas estructuras de fenoles, ácidos fenólicos, fenilpropanoides y taninos hidrolizables

varios grupos de materiales poliméricos de plantas como las ligninas y taninos son polifenólicos, c) compuestos fenólicos monocíclicos simples son relativamente raros en las plantas, quizás la hidroquinona sea el mas ampliamente distribuido, pero otros como el catecol, orcinol, floroglucinol y pirogalol, se reportan solo de algunas fuentes; en cambio los ácidos fenólicos como el ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainillico y ácido siríngico, son universales en su distribución, y generalmente son liberados de la hidrólisis ácida de los tejidos de la planta. Incluiremos en este punto a los fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos, y derivados como los fenilpropenos y lignanos, d) ocasionalmente se encuentran unidades fenólicas en las proteínas, alcaloides y terpenoides. En la figura 1 se da algunos ejemplos de estos compuestos.

2. FLAVONOIDES

2.1. Generalidades

Los pigmentos flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antotaxinas, aparecen frecuentemente revisados bajo diferentes aspectos en la literatura científica, especialmente en los últimos 30 años; así podemos citar las publicaciones de Geissman (1962)³, Mabry, Markham y Thomas (1970)⁴, Harborne, Mabry y Mabry (1975)⁵, Harborne (1975)⁶, Swain (1976)^{7,8}, Wollenweber (1981)⁹, Harborne y Mabry (1982)¹⁰, Markham (1982)¹¹, Ingham (1983)¹², Cody, Middleton, Harborne (1985)¹³, entre otros.

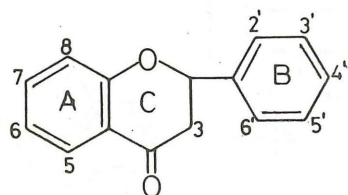


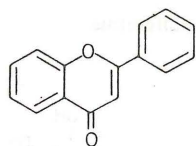
Fig. 2.- Núcleo básico de un flavonoide

Se conoce como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (Fig. 2) y están arreglados bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C.

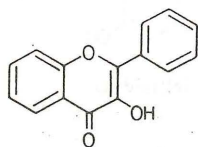
En la figura 3 se puede observar ejemplos típicos para cada clase; las antocianinas pertenecen también a esta clase de compuestos pero son estudiadas aparte. Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, aún de las diferentes clases siendo esto último más común; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizados. Se hallan presente en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas¹², las chalconas y auronas¹⁴. Al año 1990 se conocen alrededor de 3000 flavonoides, entre ellos 450 flavonoles, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auronas, etc.²

Núcleo básico.

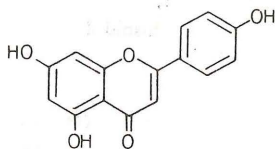


flavona

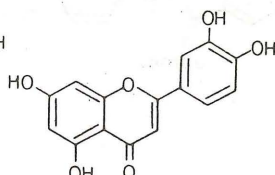


flavonol

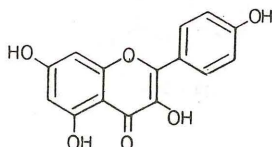
Algunos ejemplos



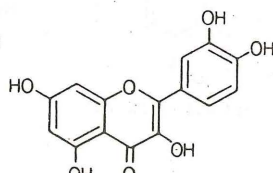
apigenina



luteolina



kaemferol



quercetina

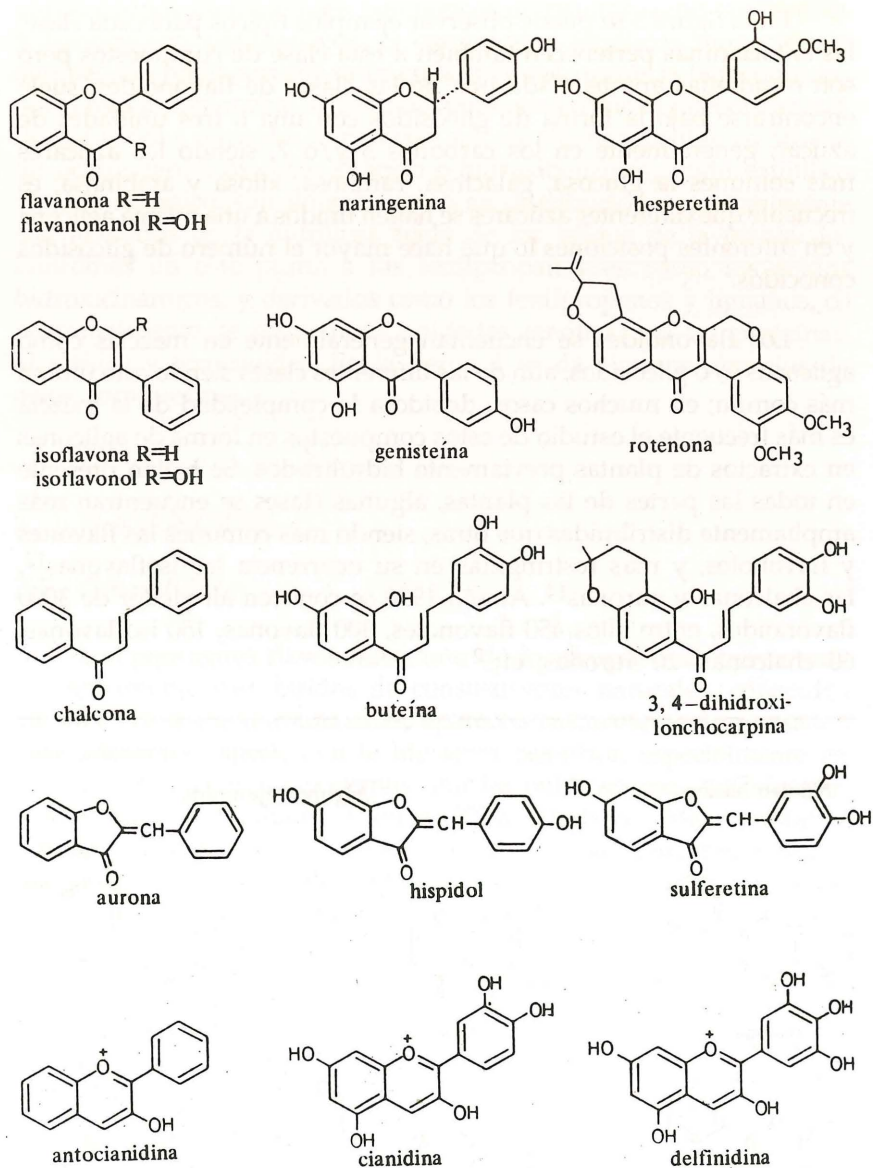


Fig. 3.- Clases de flavonoides: núcleo básico y ejemplos

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; ésto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura. Compuestos nuevos requieren exámenes químicos y espectroscópicos más detallados.

Los flavonoides se forman biogénicamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato^{11,15,16} (Fig. 4), siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir de la cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurren en varias etapas. Así mismo, cada una de estas clases puede sufrir posteriores metilaciones, isoprenilaciones o glicosidaciones de los grupos hidroxilos, metilaciones de grupos o-hidroxilos, dimerizaciones, etc.

Ejemplos adicionales, de otros flavonoides, se indican en la figura 5. En las referencias señaladas previamente puede encontrarse listas del gran número de flavonoides existentes.

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones, mencionaremos la de los glucósidos de dihidrochalconas como edulcorantes, de la rotenona como insecticida, etc.

La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género *Citrus*: rutina y derivados), dilatadores de las coronarias (proantocianidinas de *Crataegus*, *Arnica* y *Gingko*), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatotóxica (silimarina de *Silybum*), colerética, estrógena y diurética. Destacaremos asimismo la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción

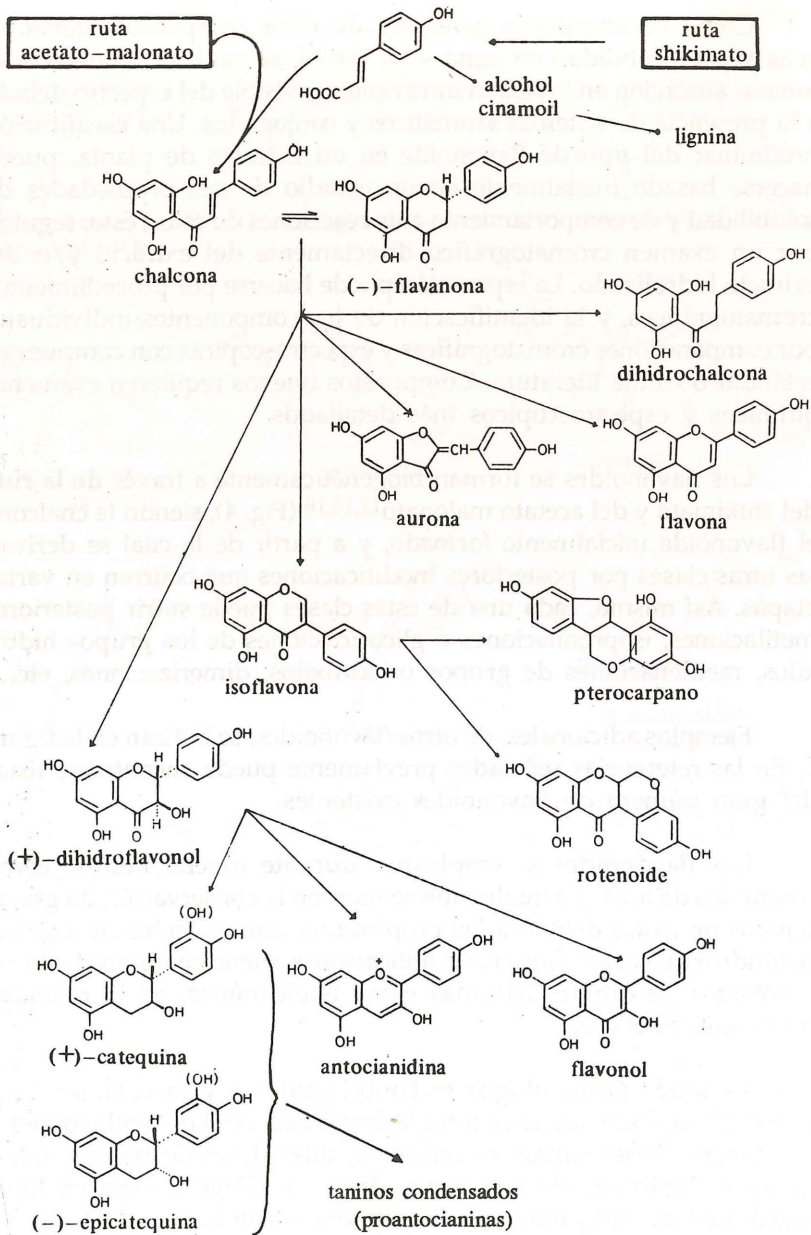
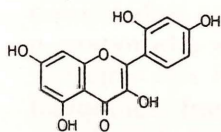
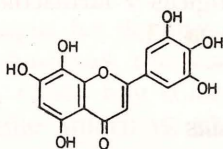


Fig. 4.- Ruta biogenética para los flavonoides

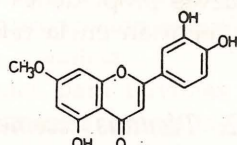
Agliconas



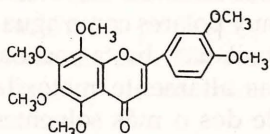
morina



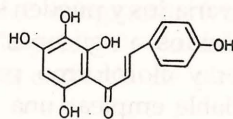
hibiscetina



ramnetina

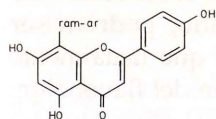


nobiletina

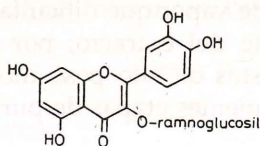


cartamina

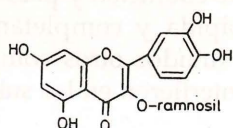
Glicósidos



molupetin-2''-O-ramnósido¹⁷

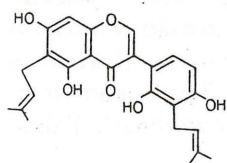


rutina



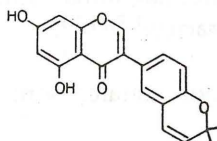
quercitrina

Prenilados



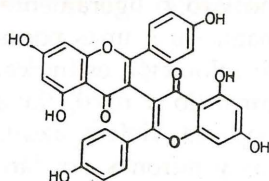
angustona A

Pirano flavonoides



licoisoflavona B

Biflavonoides



3, 3''-biapigenina

Fig. 5.- Otros ejemplos de flavonoides.

fungitóxicas de isoflavonas, como las de algunas especies de *Lupinus*¹⁸. Nuevas propiedades biológicas y farmacológicas de los flavonoides se reportan en la referencia 13.

2.2. Técnicas recomendadas

2.2.1 De extracción

Los solventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden de lipofílico a hidrofílico; ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua, aunque en este último caso se presenta la desventaja de su alto punto de ebullición y presión de vapor que dificultan luego el ser removido rápida y completamente del extracto; por otro lado, podrían ser extraídos otros compuestos de alto peso molecular que usualmente interfieren en las subsiguientes etapas de purificación del flavonoide.

2.2.2 Reacciones de color

La reacción más usual para la detección de los flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shinoda: al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl conc., el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración^{1,3,11,19}.

Otras reacciones de color usuales son:

- **Reacción con álcalis:** los extractos acuosos pueden mostrar variaciones de color con el agregado de un álcali, si hay presencia de flavonas, flavanonoles e isoflavonas se ponen amarillas; flavononas y flavonoles cambian de amarillo a naranja; chalconas de naranja a rojizo.

- Prueba de Marini Bettolo: con solución de SbCl_5 en CCl_4 , los flavonoides en general dan colores característicos o formación de precipitados; por ejemplo, las flavonas dan precipitado amarillo o anaranjado, y las chalconas, rojo oscuro o violeta.
- Reacción con H_2SO_4 conc.: hay coloraciones para flavonas y flavonoles, fuertemente amarillas; flavanonas, anaranjadas o guindas; chalconas y auronas, rojo guinda o rojo azulado.
- Reactivo de Dimroth: solución de H_3BO_3 en Ac_2O , las 5-hidroxiflavonas dan soluciones anaranjadas o rojas.
- Reacción con solución acuosa o etanólica de FeCl_3 : aunque hay coloración en presencia de cualquier compuesto fenólico, la aparición de un color verde sugiere la presencia de un derivado de catecol y de un color azul de un derivado de pirogalol.

En algunos casos puede realizarse pruebas directamente sobre el material; por ejemplo, si los pétalos blancos de una flor en presencia de vapores de amoníaco se ponen amarillos es indicativo de flavonas y/o flavonoles, si viran de amarillo a rojo hay presencia de chalconas y auronas.

2.2.3 Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas usadas para la separación de flavonoides o su detección en un extracto de planta son también muy variadas en cuanto a las técnicas mismas, así como las condiciones en las cuales ellas puedan realizarse; no se pretende en este punto abarcar todas ellas sino dar pautas generales, las que deben ser ampliadas con la literatura más especializada.

La cromatografía de papel es la técnica más antigua, y aún usada desde su introducción en 1948 por Bate Smith, se utilizan sistemas de solventes como BAW (n-buOH:HOAc:H₂O, 4:1:5, fase superior), TBA (t-buOH:HOAc:H₂O, 30:10:3), CAW (CHCl₃:HOAc:H₂O, 30:15:2), Forestal (HOAc:H₂O:HCl, 30:10:3). Sucesivas CP en los sistemas siguientes pueden ser usados para posteriores purificaciones de flavonoides previamente aislados: BW (n-buOH: H₂O, 1:1, fase superior), 5HA (5% HOAc acuoso), BEW (n-buOH: EtOH:H₂O, 4:1:2,2, fase superior). Los flavonoides pueden ser desorbidos de una CCDP con MeOH si se trata de agliconas, y con MeOH:H₂O (1:1) en caso de glicósidos²⁰.

Es recomendable para examinar la complejidad de la mezcla en un extracto crudo, correr una CP bidimensional, en la cual el primer sistema sería uno de los nombrados y entonces HOAc diluido (2-15%)^{1,4,19}.

Una generalidad puede asumirse al utilizarse sistemas con solventes alcohólicos para las agliconas flavonoides, que para una misma clase el valor de R_f es más bajo cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo, y son en la mayoría de los casos más altos que los correspondientes glicósidos.

La cromatografía de capa delgada ha sido utilizada en adsorbentes como celulosa, poliamida y silicagel en sistemas como los que se indican a continuación:

<i>Sistemas</i>	<i>para</i>	<i>en</i>
TBA, BAW, 5-40% HOAc	glicósidos	celulosa
TBA, CAW, 50% HOAc ó	agliconas polares	celulosa
10-30% HOAc	agliconas no polares	celulosa
BPA (bz: Py:HCO ₂ H, 36:9:5)	agliconas polares	silicagel
CAA (CHCl ₃ :Me ₂ CO:HCO ₂ H, 9:2:1)	agliconas	silicagel
CHCl ₃ :MeOH (15:1 a 3:1)	agliconas no polares	silicagel

Otros sistemas usuales son:

bz:Py:NH ₃ (80:20:1 gt) ²¹	agliconas	silicagel
EtOAc:HCO ₂ H:H ₂ O:MeOH (10:2:2:1) ²²	agliconas no polares	silicagel
EtOAc:Py:H ₂ O:MeOH (16:4:2:1) ²³	glicósidos	silicagel
EtOH:Py:H ₂ O:MeOH (80:12:10:5) ²⁴	glicósidos	silicagel
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (65:45:12) ²⁵	glicósidos	silicagel
CHCl ₃ :HOAc (100:4) ²⁶	glicósidos	silicagel
bz:HOAc (100:4)	glicósidos	silicagel
CHCl ₃ :HOAc:MeOH (90:5:5)	agliconas	poliamida
bz:MEK:MeOH (4:3:3) ²⁷	agliconas	poliamida
bz:petróleo:MEK:MeOH (60:26:7:7) ²⁸	agliconas	poliamida
MeOH:HOAc:H ₂ O (18:1:1) ^{29,30}	agliconas o glicósidos	poliamida
H ₂ O:n-buOH:Me ₂ CO:HOAc (16:2:2:1) ³¹	glicósidos	poliamida

La detección de los flavonoides en ambas cromatografías, de papel y de capa delgada, puede hacerse por el color que desarrollan en el Vis o en el UV, apareciendo como manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco. Geissman³ y Markham¹¹ reportan la relación que existe entre los colores y la posible estructura del flavonoide, algunas de las cuales se indican en la Tabla 1.

Tabla 1.- Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide^{3,11}

Color de la mancha a la luz UV		Posible tipo de flavonoide
Sin NH ₃	Con NH ₃	
púrpura	amarilla, amarilla verdosa o verde	<ul style="list-style-type: none"> • 5-OH flavonas o flavonoles (3-0 substituidos) con 4'-OH • 5-OH flavanonas
	sin cambio o con pequeños cambios	<ul style="list-style-type: none"> • flavonas o flavanoles-3-0- substituidos, con 5-OH pero sin 4'-OH libre • 6- ó 8- OH flavona y 3-0- substituidos flavonoles con 5-OH • isoflavonas, dihidroflavonoles y flavanonas con -5-OH • chalcona con 2'- ó 6'-OH, pero sin 2- ó 4-OH libre
	celeste roja o naranja	<ul style="list-style-type: none"> • 5-OH flavanona • chalcona con 2- y/o 4-OH
celeste fluo rescente	fluorescente	<ul style="list-style-type: none"> • flavonas y flavanonas sin 5 -OH libre
	amarilla-verdosa	<ul style="list-style-type: none"> • flavonoles sin 5-OH libre y con 3-OH substituido
	sin cambio o con pequeños cambios	<ul style="list-style-type: none"> • isoflavonas carente de 5-OH libre

invisible	fluorescente celeste	<ul style="list-style-type: none"> • isoflavonas carente de 5-OH libre
amarilla-amarilla opaca o naranja fluorescente	sin cambio o pequeño cambio	<ul style="list-style-type: none"> • flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre
amarilla fluorescente	amarilla o naranja	<ul style="list-style-type: none"> • aurona con un 4'-OH libre y algunas chalconas 2- ó 4-OH
amarilla-verdosa, azul-verdosa o verde	sin cambio o con pequeños cambios	<ul style="list-style-type: none"> • aurona carente de 4'-OH libre y flavanona carente de 5-OH libre • flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre

Es también común el uso de otros agentes cromogénicos como la vainillina-HCl (5% de vainillina en EtOH se mezcla con HCl conc. en la relación 4:1, justamente antes del uso), se observan coloraciones rojas o púrpura-rojizas con la presencia de catequina y proantocianidinas, las flavanonas y dihidroflavonoles lo hacen más lentamente; el complejo difenilboriloxietilamina (Naturstoffreagenz A), cuya aplicación de una solución al 1% en MeOH revelan todos los 3',4'-dihydroxiflavonas y flavonoles como manchas naranjas (UV o Vis), mientras que los equivalentes 4'-hidroxi aparecen amarillas verdosas; solución acuosa o etanólica al 1% de cloruro férrico que revela la presencia de todos los compuestos fenólicos, como ya lo indicamos antes^{11,32}. Otros reactivos se indican en el Apéndice.

La CC permanece como una técnica muy usual para purificaciones preliminares y para separaciones a escala preparativa de grandes cantidades de flavonoides de extractos crudos de plantas. Los adsorbentes usuales son los mismos que para la CCD y últimamente se está usando gel de Sephadex tipos G y LH-20. A continuación se da una relación de sistemas de elución utilizados para agliconas o glicósidos con los diferentes empaques.

<i>Sistema</i>	<i>para</i>	<i>en</i>
CHCl ₃ :MeOH:MEK:Me ₂ CO (40:20:5;1) ²⁷	agliconas	poliamida
bz:petróleo:MEK:MeOH (60:26:3,5:3,5) ²⁸	agliconas	poliamida
MeOH:H ₂ O (en diferentes proporciones) ^{27,33}	glicósidos	poliamida
Me ₂ CO:H ₂ O (en diferentes proporciones) ³⁴	glicósidos	poliamida
CHCl ₃ :MeOH (en diferentes proporciones) ³⁵	agliconas	silicagel
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (80:20:1,65:20:2, 80:18:2) ^{25,26}	glicósidos	silicagel
EtOAc:Me ₂ CO:H ₂ O (25:5:1) ²⁵	glicósidos	silicagel
H ₂ O ³⁷	glicósidos	Sephadex G-10
H ₂ O-Me ₂ CO (8:2→6:4) ³⁰	glicósidos	Sephadex G-25
MeOH ³⁶	glicósidos	Sephadex LH-20
MeOH:H ₂ O (en diferentes proporciones) ³⁶	glicósidos	Sephadex LH-20
CHCl ₃ :MeOH (9:1) ³⁵	glicósidos	Sephadex LH-20
Me ₂ CO:MeOH:H ₂ O (2:1:1) ³⁴	glicósidos	Sephadex LH-20

En el campo de los flavonoides el HPLC ha sido bastante utilizado por ser una técnica precisa y sensible el cual produce resultados en minutos comparado a los procedimientos clásicos que requieren días o semanas, y requieren además grandes cantidades de material. Su aplicación ha sido para comprobar la pureza de un compuesto, para determinaciones cuantitativas y para separaciones a pequeña escala.

La mayor parte de las separaciones por HPLC se ha realizado utilizando columnas llamadas de fase reversa RP, ya que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, de esta forma los solutos más polares poseen tiempos de retención más cortos que los solutos menos polares; así, en la separación de mezclas complejas de flavonoides, los glicósidos eluirán primero, seguido por las agliconas generalmente en orden de polaridad decreciente. Los sistemas más usados son mezclas de CH₃CN:H₂O ó MeOH:H₂O conteniendo pequeñas cantidades de HOAc. Algunas columnas RP usuales son Lichrosorb RP-18 ó RP-8, μ -Bondapak C₁₈, Zorbax C₈.

La primera aplicación del HPLC al análisis de flavonoides fue publicada por Ward y Pelter en 1974³⁸. Posteriormente Wulf y Nagel³⁹ estudiaron los efectos de la estructura y de los solventes en los tiempos de retención en una docena de flavonoides. Otras interesantes pu-

blicaciones son las de Kingston⁴⁰ sobre la aplicación de HPLC a flavonoides y otros metabolitos secundarios; Castele y Van Sumere⁴¹ en la determinación de tiempos de retención de 141 flavonoides desde agliconas hasta triglicósidos; Daigle y Conkerton^{42,43} que trata de la aplicación a 34 flavonoides y hace una revisión de los análisis realizados al año 1983 con más de cien citas bibliográficas, y Rouseff y Ting⁴⁴ sobre la cuantificación de flavonas metoxiladas en jugo de naranja. Aplicaciones de HPLC han sido hechas también para el análisis de flavonoides en frutos cítricos, hojas de tabaco, manzanilla, soya, tomates y otros.

Un rango amplio de combinaciones empaque/solvente han sido reportados en la literatura de flavonoides, y una revisión de éstos han sido publicadas por Kingston⁴⁰, y por Daigle y Conkerton⁴³; Fondi y col. han estudiado el comportamiento por HPLC de 16 flavonoides en diferentes sistemas de solvente⁴⁵, así como el comportamiento comparativo de 18 flavonoides por HPLC y HPTLC (CCD de alta performance), ambos en fase reversa⁴⁶.

Para la separación de agliconas no polares o débilmente polares se usa comúnmente columna de silicagel (fase normal: Lichrosorb Si60, μ -Porosil-, etc.) y sistemas de elución como hept:isopropanol (60:40) y tol:EtOAc en diferentes proporciones; los glicósidos han sido separados por elución con bz:CH₃CN (85:40).

Todas las técnicas cromatográficas que hemos mencionado emplean una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida; como consecuencia ocurren a menudo adsorciones irreversibles o descomposiciones del soluto en la interfase líquido-sólido. Para evitar estas complicaciones del uso de soporte sólido, se han desarrollado varios soportes líquidos, que actúan por un mecanismo de partición dando lugar a las técnicas de cromatografía contracorriente CCC, como por ejemplo la DCCC (a la gota), RLCC (rotación locular), CCCC (centrífuga) entre ellas la HSCCC (alta velocidad). Estas técnicas han sido ampliamente utilizados para todo tipo de compuestos, polares y no polares, la diferencia en su aplicación está en la elección de sistema de solventes⁴⁷. En el caso de los flavonoides se han empleado sistemas como: CHCl₃: MeOH:H₂O (7:13:8), CHCl₃:MeOH:H₂O:n-PrOH (9:12:8:1), CHCl₃:MeOH:H₂O:n-buOH (10:10:6:1), n-buOH:AcOH:H₂O (4:1:5), entre otros.

2.2.4 Técnicas espectrométricas

El método más usual para un análisis preliminar de la estructura de un flavonoide es quizás la absorción UV-Vis; esta técnica es usada tanto para identificar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación. Este último puede además ser mejor definido por el uso de reactivos de desplazamiento los cuales, como su nombre lo indica, provocan el desplazamiento de las bandas de absorción.

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos 240-285 nm (Banda II, BII) y 300-550 nm (Banda I, BI). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas la banda I es de baja intensidad (más baja que la banda II). En la Tabla 2 se dan los rangos de los valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides y en la figura 6 se observan los espectros UV-Vis característicos¹¹.

Tabla 2.- Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides

<i>Banda II, nm</i>	<i>Banda I, nm</i>	<i>Tipo de flavonoide</i>
250-280	310-350	flavonas
250-280	330-360	flavonoles (3-OH substituido)
250-280	350-385	flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330h	isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330h	isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	auronas
270-280	465-560	antocianidinas, antocianinas

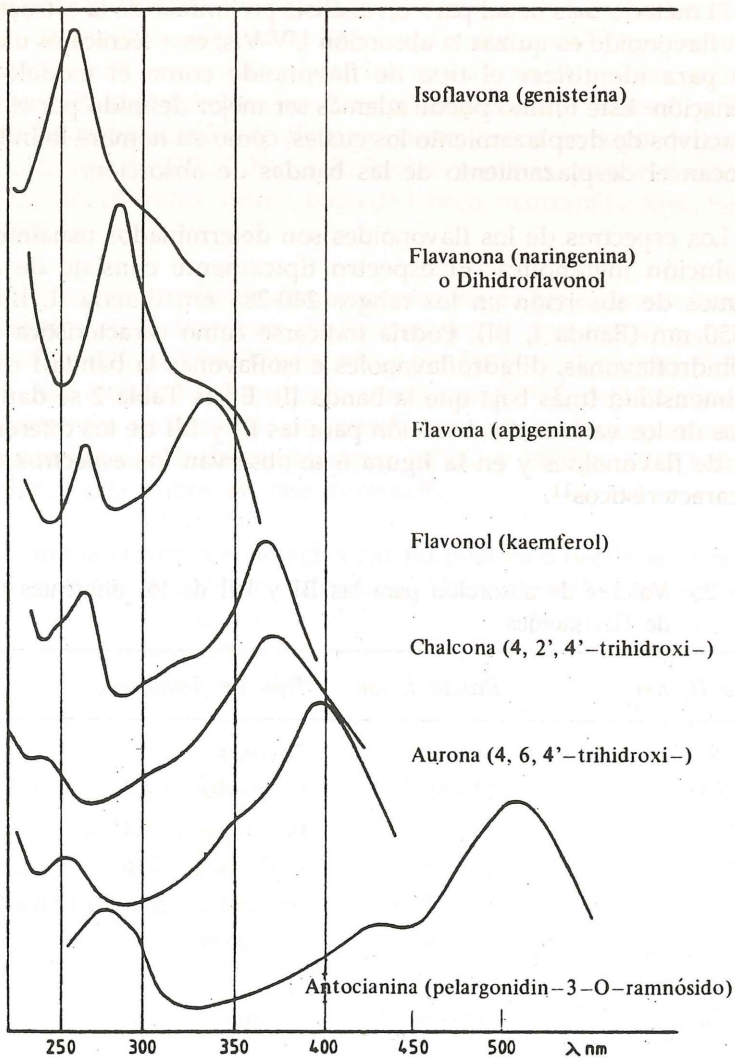


Fig. 6.- Espectros de absorción UV-Vis de diferentes tipos de flavonoides con modelos de hidroxilación equivalentes¹¹

La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos: a) los cambios en la sustitución del anillo A tienden a ser reflejados en la banda II de absorción, mientras que alteraciones en las sustituciones de los anillos B y C tienden a ser más aparentes en la banda I; b) la oxigenación adicional (especialmente hidroxilación), causa generalmente un desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente; c) la metilación o glicosilación, especialmente de 3, 5, 7 y 4'-OH, causa desplazamiento hipsocrómico de las bandas, no siendo dependientes de la naturaleza del azúcar en el caso de los glicósidos; d) la acetilación tiende a nulificar el efecto del grupo hidroxilo fenólico en el espectro; e) en flavonas y flavonoles, la presencia de o-hidroxilo en 3' y 4'-generalmente se evidencia por un segundo pico (algunas veces un hombro) en la banda II.

La influencia de la sustitución por grupos hidroxilos en los anillos A y B puede observarse en los siguientes ejemplos, en los que se indican los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ en nm de la banda I y banda II respectivamente: 3-hidroxiavona (344, 239); 3,5,7-trihidroxiavona (360, 267,5); 3,3',4'-trihidroxiavona (368, 250) y 3,5,7,4'-tetrahidroxiavona (367,5, 266).

El uso de los reactivos de desplazamiento, como ya lo indicamos, proporciona información adicional, útil en la determinación de la estructura de un flavonoide, así:

- el acetato de sodio, causa significativa ionización de únicamente el grupo hidroxilo más ácido del flavonoide y es usado básicamente para detectar la presencia de un grupo 7-hidroxilo libre;
- el metóxido de sodio, causa ionización de todos los grupos hidroxilos, la degradación del espectro con el tiempo es un buen indicador de la presencia de grupos sensibles a álcalis;
- el cloruro de aluminio, forma complejos con grupos o-hidroxilo y con grupos hidroxil-cetona vecinos; en el primer caso el complejo formado es lábil ante la presencia de ácido de tal modo que éste desaparece con el agregado de HCl, no así en el segundo caso en que el complejo formado es estable; y
- el ácido bórico-acetato de sodio, forma también complejos con los grupos o-dihidroxilo y es usado para detectar su presencia.

La acción de estos reactivos de desplazamiento se esquematiza en la figura 7.

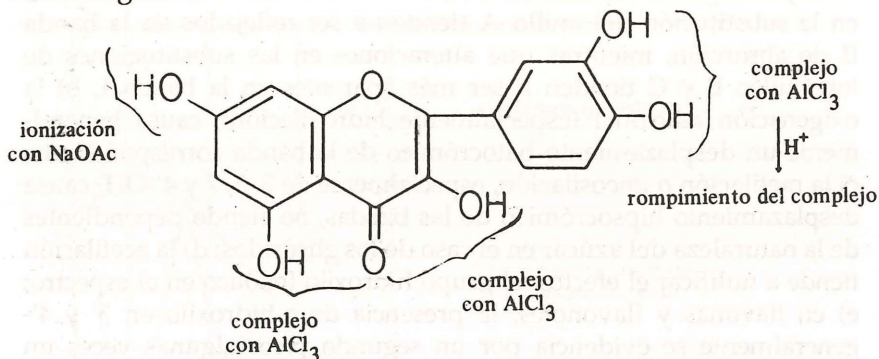


Fig. 7.- Acción de los reactivos de desplazamiento en un flavonoide

Para la preparación y utilización de estas reacciones de desplazamiento, ver el Apéndice.

Un gran número de espectros ultravioleta han sido publicados para la mayoría de los flavonoides por Mabry⁴, Harborne⁶, Jurd⁴⁸, flavonas y flavonoles por Jay⁴⁹, auronas por Geissman y Harborne⁵⁰, chalconas por Jurd⁵⁷ e isoflavonas por Horowitz⁵².

Muy poca es la aplicación de la técnica IR en el análisis de flavonoides debido a que los espectros UV son más informativos y requieren mucho menos material, sin embargo, algunas absorciones (cm⁻¹) características pueden ser útiles como la absorción C=O entre 1680 y 1640, aromáticos entre 1600 y 1500 y la de -OH quelatado (o-hidroxicetona) a 3500-3200.

Las primeras mediciones de RMN-¹H en flavonoides fueron limitadas a aquellos menos polares, solubles en CDCl₃, luego utilizando CCl₄ previa reacción para formar el derivado éter trimetilsililado y últimamente las agliconas y los glicósidos son corridos en DMSO-d₆. Un gran número de espectros en los primeros solventes es publicado por Mabry⁴.

Los espectros corridos como éteres trimetilsililados en CCl₄ tienen la ventaja sobre los tomados en DMSO-d₆, en que el solvente tiene

bajo punto de ebullición y puede ser removido fácilmente, se evita asimismo la intensa señal entre 2,0 y 4,0 ppm producido por el DMSO no deuterado o parcialmente deuterado así como la señal del H₂O que fácilmente absorben; los éteres formados pueden además ser fácilmente hidrolizados con metanol-agua.

En la Tabla 3 se señala los desplazamientos químicos aproximados de varios tipos de H en agliconas y glicósidos flavonoides.

Tabla 3.-Desplazamientos químicos aproximados de varios tipos de protones⁴

<i>Desplazamiento, ppm</i>	<i>Tipo de protón</i>
ca. 1,0	C- <u>CH₃</u> de ramnosa (duplete ancho)
ca. 1,7	metilos de sustituyentes prenilos (-CH ₂ -CH=C (<u>CH₃</u>) ₂) (los otros protones a 3,5 y 5,2 ppm)
ca. 2,0	acetato (-OCOC <u>H₃</u>) y aromático =C- <u>CH₃</u>
2,0-3,0	H-3 de flavanonas (multiplete, 2 protones)
3,7-4,1	metoxilos
3,5-4,0	C- <u>H</u> de muchos azúcares
4,2-6,0	H-1 de azúcares (también H-2 dihidroflavono- les a 5,0 ppm y H-2 de flavanonas a 5,0- 5,5 ppm)
6,0	metilendioxi, O- <u>CH₂</u> -O (singulete)
6,0-8,0	protones de anillo <u>A</u> y <u>B</u>
7,5-8,0	H-2 de isoflavonas (singulete)
9,5-12,5	OH (en derivados no sililados)

Es también usual utilizar reactivos de desplazamientos para la elucidación estructural de flavonoides; Joseph-Nathan y colaboradores utilizaron Pr(fod)₃ para el caso de flavonas y flavonas metoxiladas^{53,54} (fod=6,6,7,7,8,8,8-heptafluoruro-2,2-dimetil-3,5-octadionato).

En los últimos años, los espectros de RMN-¹³C de flavonoides han sido muy usuales y de gran ayuda en las determinaciones estructurales^{10,55-62}, la información obtenida con esta técnica es complementaria a las obtenidas con el ¹H.

En la Tabla 4 se da los rangos de desplazamientos químicos para varios tipos de carbonos en los flavonoides¹¹. Algunos ejemplos se ilustran en la figura 8.

Tabla 4.- Desplazamientos químicos aproximados de varios tipos de carbono¹¹

Tipo de carbono	Desplazamiento, δ ppm
carbonilo (4-ceto, acilo)	210-170
aromáticos y olefinas	
(a) oxigenados	165-155 (no o/p oxigenación) 150-130 (con o/p oxigenación)
(b) no oxigenados	135-125 (no o/p oxigenación) 125-90 (con o/p oxigenación)
alifáticos	
(a) oxigenados (azúcares)	83-69 (C-1 de O-glicósidos)
(b) no oxigenados (C-2, C-3 de flavanona)	80-40
metilendioxi	ca. 100
OCH ₃	55-63
C-CH ₃ ,	17-20
isopropenilos (CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂)	21(<u>CH</u> ₂), 122(<u>CH</u>), 131(<u>C</u>), 18(<u>CH</u> ₃)

En la espectrometría de masas, una gran ventaja es la cantidad muy pequeña de muestra requerida para el análisis. Al aplicar este método, debemos recordar los pesos moleculares para los diferentes núcleos básicos, como son: 222 para flavonas, isoflavonas y auronas; 224 para flavanonas y chalconas; 238 para flavonoles; 240 para dihidroflavonoles; el incremento de 16 unidades de masa por cada grupo hidroxilo, y de 30 por cada metoxilo^{7,11}, entre otros.

Asimismo algunos fragmentos característicos son: M⁺ del pico molecular; M⁺-1 originado por pérdida de un hidrógeno; M⁺-15 por pérdida de metilo del grupo metoxilo, la intensidad de la señal es también indicativa de la posición del grupo metoxilo, siendo más intensa si éstos están en C-6 ó C-8 que en otros átomos; M⁺-31 por pérdida de grupos metoxilo; M⁺-18 por pérdida de agua; M⁺-28 ó M⁺-29 por pérdida de grupo CO o CHO del C-4 para formar un anillo

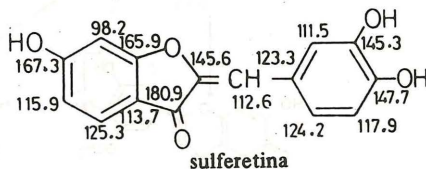
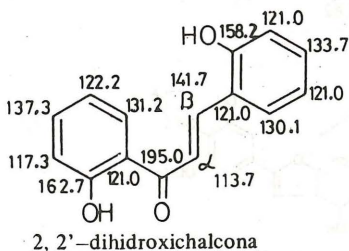
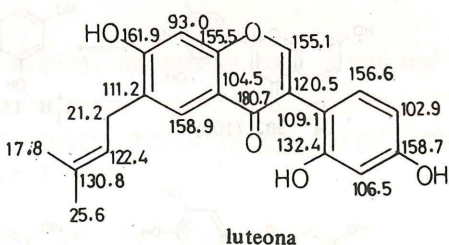
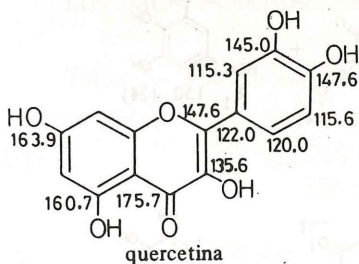
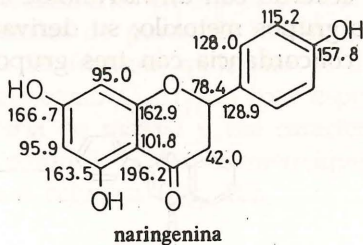
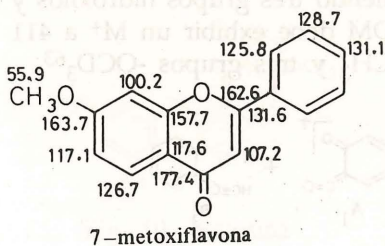
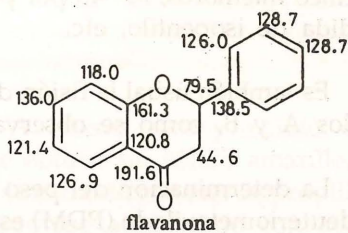
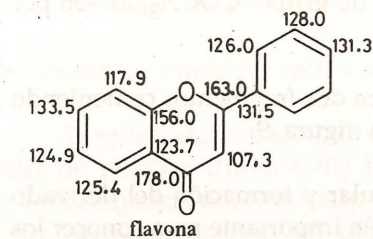


Fig. 8.- Valores de RMN-¹³C para algunos flavonoides

de cinco miembros; M^+ -43 por pérdida de grupo $-\text{COCH}_3$, M^+ -56 por pérdida de isopentilo, etc.

Es también usual la fisión de M^+ en dos fragmentos conteniendo anillos A y B, como se observa en la figura 9.

La determinación del peso molecular y formación del derivado perdeuteriometoxilado (PDM) es también importante para conocer los grupos presentes, por ejemplo: un flavonoide cuyo M^+ es 360 está de acuerdo con un flavonoide conteniendo tres grupos hidroxilos y tres grupos metoxilo; su derivado PDM debe exhibir un M^+ a 411 en concordancia con tres grupos $-\text{OCH}_3$ y tres grupos $-\text{OCD}_3$ ⁶³.

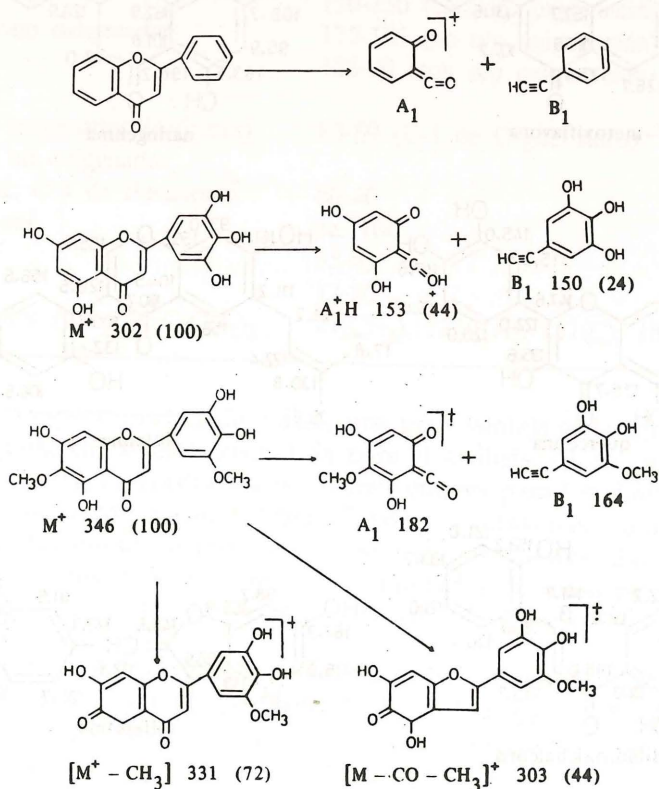


Fig. 9.- Algunas fragmentaciones características de los flavonoides

2.3. Ejemplos de aplicación

- Estudio químico del cactus *Ariocarpus retusus*²²

Después de extraer 7,75 Kg de *A. retusus*, seco y molido, con éter de petróleo durante 100 horas se obtuvo un sólido amarillo, el que fue saponificado y el insaponificable extraído con éter isopropílico; este extracto produjo un residuo que fue acidificado con ácido clorhídrico precipitando un sólido amarillo, el que después de varias

recristalizaciones en etanol dio 3,2 g de cristales de punto de fusión 160-161°C. Su fórmula molecular se determinó como C₁₉H₁₇O₇ (por espectrometría de masas) y fue caracterizado como 3,7,3',4'-tetrametoxiquercetina o retusina (Fig. 10).

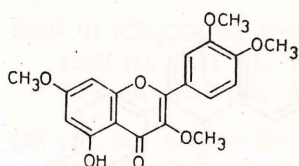


Fig. 10.- Retusina

Los datos espectroscópicos se indican en la Tabla 5.

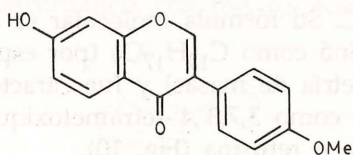
Tabla 5.- Valores espectroscópicos encontrados para la retusina²²

UV	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ nm 213 (ϵ 26475), 255 (ϵ 18783), 270 (ϵ 15831), 356 (ϵ 17173)
IR	$\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹ 3000 (OH), 2900 (CH), 1670 (CO)
RMN-1H	δ ppm 8,30 (2H); 7,00 a 6,80 (1H, m); 6,50-6,20 (2H, m); 3,95, 3,90, 3,87 (12H, s); 12,61 (1H,s)
EM	M ⁺ 358, M ⁺ -Me 343, M ⁺ -OMe 327, M ⁺ -43 315, otros picos importantes fueron a 175, 167, 166, 138, 85, 79, 69.

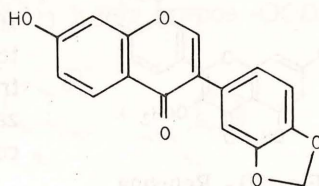
La acetilación de la retusina produjo cristales amarillo analizados para C₂₁H₂₀O₇, de punto de fusión 165-166°C y que dieron negativo a la reacción con cloruro férrico.

• *Flavonoides de Andira inermis* Wright⁶⁴

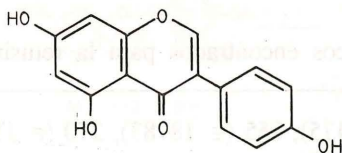
1,750 Kg de corteza seca y molida fue macerada en 4 L de metanol durante 30 días. El extracto fue concentrado a sequedad (13,9 g) y disuelto en 160 mL MeOH:H₂O (2:3). Esta solución acuosa-metanólica se sometió a una extracción exhaustiva con CHCl₃ obteniéndose después de concentrar el extracto clorofórmico 1,6 g (E1). E1 fue cromatografiado por CCDP en bz:acetona (2:1), separándose entre otros, formometina y pseudobaptigenina (9,0 mg), genisteína (28,0 mg), 3'-metoxidaidzeína (4,0 mg), y daidzeína (3,0 mg).



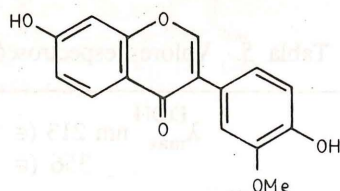
formononetina



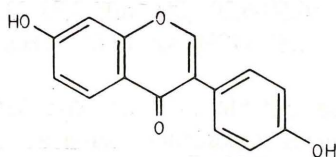
pseudobaptigenina



genisteína



3'-metoxidaidzeína



daidzeína

Los flavonoides aislados fueron caracterizados en base a sus datos espectroscópicos, algunos de los cuales se reportan en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores espectroscópicos encontrados para la genisteína, 3'-metoxidaidzeína y daidzeína

Genisteína

UV λ_{\max} , nm (Fig. 11)

MeOH 260, 328h, NaOMe 275, 324h (no desc), AlCl₃ 271, 304h, 371, AlCl₃/HCl 271, 304h, 371, NaOAc 271, 327 (no desc), NaOAc/H₃BO₃ 259, 332

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ 3343, 1649, 1616, 1516, 1459, 1360, 1252, 1172 (Fig. 12)

RMN-¹H (CD₃COCD₃, δ ppm) (Fig. 13)

12,97 (s), 8,11 (s), 7,47 (d, J=9,0 Hz), 6,95 (d, J=9,0 Hz), 6,39 (d, J=2,0 Hz), 6,29 (d, J=2,0 Hz)

EM m/z, (int. relativa) (Fig. 14)

M⁺ 270 (67,1), 153 (33,2), 124 (2,2), 118 (22,4), 83 (18,0), 69 (32,0), 55 (28,7), 44 (100,0), 29 (55,8)

3'-Metoxidaidzeína

UV λ_{\max} , nm

MeOH 249, 256h, 284; NaOMe 257, 326 (no desc), AlCl₃ 249, 284; AlCl₃/HCl 249, 284; NaOAc 257, 328 (no desc); NaOAc/H₃BO₃ 249, 258h, 284

RMN-¹H (DMSO-d₆, δ ppm)

8,15 (s), 8,06 (d, J=8,7 Hz), 8,0 (s), 7,37 (s), 7,24 (d, J=9,0 Hz), 7,17 (s.a.), 7,07 (dd, J=9,0 Hz), 6,94-7,02 (m), 6,91 (s), 3,88 (s).

EM m/z (int. relativa)

M⁺ 284 (16,0), 269 (4,4), 241 (2,9), 148 (3,4), 137 (8,9), 139 (4,7), 108 (2,4), 105 (7,0), 97 (21,7), 83 (36,3), 69 (47,5), 57 (66,9), 43 (100), 29 (75,3)

Daidzeína

UV λ_{\max} , nm (Fig. 15)

MeOH 236h, 250, 258h, 298; NaOMe 258, 322 (no desc); AlCl₃ 238h, 250, 260h, 300, 345; AlCl₃/HCl no hay cambio; NaOAc 254, 325 (no desc), NaOAc/H₃BO₃ 249, 302

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹

3400, 1630, 1593, 1513, 1460, 1385, 1245, 1197

RMN-¹H (acetona-d₆, δ ppm) (Fig. 16)

9,54 (s.a.), 8,37 (s.a.), 8,12 (s), 8,07 (s), 7,53 (d, J=9,0 Hz), 7,15 (d, J=2,0 Hz), 7,03 (s.a.), 6,93 (d, J=2,0 Hz)

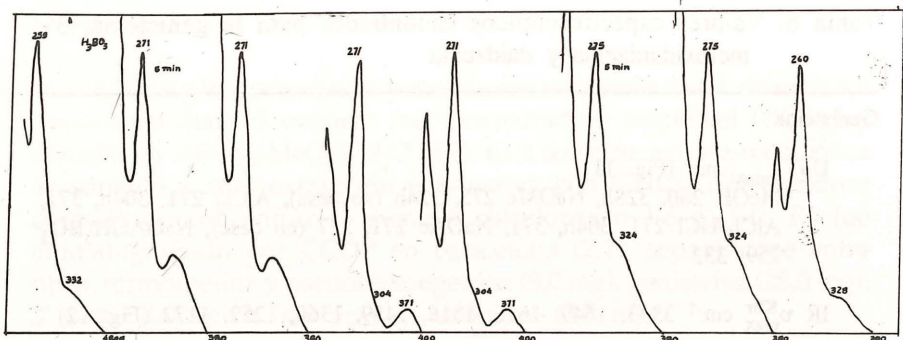


Fig. 11.- Espectros UV de la genisteína con reactivos de desplazamiento

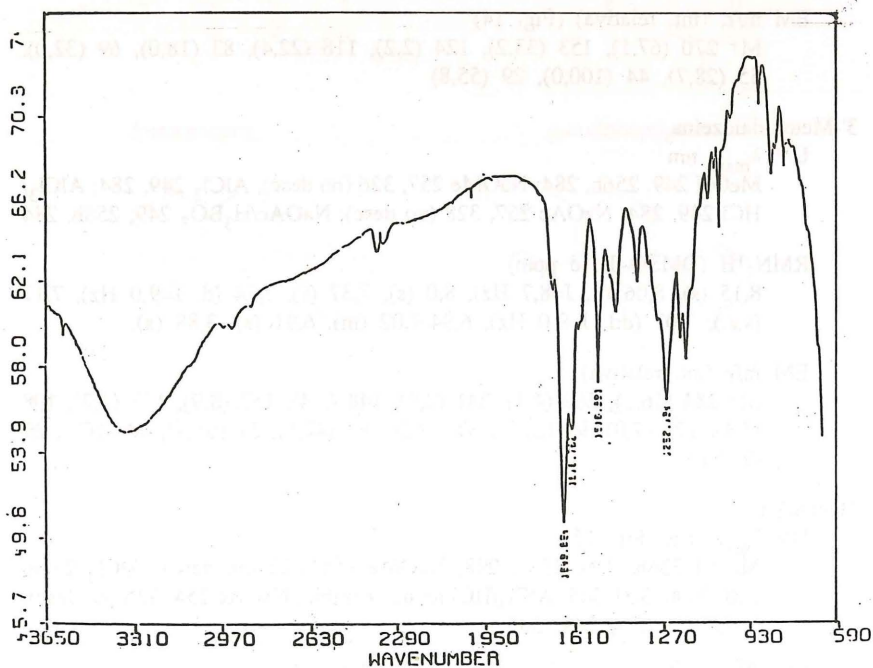


Fig. 12.- Espectro IR de la genisteína

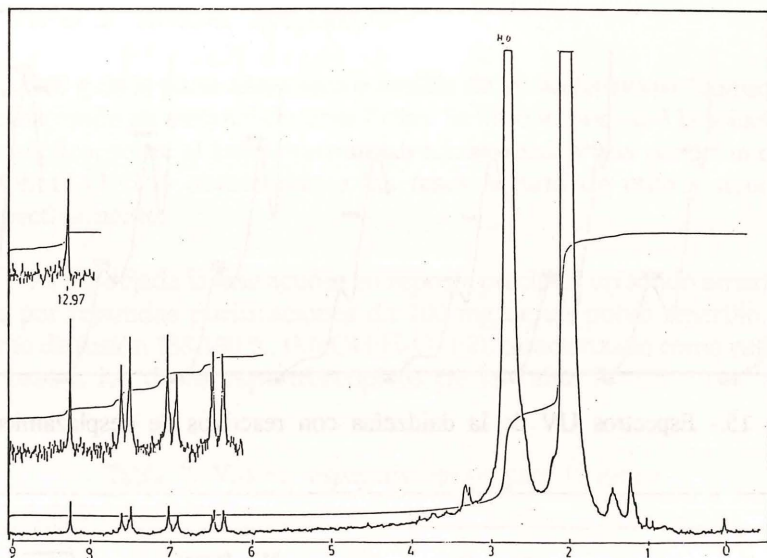


Fig. 13.- Espectro RMN-¹H de la genisteína

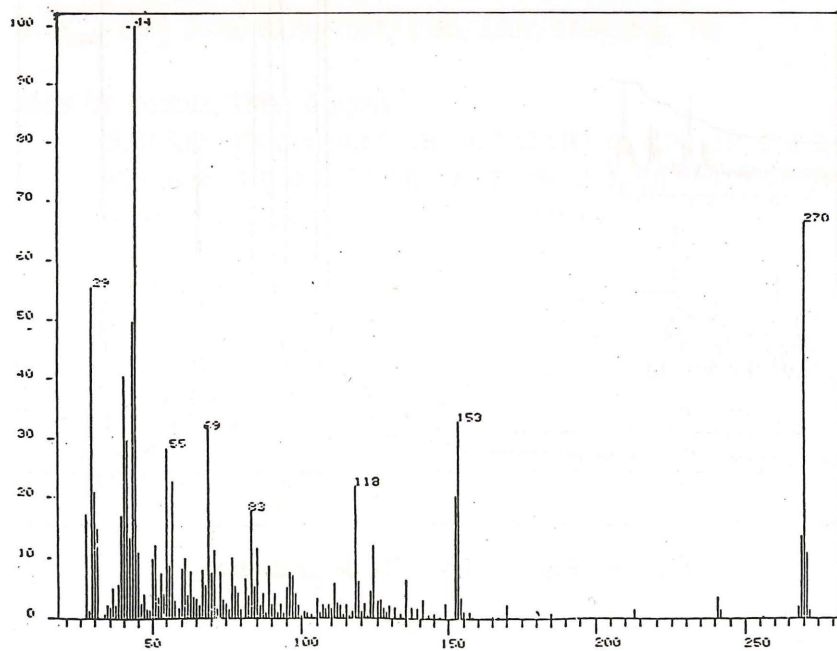


Fig. 14.- Espectro de masas de la genisteína

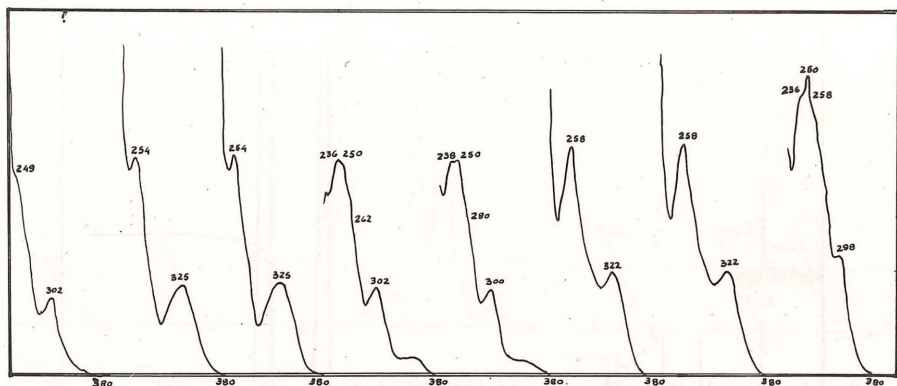


Fig. 15.- Espectros UV de la daidzeína con reactivos de desplazamiento

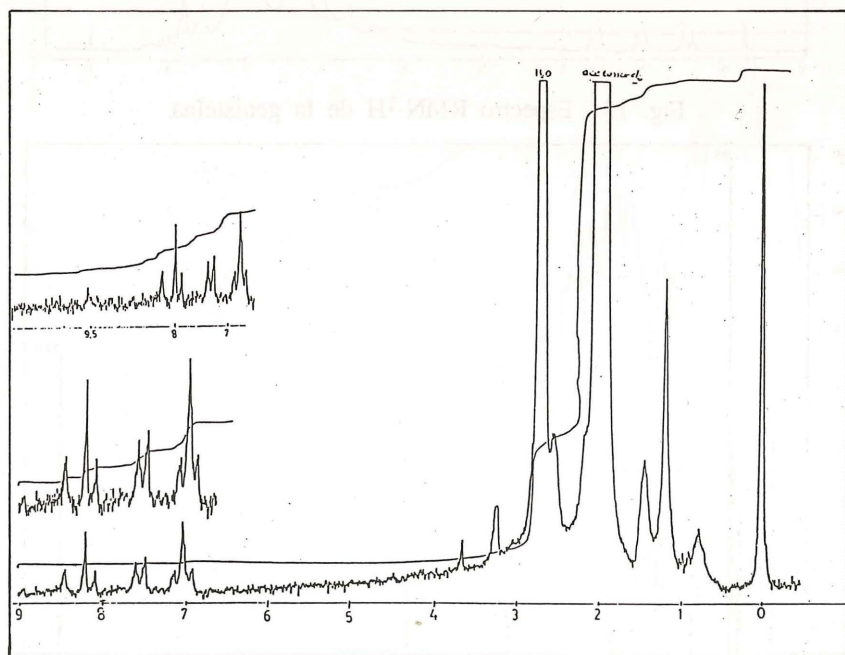


Fig. 16.- Espectro RMN-¹H de la daidzeína

• *Rutina de Werneria dactylophylla*⁶⁵

100 g de la parte aérea seca y molida de *W. dactylophylla* "conuca", fue macerado en metanol durante 7 días. Se filtró y concentró la solución metanólica; sobre el extracto concentrado se realizó una partición con AcOEt:H₂O (1:1) obteniéndose las fases acetato de etilo y acuosa respectivamente.

Al ser dejada la fase acuosa en reposo, precipitó un sólido amarillo que por repetidas purificaciones da 100 mg de un polvo amarillo de punto de fusión 188-190 °C (MeOH:H₂O, 1:2), caracterizado como rutina en base a los datos espectroscópicos de la Tabla 7.

Tabla 7. Valores espectroscópicos para la rutina

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$, nm 258, 266h, 298h, 359 nm (Fig. 17)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3416, 2939, 1651, 1596, 1501, 1454 (Fig. 18)

RMN-¹H (MeOD, TMS, δ ppm)

3,20-3,85 (10H, m), 4,55 (1H, s), 5,12 (1H, d), 6,20 (1H, d, J=2,0 Hz), 6,38 (1H, d, J=2,0 Hz), 6,87 (1H, d, J=8,0 Hz), 7,63 (1H, d, J=2,0 y 8,0 Hz), 7,67 (1H, d, J=2,0 Hz)

RMN-¹³C (MeOD, TMS, δ ppm), señales para 27 carbonos (Fig. 19)

17,89, 68,51, 69,67, 71,32, 72,04, 72,18, 73,89, 75,68, 77,11, 78,11, 94,85, 99,92, 102,36, 104,72, 105,53, 116,00, 117,67, 123,03, 123,54, 135,59, 145,75, 149,75, 158,39, 159,27, 162,84, 165,96, 179,29.

EM del compuesto hidrolizado, m/z (intensidad relativa) (Fig. 20)

M⁺ 302 (100), 273 (6,85), 137 (15,42), 81 (5,71), 69 (17,14), 44 (17,14), 29 (11,42).

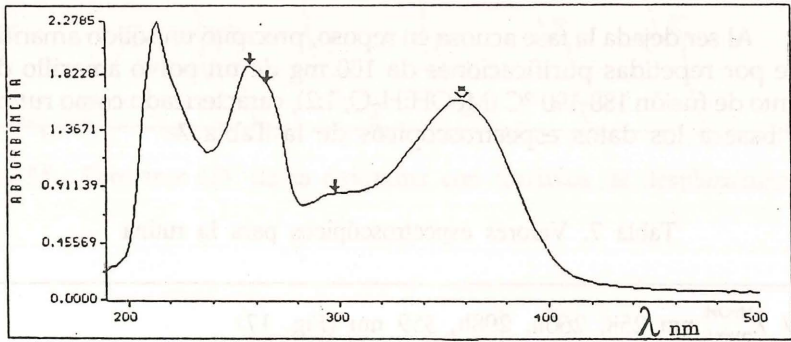


Fig. 17.- Espectro UV de la rutina

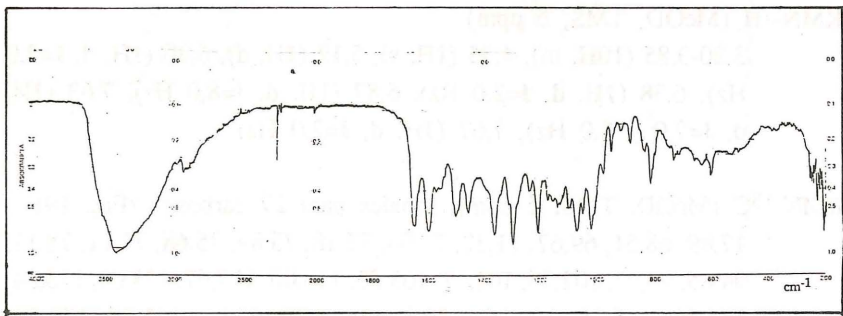


Fig. 18.- Espectro IR de la rutina

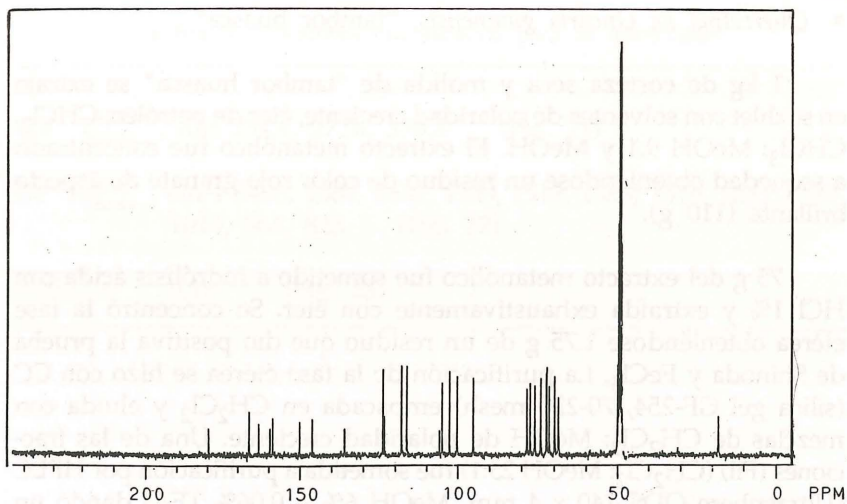


Fig. 19.- Espectro RMN-¹³C de la rutina

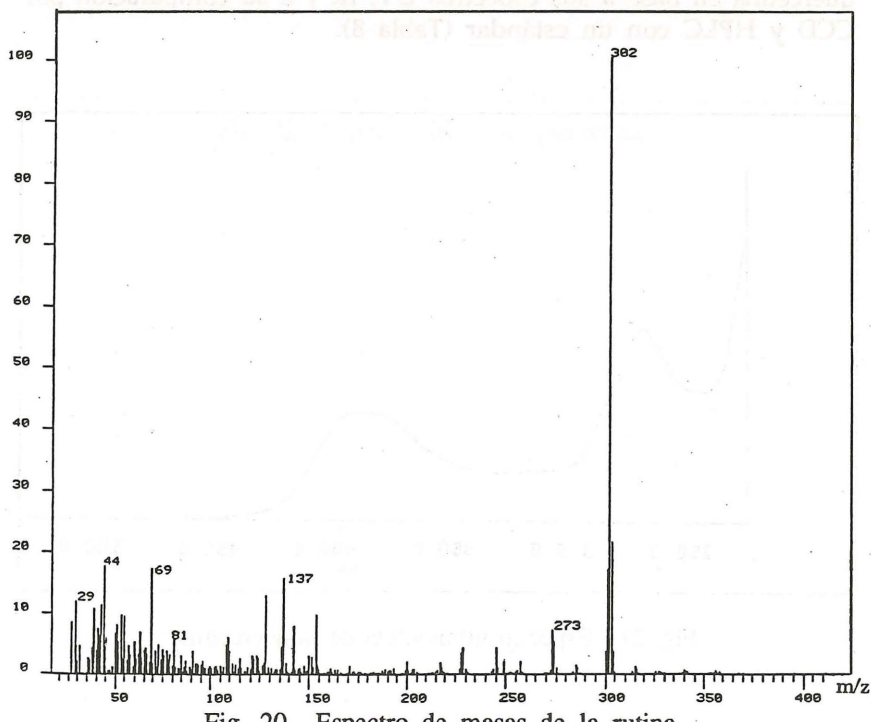


Fig. 20.- Espectro de masas de la rutina

• *Quercetina de Uncaria guianensis, "tambor huasca"*

1 kg de corteza seca y molida de "tambor huasca" se extrajo en soxhlet con solventes de polaridad creciente, éter de petróleo, CHCl_3 , CHCl_3 : MeOH 9:1 y MeOH. El extracto metanólico fue concentrado a sequedad obteniéndose un residuo de color rojo granate de aspecto brillante (110 g).

75 g del extracto metanólico fue sometido a hidrólisis ácida con HCl 1% y extraída exhaustivamente con éter. Se concentró la fase etérea obteniéndose 1.75 g de un residuo que dio positiva la prueba de Shinoda y FeCl_3 . La purificación de la fase etérea se hizo con CC (sílica gel GF-254, 70-230 mesh) empacada en CH_2Cl_2 y eluída con mezclas de CH_2Cl_2 : MeOH de polaridad creciente. Una de las fracciones (FII) (CH_2Cl_2 : MeOH 25:1) fue sometida a purificación por HPLC (Ultrasphere ODS 140 x 4 mm, MeOH 6% + 0.06% TFA) dando un polvo de color amarillo (30,9 mg) de pf 290 °C, determinándose como quercetina en base a sus espectros UV, IR y a su comparación por CCD y HPLC con un estándar (Tabla 8).

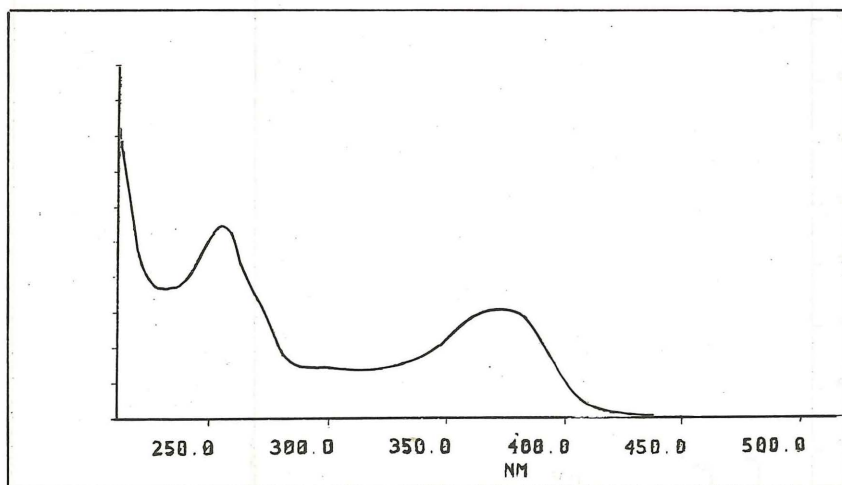


Fig. 21.- Espectro ultravioleta de la quercetina

Tabla 8.- Valores encontrados para la quercetina

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$, nm 254,4, 271h, 370,8 (Fig. 21)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$, cm-1 3408, 1664, 1612, 1559, 1519, 1383, 1319, 1261, 1169, 1014, 864, 823 (Fig. 22)

HPLC tr 5,18 (Fig. 23)

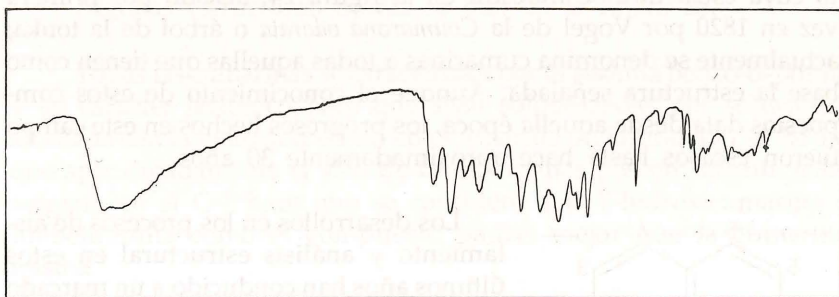


Fig. 22.- Espectro IR de la quercetina

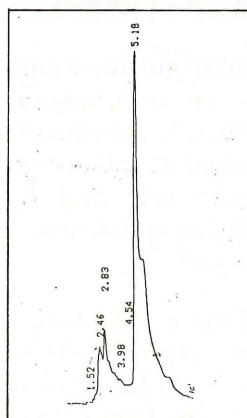
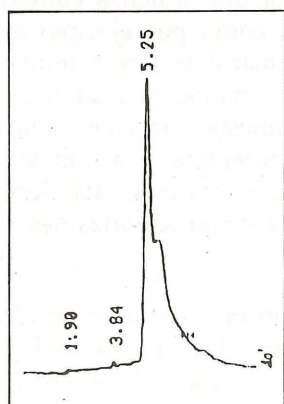


Fig. 23.- Cromatograma HPLC de

a) quercetina estandar

b) fracción F11

3. CUMARINAS

3.1. Generalidades

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbeliferae y Rutaceae; se encuentran en todas las partes de la planta, desde la raíz a flores y frutos siendo más abundante en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos.

El nombre de cumarina fue asignado originalmente al compuesto cuya estructura se muestra en la figura 24, aislado por primera vez en 1820 por Vogel de la *Coumarona odorata* o árbol de la tonka; actualmente se denomina cumarinas a todas aquellas que tienen como base la estructura señalada. Aunque el conocimiento de estos compuestos data desde aquella época, los progresos hechos en este campo fueron escasos hasta hace aproximadamente 30 años.

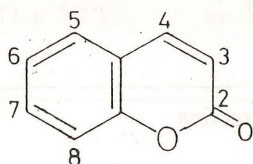


Fig. 24.- Cumarina

Los desarrollos en los procesos de aislamiento y análisis estructural en estos últimos años han conducido a un marcado incremento en el número de cumarinas aisladas de plantas; ésto, unido al interés despertado por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han mostrado, como por ejemplo la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la actividad estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina, la acción insecticida de los surangin A y B, entre otros; cabe destacar también las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y en perfumería⁶⁷⁻⁷⁰.

Hasta el año 1982 se había reportado el aislamiento e identificación de aproximadamente 800 cumarinas (23 en el período de 1812 a 1898, 66 en los siguientes 50 años, 101 en el año 1959, 162 en el período 1960-1969 y 450 entre 1970-1982), de las cuales el 33% han sido aisladas de Rutaceae y 36% de Umbeliferae⁶⁹. Al año 1990 se reporta como en 1000 el número de cumarinas conocidas².

Las cumarinas de las cuales sólo el 5% aproximadamente carece de oxígeno en la posición -7-, pueden clasificarse como:

- simples, como la estructura de la figura 24 o sus derivados hidroxilados, alcoxilados y alquilados, y sus glicósidos;
- furanocumarinas, lineales o angulares;
- piranocumarinas, análogas a las anteriores con un anillo de pirano, pueden ser también lineales o angulares;
- cumarinas preniladas, y
- cumarinas substituidas en el anillo de pirona.

Algunas estructuras típicas se dan en la figura 25.

Todas las cumarinas se caracterizan por el sistema benzo- α -pirona y su carácter lactónico hace que sean solubilizadas por soluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo en la solución; el hecho que aproximadamente el 95% de las cumarinas poseen substituyente oxígeno en el C-7 hace que se considere a la 7-hidroxicumarina o umbeliferona como el compuesto padre, mejor que la cumarina misma.

Las cumarinas están biogénicamente relacionadas a los fenilpropanoides como flavonoides y ligninas así como a las sustancias derivadas del acetato, como esteroides y terpenoides, ya que su biosíntesis transcurre por ambas vías: vía shikimato y vía policétido del acetato. En la figura 26 se muestra la vía shikimato.

El paso inicial es una condensación del ácido fosfoenol pirúvico con fosfato-D-eritrosa para formar ácido 2-ceto-3-deoxi-D-arabohexanoico-7-fosfato, el cual se cicla a ácido 5-dehidrokinico. Este, por pérdida de una molécula de agua seguida de una reducción da lugar a los ácidos 5-dehidroshikimico y shikimico respectivamente. El ácido shikimico por medio de su 5-fosfato condensa con otra molécula de ácido fosfoenolpirúvico para formar después de algunas etapas el ácido prefénico, el que aromatiza para producir ácido fenilpirúvico (o su p-hidroxiderivado), y formar luego fenilalanina (o tirosina). La deaminación enzimática de la fenilalanina produce ácido cinámico, el cual sufre una o-hidroxilación seguida de una glicosidación. Este glicósido es el que finalmente se convierte en cumarina⁶⁷.

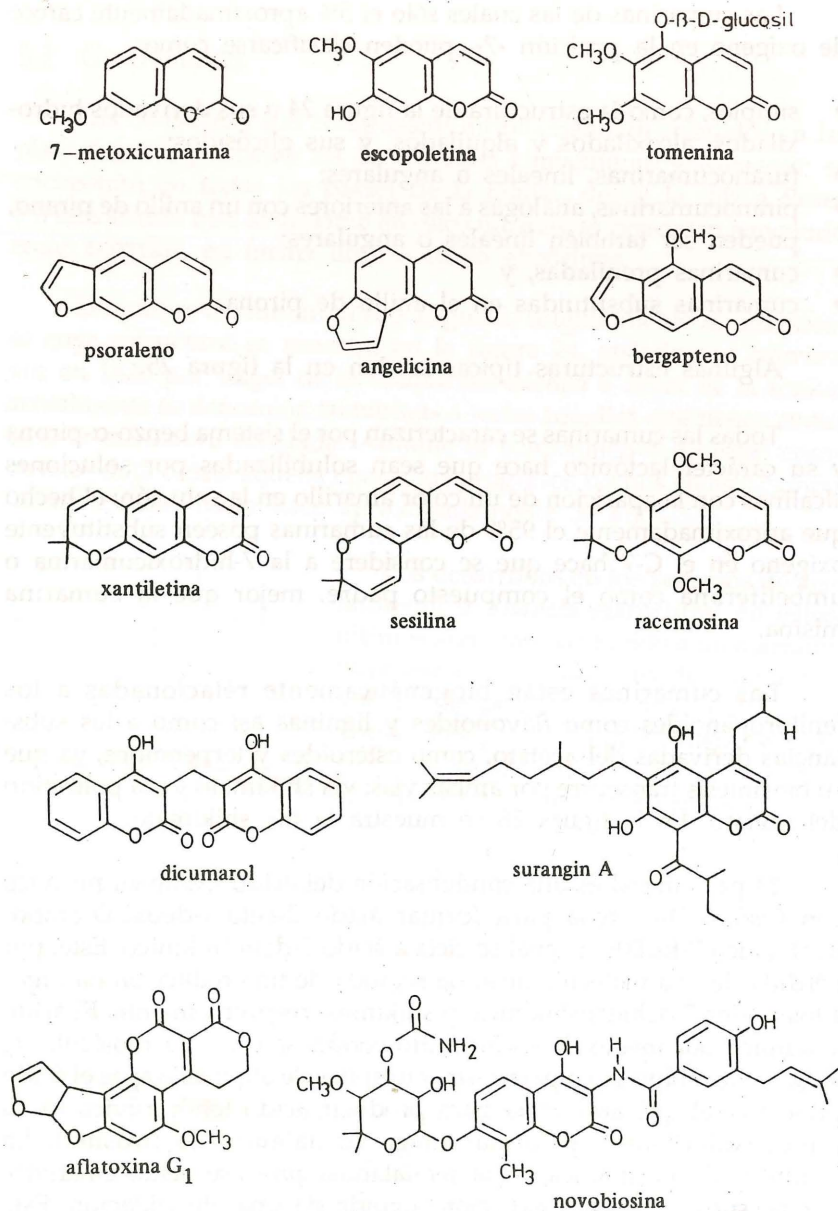
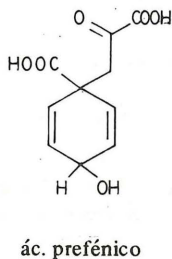
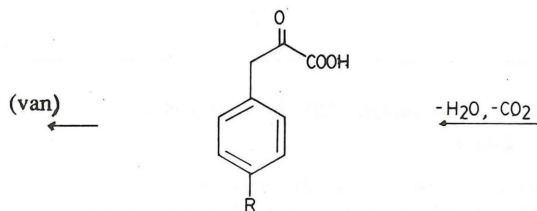
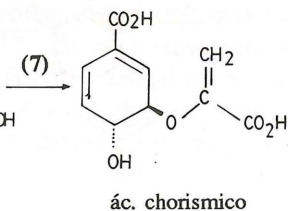
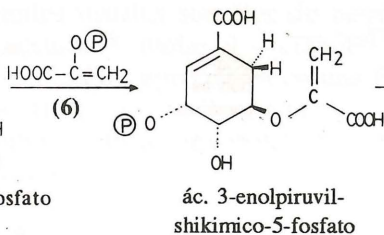
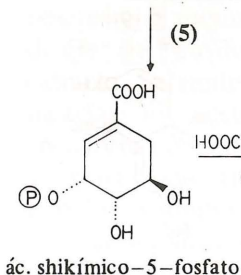
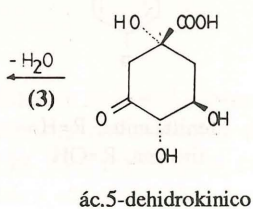
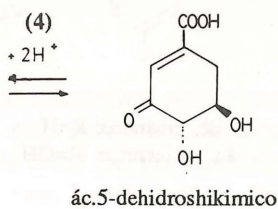
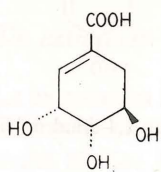
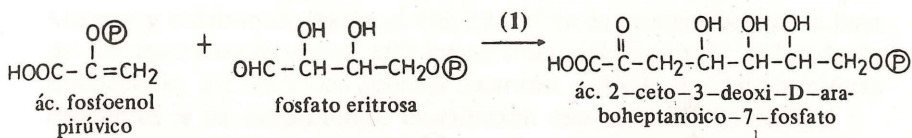


Fig. 25.- Algunas cumarinas



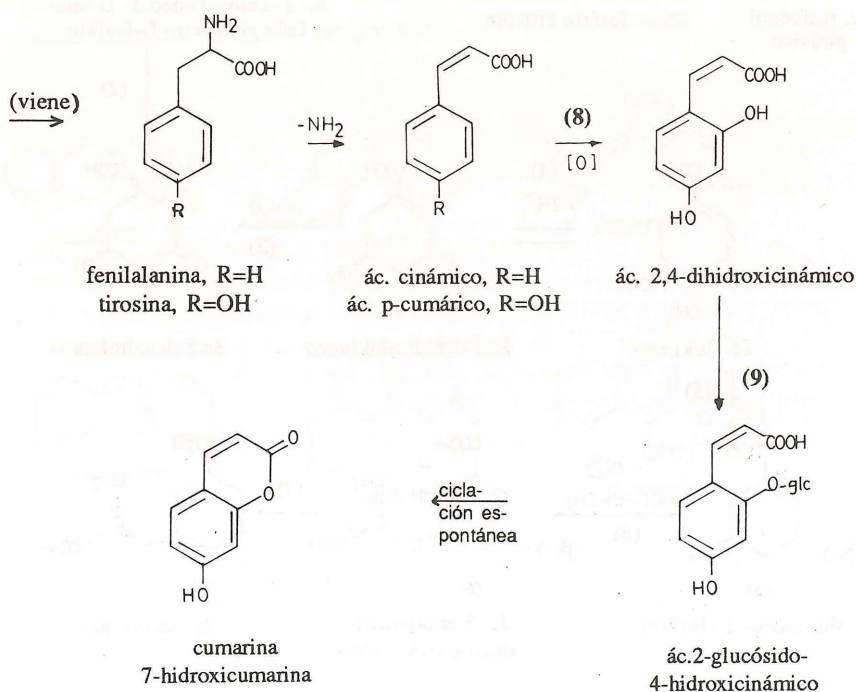


Fig. 26.- Biosíntesis de la cumarina, ruta del ácido shikímico
(-O-P = fosfato)

- (1) ác.3-deoxi-D-arabinoheptulósico-7-fosfato-sintasa (2) 5-dehidroquinato sintasa
(3) dehidroquinato deshidratasa (4) shikimato deshidrogenasa (5) shikimato kinasa
(6) 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato-sintasa (7) chorismato sintasa (8) cinamato-2-oxigenasa
(9) glucosidasa

La química de las cumarinas de ocurrencia natural ha sido periódicamente revisada^{67,69-76}. Entre ellas destacamos la publicada por Murray y colaboradores en el año 1982⁶⁹ en la que se incluye la lista de las aproximadamente 800 cumarinas aisladas a la fecha de la publicación, así como las fuentes (plantas) y 3383 citas bibliográficas referentes a su aislamiento, elucidación estructural y síntesis.

3.2. Técnicas recomendadas

3.2.1 De extracción

La extracción de las cumarinas puede realizarse sobre el material vegetal fresco o seco, con solventes de diferentes polaridades dependiendo de las estructuras de las cumarinas. Las cumarinas oxigenadas, por ejemplo, son ligeramente solubles en solventes poco polares y a menudo pueden cristalizar directamente de un extracto de éter de petróleo, ya sea por enfriamiento o por concentración del extracto. Solventes usuales son éter de petróleo y éter etílico o sus mezclas^{77,78}, acetona⁷⁹, metanol y etanol^{80,81}. Si una cumarina se encuentra en cantidades apreciables en una fuente natural es posible separarla por cristalización directamente del extracto; en caso de mezclas complejas es más conveniente usar técnicas cromatográficas para la separación.

3.2.2 De separación cromatográfica y de detección

La cromatografía de columna ha sido ampliamente usada, ya sea utilizando silicagel^{78-80,82,83} o alúmina neutra o ácida⁷⁹ como adsorbentes; la alúmina básica no es muy recomendable pues se ha observado que produce degradación de las cumarinas, aunque algunos trabajos reportan su utilización⁸⁴. Como sistemas de elución han sido utilizados mezclas variadas de solventes en diferentes proporciones como, hex:Et₂O, hex:EtOAc, EP:Et₂O, CHCl₃:EtOAc, bz:EtOAc, CHCl₃:Me₂CO, tol:Et₂O (1:1, saturado con HOAc 10%), tol:EtOAc:HOAc.

Son también bastante usadas las CCDP utilizando silicagel y en los sistemas de solventes nombrados u otros como CH₂Cl₂:Et₂O, hex:Me₂CO, tol:EtOAc, hex:CHCl₃:Et₂O.

La sensibilidad y fuerza de la resolución de la CCD puede ser mejorada utilizando placas cromatográficas preparadas con una mezcla de silicagel y celulosa (1:1, silicagel G y polvo de celulosa-MN), utilizando sistemas como TEF (tol:HCO₂Et:HCO₂H, 5: 4:1), o CAW (CHCl₃:HOAc:H₂O, 4:1:1) y detectando los componentes bajo la luz UV (254 nm) antes y después de aspersar con NaOH 2N⁸⁵.

En la CP^{86,87} es usual utilizar sistemas como BAW (n-buOH:HOAc:H₂O, 4:1:5, fase superior), tol:HOAc:H₂O (4:1:5), en este sistema se ha encontrado una correlación entre el número de -OH y el valor de R_f, a mayor número de -OH menor valor de R_f. Las cumarinas fenólicas tienden a dar manchas con cola, este problema puede resolverse aumentando la concentración de HOAc (por ejemplo del 2% al 10%), aunque hay que tener cuidado en el caso de las cumarinas lábiles a altas concentraciones de ácido.

Las cumarinas pueden ser desorbidas con cloroformo o acetona más fácilmente de una CP que de una CCDP, aunque en este último caso muchas veces la resolución es mejor (pero falla contra la pobre desorción).

Las furanocumarinas se separan mejor por cromatografía de partición que de desorción, utilizando silicagel impregnada con formamida y en éter dibutílico como fase móvil⁸⁸.

La técnica HPLC ha sido últimamente utilizada con éxito, ya que ofrece ventaja de separaciones más rápidas y efectivas; ha sido aplicada, entre otras, para la separación de una mezcla de furanocumarinas del perejil utilizando columnas C₁₈-μ-Porasil, así como fraccionar algunas cumarinas de cítricos^{89,90}, y para la purificación de dos cumarinas inestables usando Lichrosorb Si 60 por elución con una mezcla de bz:Me₂CO (8:2)⁹¹; buenos resultados se ha obtenido como método alternativo, sobre todo a escala preparativa, el usar columnas con fase enlazada a nitrilo y mezclas de hex:isopropanol en diferentes concentraciones para la elución⁹².

También está siendo utilizada la filtración en gel para la purificación de cumarinas fenólicas, principalmente utilizando columnas empacadas con Sephadex LH-20 y por elución con metanol o mezcla de solventes, por ejemplo de CHCl₃:n-buOH:H₂O (1:1:1).

La propiedad física más usual para reconocer una cumarina es la fluorescencia que ellas desarrollan a la luz UV (365 nm), la que es ampliamente utilizada para su detección en la cromatografía de papel y de cada capa delgada mejor aún en este último caso si la silicagel contiene un indicador fluorescente. Se puede asignar tentativamente ciertas características a las cumarinas por el color que ellas presentan⁶⁹:

- 7-alcoxicumarina generalmente presenta fluorescencia púrpura;
- 7-hidroxycumarina y 5,7-dioxigenadas, fluorescencia celeste; y
- furanocumarina, fluorescencia amarilla opaca u ocre;

la intensificación de la fluorescencia por tratamiento del cromatograma con vapores de amoníaco es indicativa de grupos fenólicos en la cumarina. Los colores dados por las furanocumarinas pueden ser intensificados por aspersión de las placas con una solución de KOH al 5% en MeOH o de $SbCl_3$ al 20% en $CHCl_3$ ^{1,93}. El efecto de la sustitución en la fluorescencia de las cumarinas, así como la intensidad de la misma en varias concentraciones de alcohol y su estabilidad en solución alcalina han sido reportadas por Wheelock⁹⁴.

La detección de las cumarinas puede hacerse también con otros agentes cromogénicos, desafortunadamente ninguno de estos reactivos son específicos para estos compuestos y su confirmación debe ser hecha por otros métodos; por otro lado, muchas veces la sensibilidad de las cumarinas a estos agentes no es paralela a la que presentan a la luz UV, por ejemplo: la 7-hidroxycumarina y la 7-hidroxi-6-metoxicumarina frecuentemente dan resultados cromogénicos negativos pero dan intensa fluorescencia azul al irradiarse con la luz UV.

Los agentes cromogénicos usuales para detectar grupos fenólicos son: solución acuosa al 1% de $FeCl_3$ con la que compuestos con grupos -OH libren dan colores azules o verdosos; el reactivo de Benedict para cumarinas y también flavonoides con grupos -OH reactivos, la aspersión de este reactivo a la CCD produce extinción parcial o total de la fluorescencia; el reactivo de Emerson que produce colores rojo naranja o rojo salmón luego de la aspersión sucesiva de soluciones de 4-aminoantipirina al 2% en EtOH y de hexacianoferrato (III) de potasio al 18% en H_2O , este reactivo es usado también para diferenciar entre furanocumarinas lineales y angulares; el reactivo de Folin-Ciocalteu, entre otros^{69,95-97}.

El anillo de furano de las furanocumarinas puede ser detectado por la prueba de Ehrlich, que desarrolla colores naranja cuando se aspersa la placa con una solución de 4-dimetilaminobenzaldehído al 1% en EtOH, colocando luego la placa en una cámara saturada con vapores de HCl y seguido por tratamiento con una solución de FeCl_3 ⁹⁸.

3.2.3 Técnicas espectrométricas

Para caracterizar a una cumarina nueva debe resolverse los dos problemas siguientes: identificar inicialmente a los diferentes grupos substituyentes y luego asignar su ubicación en el núcleo de la cumarina.

Las cumarinas muestran bandas de absorción ultravioleta características a 274 y 311 nm ($\log \epsilon$ 4,03 y 3,72), las cuales son atribuidas a los anillos de benceno y pirona respectivamente. Se observan desplazamientos batocrómicos en los espectros de las cumarinas hidroxiladas, la posición del nuevo máximo dependerá de la habilidad del grupo hidroxilo de conjugar con el sistema cromóforo, como se puede observar en la Tabla 9 (solamente se indica el valor a mayor longitud de onda).

Tabla 9.- Valores de absorción UV para cumarinas hidroxiladas

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$, nm
Cumarina	311
7-hidroxycumarina	315-330
6,7-dihidroxycumarina	340-350
5,7- ó 7,8-dihidroxycumarina	315-330
5,6,7-trihidroxycumarina	325-330
6,7,8-trihidroxycumarina	335-350

Las cumarinas metoxiladas y glicosidadas, por ejemplo 7-metoxiladas o 7-glicosidadas, muestran espectros UV casi idénticos a las hidroxycumarinas respectivas, mientras que los de las acetiladas son similares al de los hidrocarburos padre, como en el psoralen y derivados^{69,83}.

Los cambios espectrales por la adición de los llamados reactivos de desplazamiento son particularmente útiles para deducir la orientación de determinados grupos funcionales, especialmente grupos hidroxilos. Los reactivos de desplazamiento usuales son: acetato de sodio, hidróxido de sodio, ácido bórico y cloruro de aluminio.

El acetato de sodio como base débil puede ionizar únicamente los grupos hidroxilos más ácidos como los grupos -OH en C-5 o C-7 produciéndose un marcado desplazamiento batocrómico ante la presencia de ellos. Puede servir por ejemplo para diferenciar escopoletina de isoescopoletina: en el primer caso hay un desplazamiento batocrómico de 47 nm (344 nm a 391 nm) al agregarse el acetato de sodio, lo que no ocurre con la isoescopoletina. En cambio, ambas producen desplazamiento batocrómico al agregar una base fuerte como el hidróxido de sodio, aunque habría un modo de diferenciarlos ya que en la cumarina-7-hidroxilada ocurre con un incremento de intensidad mientras en la 6-hidroxilada ocurre con un decrecimiento de la misma: escopoletina de 344 nm ($\log \epsilon$ 4,08) a 400 nm ($\log \epsilon$ 4,37); isoescopoletina de 347 nm ($\log \epsilon$ 4,06) a 403 nm ($\log \epsilon$ 3,91).

Cumarinas o-dihidroxiladas como las 6,7 y 7,8-dihidroxiladas pueden ser diferenciadas fácilmente de las 5,7-dihidroxi: ya que las primeras forman complejos con cloruro de aluminio produciendo desplazamiento batocrómico, estos pueden ser pequeños como de 7 nm en el caso de la 7, 8-dihidroxycumarina o mayores como de 28 nm en la 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina. Desplazamiento batocrómico similar ocurre con la adición de acetato de sodio-ácido bórico (por ejemplo: 6,7-dihidroxycumarina, de 352 nm a 376 nm).

Para la utilización de cada uno de estos reactivos de desplazamiento puede seguirse el procedimiento indicado a continuación⁹⁹:

- Espectro en hidróxido de sodio: se adiciona a la solución metanólica neutra dos gotas de solución de NaOH al 5%.
- Espectro en acetato de sodio: a 3 mL de solución metanólica, se le agrega un exceso de NaOAc pulverizado; después de agitar, se deja en reposo y se determina el espectro de la solución.
- Espectro en ácido bórico: a la solución anterior, saturada con NaOAc, se agrega H_3BO_3 en polvo; el espectro se determina después de agitar y dejar en reposo durante diez minutos.

- Espectro en cloruro de aluminio: se adiciona tres gotas de solución etanólica de AlCl_3 al 5% a la celda conteniendo la solución metanólica y el espectro se determina después de cinco minutos.

En todos los casos el blanco es tratado de una manera idéntica a la solución de los compuestos.

En el espectro IR puede encontrarse bandas características de la α -pirona en la región $1715\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$ junto con la del doble enlace conjugado al anillo aromático en la región usual, $1500\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$.

Los grupos hidroxilos se encuentran a $3600\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$, los hidroxilos secundarios y terciarios pueden diferenciarse por los picos de deformación O-H y estiramiento C-O que están a $1295\text{ y }1090\text{ cm}^{-1}$ para los primeros y a $1410\text{ y }1149\text{ cm}^{-1}$ para los segundos; los grupos metoxilos muestran bandas en la región $1237\text{-}1272\text{ cm}^{-1}$; las señales de los grupos aldehídos podrían estar superpuestas con las del grupo carbonilo del éster cumarínico (su presencia podría deducirse del RMN- ^1H por la señal a $10,67\text{ ppm}$).

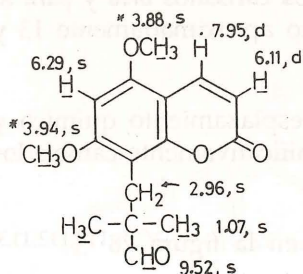
Se podría señalar otras particularidades, como las 2 bandas encontradas en las regiones $1088\text{-}1109\text{ cm}^{-1}$ y $1253\text{-}1274\text{ cm}^{-1}$ en las furanocumarinas, atribuidas a la vibración de estiramiento C-O característica del grupo furano; así como bandas en las regiones $740\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ y $870\text{-}855\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a las deformaciones *en y fuera* del plano de los enlaces C-H del furano.

La RMN ha sido bastante aplicada para la elucidación de estructuras de cumarinas de ocurrencia natural, una importante publicación es la de Steck y Mazurek¹⁰⁰ en la que se señalan reglas para la correlación espectro-estructura. También se aprovechan los valores de la constante de acoplamiento a larga distancia^{101,102}, la utilización de reactivos de desplazamiento¹⁰³⁻¹⁰⁵ y el efecto nuclear overhauser.

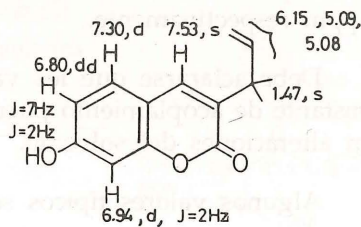
En el análisis de protón ($\delta\text{ ppm}$) de las cumarinas no substituidas en el anillo de pirona, los H-3 y H-4, sistema AB, aparecen como un par de dobletes centrados a $6,1\text{-}6,4$ y $7,5\text{-}8,3$ respectivamente con $J=9,5\text{ Hz}$ (en cloroformo deuterado, y a $7,8\text{-}8,1$ y $8,1\text{-}8,3$ respectivamente en dimetilsulfóxido deuterado).

Una función oxigenada en C-7 puede conducir a un incremento en la densidad electrónica del C-3 haciendo que se desplace la señal del H-3 a campo más alto, el efecto es menor si el oxígeno está en C-5. En las cumarinas 5, 7-dioxigenadas, los protones de C-6 y C-8 que están metarelacionadas, aparecen como un par de dobletes con J ca. 2Hz, pero si además el C-6 o C-8 están substituidos por un carbono, el H remanente aparece como un singulete. En aquellas cumarinas 6, 7-dioxigenadas, H-5 y H-8 aparecen como singuletes a 7,2 y 6,7 ppm respectivamente. Los grupos metoxilos aparecen normalmente en el rango 3,8-4,4 ppm y los metilos a 2,45-2,75 ppm.

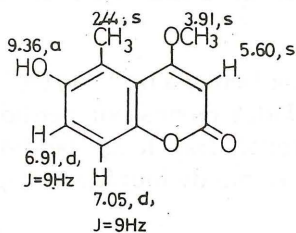
En la figura 27 se muestra algunas cumarinas con sus valores de RMN- 1 H reportados¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.



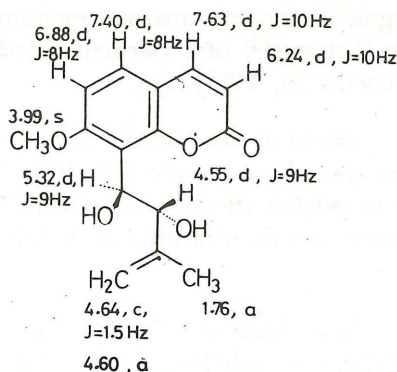
seselinol¹⁰⁶



angustifolina¹⁰⁷



6-hidroxi-4-metoxi-
5-metilcumarina¹⁰⁸



murrangatina¹⁰⁹

Fig. 27.- Algunas cumarinas con los valores de RMN- 1 H reportados (*pueden estar intercambiados)

En los últimos años la espectroscopía de RMN- ^{13}C ha sido grandemente aplicada para identificar cumarinas habiendo aparecido muchas publicaciones con asignaciones completas de los desplazamientos químicos de C-13, así como valores de constantes de acoplamiento C-H para hidroxycumarinas, metoxicumarinas, cumarinas preniladas y relacionadas, furanocumarinas y dihidrofuranocumarinas¹¹¹⁻¹¹³.

El valor de desplazamiento del átomo de carbono carbonílico es el mismo en todos los casos, aproximadamente 160 ppm, el efecto de los grupos hidroxilo o metoxilo en el anillo bencénico es bastante característico en que la señal del nuevo carbono cuaternario es encontrado aproximadamente 30 ppm a campo más bajo que el valor observado de la cumarina, mientras que los carbonos *orto* y *para* al sustituyente se mueven a campo más alto aproximadamente 13 y 8 ppm respectivamente.

Debe aclararse que los valores de desplazamiento químico y constante de acoplamiento pueden ser significativamente cambiados por alteraciones del solvente.

Algunos valores típicos se observan en la figura 28^{110,112,113}.

La espectrometría de masas ha sido de gran utilidad en determinaciones estructurales de productos naturales; un estudio de fragmentación en cumarinas monoméricas y diméricas ha sido realizado por Kutney¹¹⁴; otras particularidades pueden encontrarse en las referencias 78, 115 y 116.

Las cumarinas producen un fuerte ion molecular a m/z 146 (76%) y un pico base a m/z 118 (100%) (28 unidades menos por pérdida de monóxido de carbono del anillo de pirona). Hay luego pérdida consecutiva de otra unidad de CO y de un átomo de hidrógeno (Fig. 29a).

Las 7-hidroxi y 7-metoxicumarinas también muestran pérdidas características de monóxido de carbono observándose en el primer caso un fuerte ion molecular a m/z 162 (80%) con el pico base a m/z 134 (100%), y en el segundo caso a m/z 176 (100%) y a m/z 148 (82%) respectivamente, en este último se observa además un fragmento a m/z 133 (83%) de pérdida de un grupo $-\text{CH}_3$ (Fig. 29b).

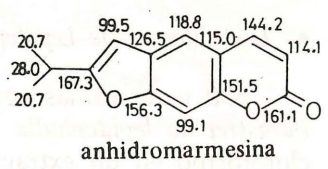
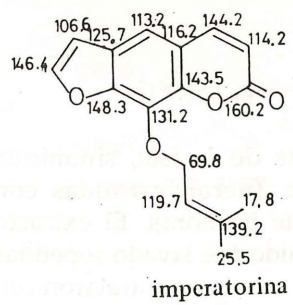
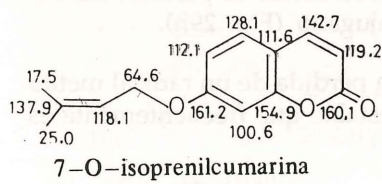
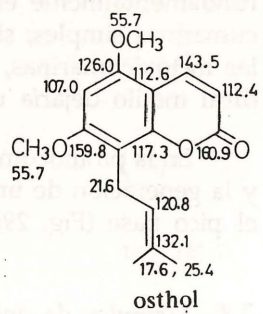
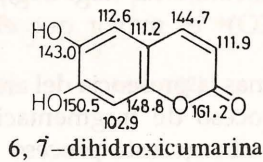
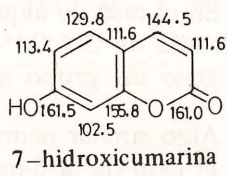
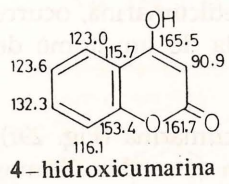
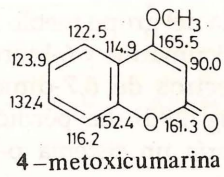
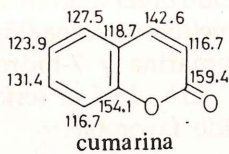


Fig. 28.- Algunas cumarinas con los valores de RMN-¹³C reportados 110,112,113

La pérdida del grupo metilo no ha sido observada en los espectros de 5,7-dimetoxicumarina y 6-hidroxi-7-metoxicumarina (Fig. 29c) pero sí en los espectros de 6,7-dimetoxicumarina y 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Fig. 29d). La pérdida del $-\text{CH}_3$ de C-6 sería explicada porque originaría un sistema p-quinoide favorable.

En el caso de alquilcumarinas como la 4-metilcumarina, ocurre la pérdida de CO (M^+-28) seguida de la pérdida de un átomo de hidrógeno del grupo metilo (Fig. 29e).

Algo similar ocurre en la 4-metil-7-hidroxycumarina (Fig. 29f), y en el caso de la 6-metilcumarina (Fig. 29g), en estos dos últimos casos el fragmento $(\text{M}-\text{CO})^+$ es mayor que el $(\text{M}-\text{CO}-\text{Me})^+$.

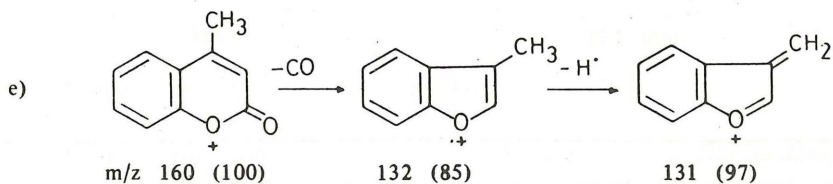
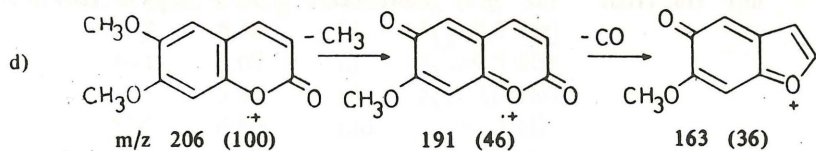
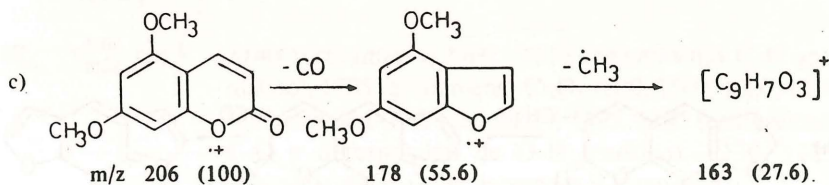
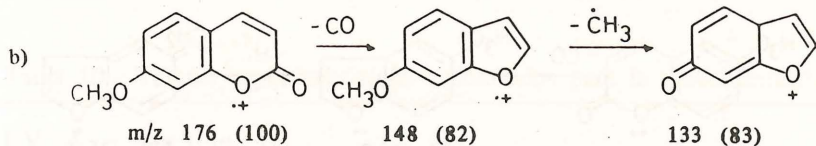
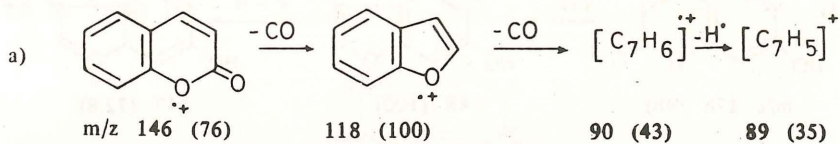
En las furanocumarinas la presencia del anillo de furano no altera fundamentalmente el proceso de fragmentación indicado para las cumarinas simples; sin embargo este proceso puede predominar en las metoxicumarinas, como la xantotoxina, donde la pérdida del radical metilo dejaría un ion oxonio conjugado (Fig. 29h).

En la piranocumarina predomina la pérdida de un radical metilo y la generación de un ion benzopirilo estable que frecuentemente es el pico base (Fig. 29i).

3.3. Ejemplos de aplicación

- Umbeliferona de *Lepidophyllum tola*, "tola", "toya"¹¹⁷

600 g de ramas secas y pulverizadas de *L. tola*, sinonimia *Parastrephia lepidophylla* (Weddel) Cabrera, fueron extraídas con cloroformo en un extractor soxlhet durante 50 horas. El extracto clorofórmico se concentró y el residuo obtenido fue lavado repetidas veces con etanol; las soluciones etanólicas se reunieron y trataron con una solución de acetato de plomo al 7% hasta la no formación de precipitado; luego de la filtración la solución acuosa-etanólica fue liberada del exceso de acetato de plomo, concentrada y extraída con cloroformo. La CC de este extracto clorofórmico en silicagel G 60 (mesh 70-230), por elución con tol:EtOAc (3:2) separó un sólido que luego de repetidas recristalizaciones en metanol y sublimación posterior entre 160 y 170°C dio agujas incoloras, que producen intensa fluorescencia



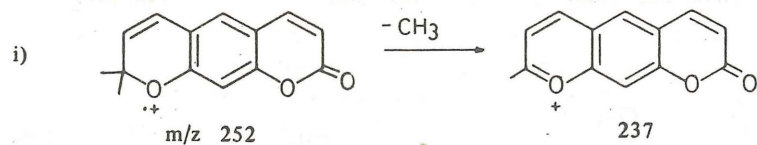
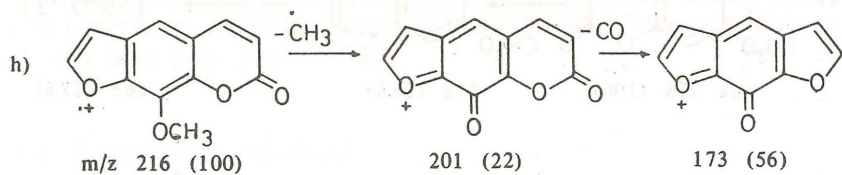
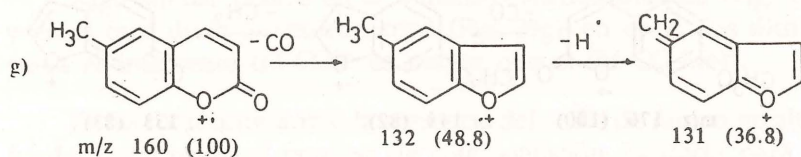
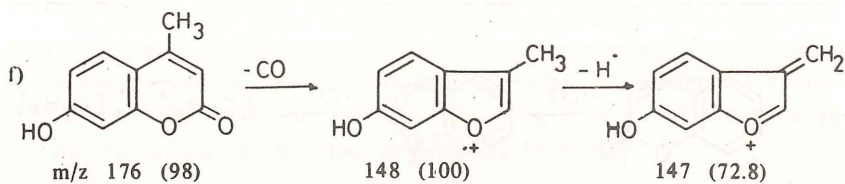


Fig. 29.- Fragmentaciones características de las cumarinas

azul celeste, caracterizadas como la 7-hidroxicumarina o umbeliferona (Fig. 30), en base a los resultados espectroscópicos que se indican en la Tabla 10.

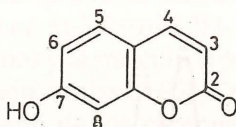


Fig. 30.- Umbeliferona

Tabla 10.- Valores espectroscópicos encontrados para la umbeliferona¹¹⁷

UV	$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$, nm (Fig. 31)		
	MeOH	324,	253, 243h
	NaOAc	371,	274, 265h
	H ₃ BO ₃	324	
IR	$\nu_{\text{m\acute{a}x}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3140 (estiramiento OH), 2820 (estiramiento C-H aromático), 1705 (estiramiento C=O) 1600, 1560, 1500, 1450 (deformación C=C aromático), 1405, 1195 (estiramiento C-O y deformación de O-H fenólico), 1230, 1125 (estiramiento C-O de lactona- α,β -insaturada).	
RMN- ¹ H,	δ ppm, CDCl ₃ + DMSO-d ₆ (Fig. 32)		
	H-3	6,16	(d, J _{3,4} =9,5 Hz)
	H-4	7,68	(d, J _{3,4} =9,5 Hz)
	H-5	7,34	(d, J _{5,6} =9,0 Hz)
	H-6	6,80	(dd, J _{5,6} =9,0 Hz, J _{6,8} =2,2 Hz)
	H-8	6,86	(d, J _{6,8} =2,2 Hz)
	OH	10,30	(s)

• *Cumarinas de Perezia coerulescens Wedd*¹¹⁸

400 g de raíces secas y molidas, extraídas previamente con hexano, fueron sometidas a extracción en Soxhlet con 2 L de cloroformo durante 31 horas. El extracto clorofórmico fue evaporado a sequedad y el

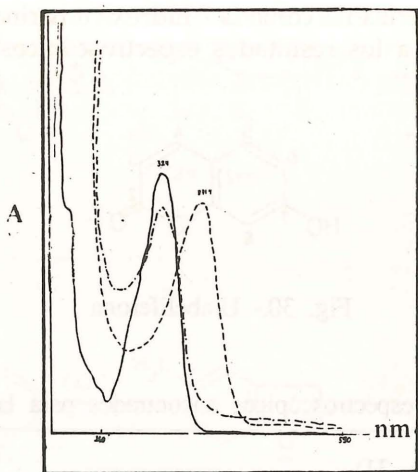


Fig. 31.- Espectro UV de la umbeliferona en MeOH
 (—) + NaOAc (---) + H₃BO₃ (-.-.-)

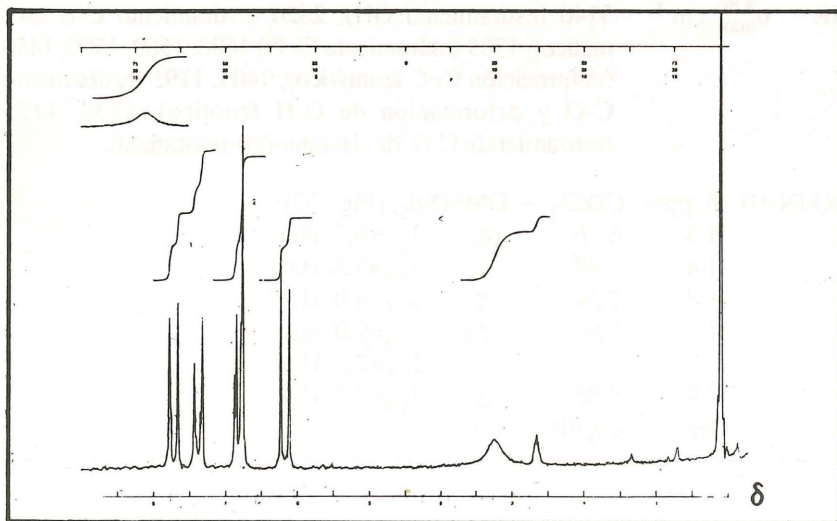


Fig. 32.- Espectro RMN-¹H de la umbeliferona

residuo extraído exhaustivamente con benceno caliente, este extracto bencénico fue concentrado y cromatografiado sobre silicagel G 60 (100 g) con mezclas de polaridad creciente de bz:CHCl₃. La fracción (4:1) produjo 4 mg de pereflorina (por recrystalización en acetona), la fracción (3:7) 2 mg de 3,4,8-trimetoxi-5-formil-2H-1-benzopiran-2-ona (por cristalización en cloroformo) y la fracción (1:9) 25 mg de 8-hidroxipereflorina (por recrystalización en bz:CHCl₃:EtOAc, 3:5:2) (Fig. 33). La caracterización de cada uno de los compuestos aislados fue basada en los análisis de los datos reportados en la Tabla 11.

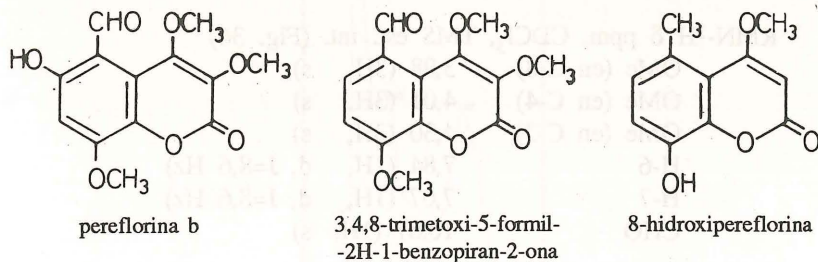


Fig. 33.- Cumarinas de *Perezia coerulescens* Wedd

Tabla 11.- Valores encontrados para las cumarinas aisladas de *Perezia coerulescens* Wedd¹¹⁸

Pereflorina: Agujas cristalinas de color amarillo pálido
 pf 190-193°C

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm 211 (ϵ 22400, 238 (ϵ 12900), 307 (ϵ 18500) (Fig. 34).

RMN-¹H δ ppm, CDCl₃, TMS est. int. (Fig. 35)

OMe (en C-4) y 3,99 (6H, s)

OMe (en C-8)

OMe (en C-3) 4,27 (3H, s)

H-7 6,57 (1H, s)

CHO 10,68 (1H, s)

OH 13,56 (1H, s)

3,4,8-trimetoxi-5-formil-2H-1-benzopirán-2-ona:

Agujas cristalinas de color amarillo pálido.

pf 185-187°C

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm 225 (ϵ 28200), 260 (ϵ 14100),
301 (ϵ 16300)

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 1725, 1669, 1586, 1576

RMN-¹H δ ppm, CDCl₃, TMS est. int. (Fig. 36)

OMe (en C-8)	3,98 (3H, s)
OMe (en C-4)	4,01 (3H, s)
OMe (en C-3)	4,30 (3H, s)
H-6	7,84 (1H, d, J=8,6 Hz)
H-7	7,07 (1H, d, J=8,6 Hz)
CHO	10,67 (1H, s)

EM 70 eV m/z M⁺ 264 (100)

8-hidroxi-pereflorina; Agujas incoloras.

pf 175°C (sublimación)

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm 208 (ϵ 30700), 254 (ϵ 12700),
289 (ϵ 13000) (Fig. 37)

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} 3510, 1715, 1610, 1585 (Fig. 38)

RMN-¹H δ ppm, CDCl₃ + DMSO-d₆, TMS est. int. (Fig. 39)

Me (en C-5)	2,56 (3H, s)
OMe (en C-4)	3,98 (3H, s)
H-3	5,65 (1H, s)
H-6	6,85 (1H, d, J=8,1 Hz)
H-7	7,02 (1H, d, J=8,1 Hz)
OH	9,29 (1H, s.a.)

RMN-¹³C "noise decoupled" δ ppm (Fig. 40)

22,2 Me (aromático); 55,9 OMe; 89,5 C-3; 114,6 C-4a; 117,7 C-7; 126,5 C-6; 142,8 C-8; 142,8 C-8a; 161,1 C-2; 169,1 C-4

EM 70 eV, m/z (%)
M⁺ 206; M⁺-Me 191 (12,5); M⁺-CO 178 (10,4); M⁺-(H,CO)
177 (6,6); M⁺-(Me, CO) 163 (29,6); M⁺-(2Me, CO) 148 (14,6);
M⁺-(Me, 2CO) 135 (8,2)

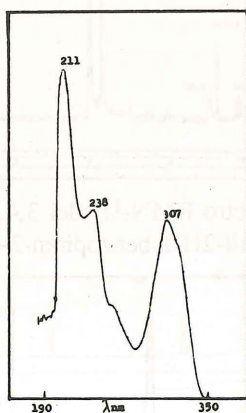


Fig. 34.- Espectro UV de la pereflorina B

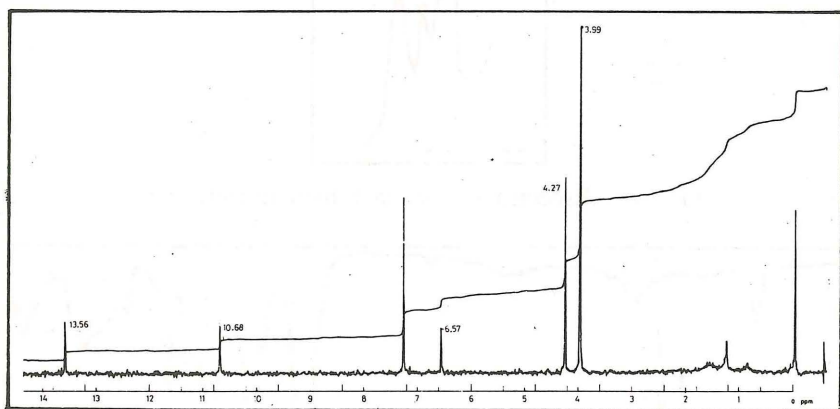


Fig. 35.- Espectro RMN-¹H de la pereflorina B

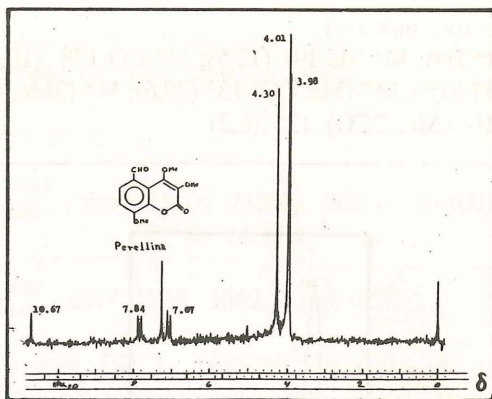


Fig. 36.- Espectro RMN-¹H del 3,4,8-trimetoxi-5-formil-2H-1-benzopiran-2-ona

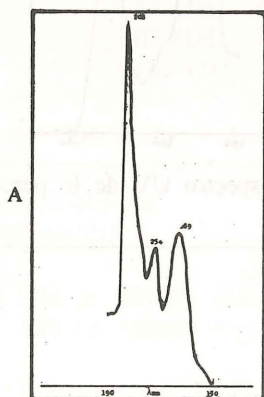


Fig. 37.- Espectro UV de la 8-hidroxipereflorina



Fig. 38.- Espectro IR de la 8-hidroxipereflorina

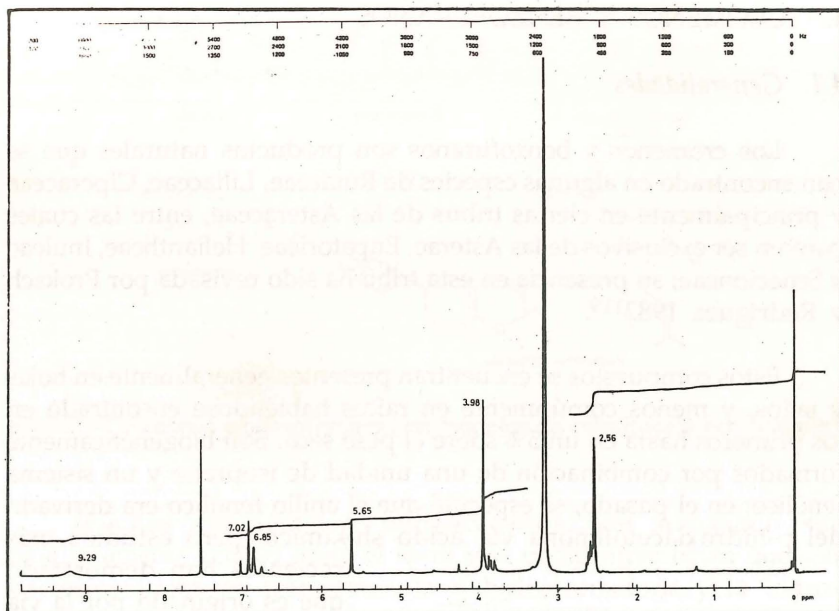


Fig. 39.- Espectro RMN-¹H de la 8-hidroxi-pereflorina

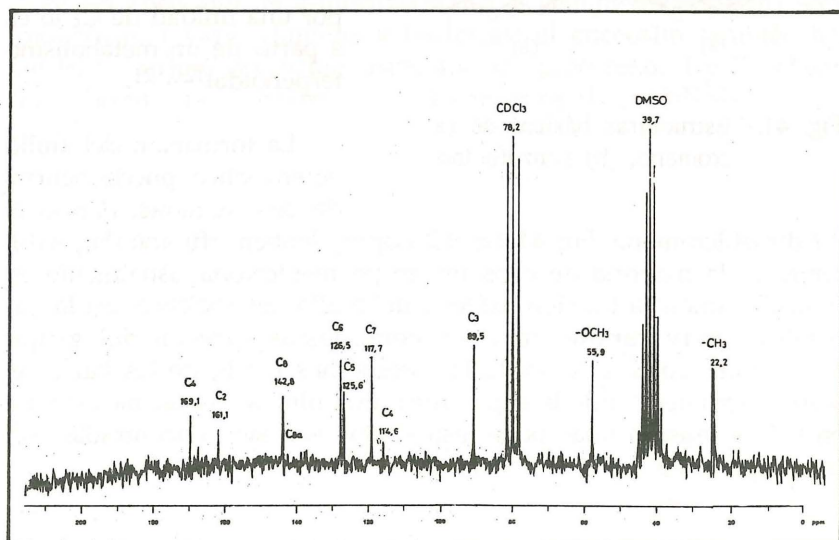


Fig. 40.- Espectro RMN-¹³C "noise decoupled" de la 8-hidroxi-pereflorina

4. CROMENOS Y BENZOFURANOS

4.1. Generalidades

Los cromenos y benzofuranos son productos naturales que se han encontrado en algunas especies de Rutaceae, Liliaceae, Ciperaceae y principalmente en ciertas tribus de las Asteraceae, entre las cuales parecen ser exclusivos de las Asterae, Eupatorieae, Heliantheae, Inuleae y Senecioneae; su presencia en esta tribu ha sido revisada por Proksch y Rodríguez 1983¹¹⁹.

Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas y tallos, y menos comúnmente en raíces habiéndose encontrado en los primeros hasta en un 5% sobre el peso seco. Son biogénicamente formados por combinación de una unidad de isopreno y un sistema fenólico; en el pasado, se especuló que el anillo fenólico era derivado del p-hidroxiaacetofenona vía ácido shikimico, pero estudios más

recientes han demostrado que es originado por la vía acetato; mientras que el anillo heterocíclico, formado por una unidad de C₅ lo es a partir de un metabolismo terpenoidal^{120,121}.

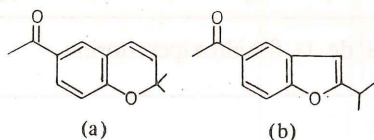


Fig. 41.- Estructuras básicas de (a) cromeno, (b) benzofurano

2,2-dimetilcromeno (Fig. 41a) o el 2-isopropilbenzofurano (Fig. 41b), teniendo la mayoría de ellos un grupo metilcetona usualmente en posición *para* a la función oxígeno del anillo heterocíclico. En la naturaleza muy raramente estos compuestos carecen del grupo metilcetona, como el caso de los precocenos I y II, de las llamadas werneriacromeno o de la eupatorona, esta última con un metilcetona en C-2, asimismo unas pocas estructuras han sido encontradas con un grupo C=O en el C-3 (Fig. 42)¹²²⁻¹²⁴.

La formación del anillo heterocíclico puede ocurrir de dos maneras, dando el

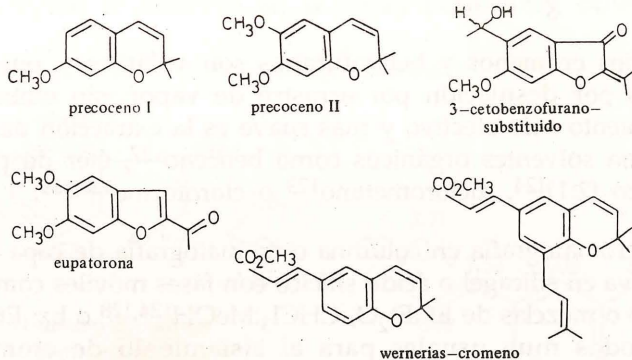


Fig. 42.- Cromenos y benzofuranos con modelos de sustitución no comunes)

Muchos cromenos y benzofuranos han mostrado ser biológicamente activos como el toxol y la dehidrotremetona que son bacteriostáticos; la tremetona, la dehidrotremetona y la hidroxitremetona son tóxicos a los peces; el toxol y el angelato de toxilo exhiben una débil actividad antitumor contra la leucemia linfocítica P-388; el enecalinal, el 7-hidroxiencialin y la 6-metoxieuparina son fototóxicos a varios hongos y bacterias; el enecalinal también ha mostrado acción insecticida; asimismo los precocenos I y II actúan como hormonas antijuveniles en los insectos (Fig. 43)^{119,125,126}.

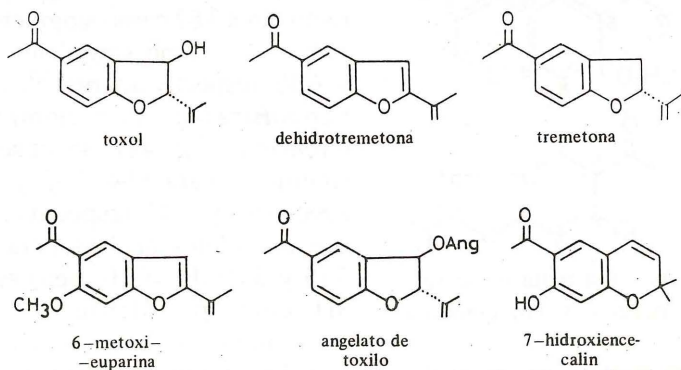


Fig. 43.- Cromenos y benzofuranos

4.2. Técnicas generales

Varios cromenos y benzofuranos son volátiles y pueden ser extraídos por destilación por arrastre de vapor, sin embargo un procedimiento más efectivo y más suave es la extracción de plantas frescas con solventes orgánicos como benceno¹²⁷, éter de petróleo-éter etílico (2:1)¹²⁴, diclorometano¹²³ o cloroformo^{128,129}.

La cromatografía en columna o cromatografía de capa delgada preparativa en silicagel o ácido silícico con fases móviles como diclorometano o mezclas de EP:Et₂O, CHCl₃:MeOH^{124,128} o bz: EtOAc¹²⁹, son métodos muy usuales para el aislamiento de cromenos y benzofuranos. Son también métodos muy efectivos la utilización de CC usando Sephadex LH-20 con metanol como eluyente¹²³ y de la técnica de HPLC sobre RP que últimamente ha podido ser aplicada para la cuantificación de cromenos y benzofuranos en extractos de plantas¹¹⁹.

En el espectro IR la presencia de la cetona aromática puede ser observada por las señales a 1675 cm⁻¹ y entre 1625 y 1500 cm⁻¹ (o-hidroxicetona) y de los grupos hidroxilos a 3600 cm⁻¹.

En el espectro RMN-¹H (δ ppm) de los cromenos, por ejemplo, en el enecalín (Fig. 44), los átomos H-3 y H-4 aparecen como dos dobletes (sistema AB) a 5,48 y 6,28 (J=10 Hz), el gem-dimetilo a 1,41

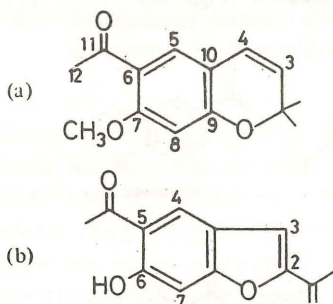
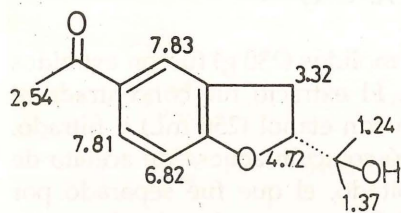


Fig. 44.- Estructuras de (a) enecalín, (b) euparina

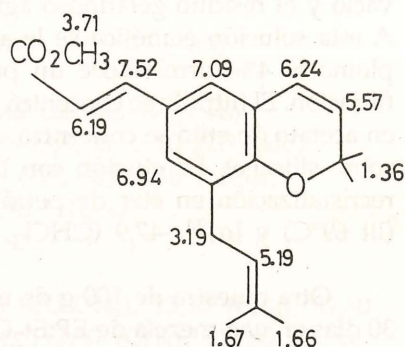
como singulete, el grupo metilcetona a 2,52 como singulete, el metoxilo a 3,82 como singulete y los H-5 y H-8 como singuletes a 7,50 y 6,38 respectivamente¹³⁰. En los benzofuranos, por ejemplo, la euparina (Fig. 44), se observa 3 singuletes para H-4, H-3 y H-7 a 7,88, 6,88 y 6,45 respectivamente, dos singuletes anchos para 1H a 5,15 y 5,70 de =CH₂, señales para 3H correspondiente al grupo metilvinílico a 2,05 como doblete

(J=1 Hz), para el grupo metilcetona a 2,60 como singulete y a 12,40 se puede observar la señal singulete para el protón hidroxílico (intercambio con D₂O)¹³⁰.

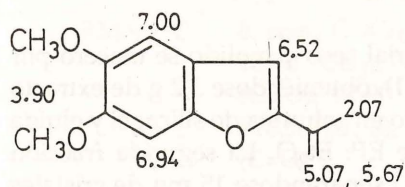
Otros ejemplos se observan en la figura 45.



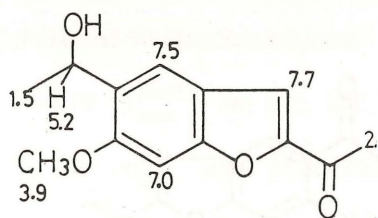
10, 11-dihidro-10-hidroxi-tremetona¹³¹



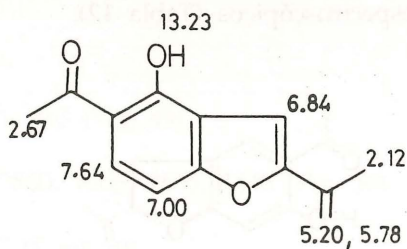
8-[3,3'-dimetilalil]-werneria cromeno¹²⁴



5,6-dimetoxi-2-isopropenilbenzofurano¹²⁷



2-acetil-5-(1ε-hidroxietyl)-6-metoxibenzofurano¹³²



4-hidroxi-dehidrotremetona¹³³

Fig. 45.- Valores de RMN-¹H para algunos cromenos y benzofuranos

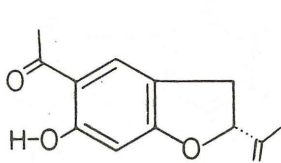
4.3. Ejemplos de aplicación

- Benzofuranos de *Werneria ciliolata* A. Gray^{129,134}

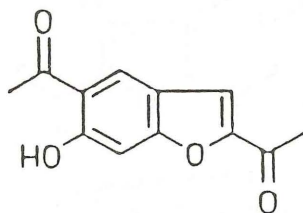
Las hojas, raíces y tallos secos y molidos (230 g) fueron extraídos con cloroformo (2 L) en un soxlhet. El extracto fue concentrado al vacío y el residuo gelatinoso agitado con etanol (250 mL) y filtrado. A esta solución etanólica se le agregó solución acuosa de acetato de plomo al 4% formándose un precipitado, el que fue separado por filtración. El filtrado se concentró y agitó con acetato de etilo; el extracto en acetato de etilo se concentró y el residuo 96,71 g se cromatografió sobre silicagel. La elución con bz:EtOAc dio cristales incoloros, por recristalización en éter de petróleo, de dihidroeparina, de pf 68°C (lit 69°C) y $[\alpha]^{24} -47,9$ (CHCl₃, c 0,76).

Otra muestra de 100 g de material seco y molido se maceró por 30 días en una mezcla de EP:Et₂O (2:1), obteniéndose 3,2 g de extracto seco. Este extracto fue cromatografiado en columna de silicagel y eluída en mezcla de polaridad creciente de EP: Et₂O. La segunda fracción se sometió a CCDP en bz:CHCl₃ (1:1) separándose 15 mg de cristales de color amarillo pálido de 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano de pf 134 °C.

Las estructuras (Fig. 46) fueron determinadas en base a los datos espectroscópicos (Tabla 12).



Dihidroeparina



2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

Fig. 46.- Dihidroeparina y 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

Tabla 12.- Datos espectroscópicos encontrados para la dihidroeuvarina^{129,134} y el 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

Dihidroeuvarina

UV	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm	225, 248, 286, 331
IR	$\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3400-2700, 1645, 1605 (Fig. 47)
RMN- ¹ H	δ ppm, CDCl ₃ , TMS est. int. (Fig. 48)	1,75 (3H, s.a.), 2,53 (3H, s), 3,10 (2H, ddd), 5,10 (2H, m), 5,25 (1H, dd), 6,38 (1H, s), 7,50 (1H, s.a.), 12,98 (1H, s)
RMN- ¹³ C	δ ppm, CDCl ₃	16,70 (CH ₃), 25,70 (CO-CH ₃), 33,13 (CH ₂), 87,50 (CHO), 97,90 (CH), 112,60 (CH ₂), 113,80 (C, s), 118,50 (C, s), 126,50 (CH), 143,50 (C, s), 165,70 (C=O)
EM m/z	M ⁺	218 (94), 203 (100), 185 (13), 175 (56), 161 (17), 160 (30), 129 (18), 105 (20), 94 (15), 91 (18), 77 (28), 69 (34), 43 (100)

2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

UV	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$, nm	226, 250, 295, 343 (Fig. 49)
IR	$\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3410, 2920, 2860, 1665, 1635, 1540 (Fig. 50)
RMN- ¹ H	δ ppm, CDCl ₃ , TMS est. int.	8,09 (1H, s), 7,39 (1H, s), 7,02 (1H, s), 2,64 (3H, s), 2,51 (3H, s) (Fig. 51)
EM	M ⁺	218,2 (50), 203 [M-Me] ⁺ (100), 43,2 [MeCO] ⁺ (33,9)

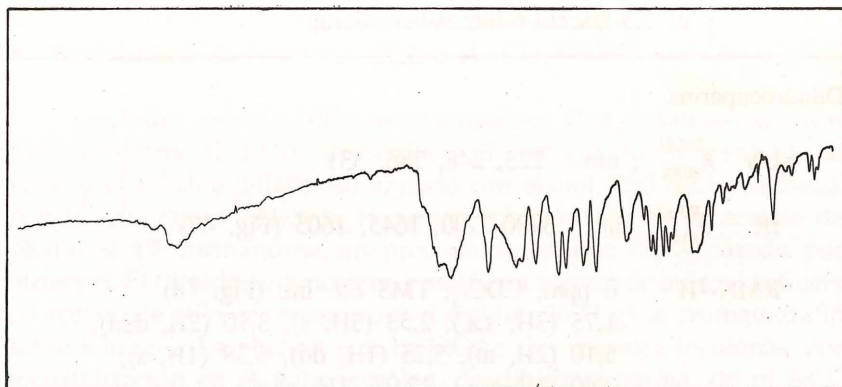


Fig. 47.- Espectro IR de la dihidrocuparina

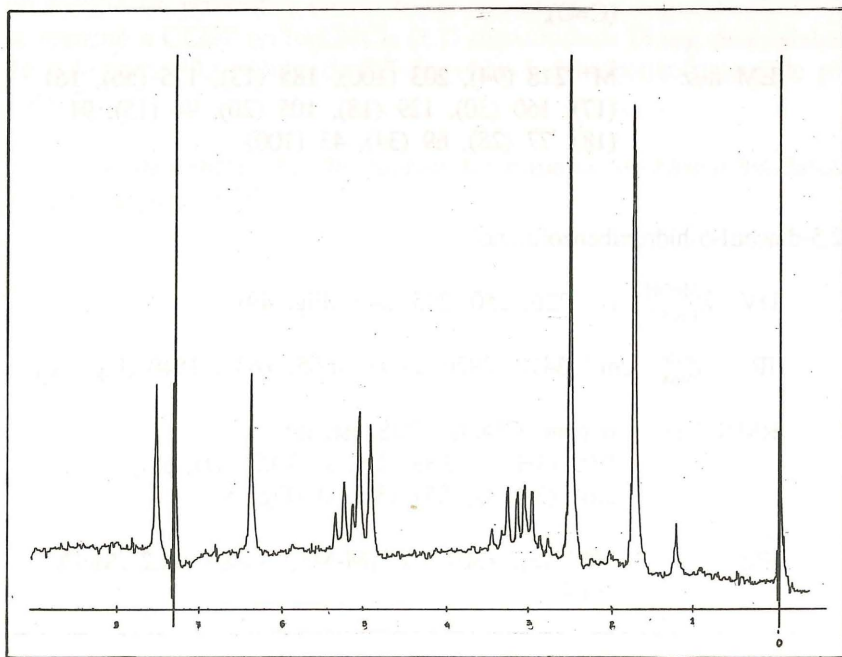


Fig. 48.- Espectro RMN-¹H de la dihidrocuparina

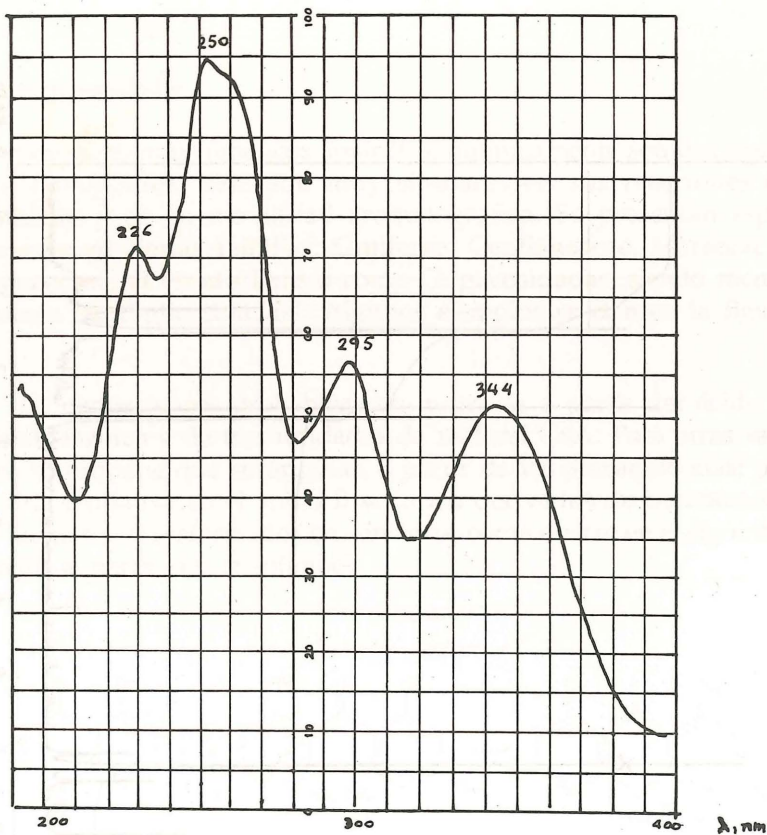


Fig. 49.- Espectro UV de 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

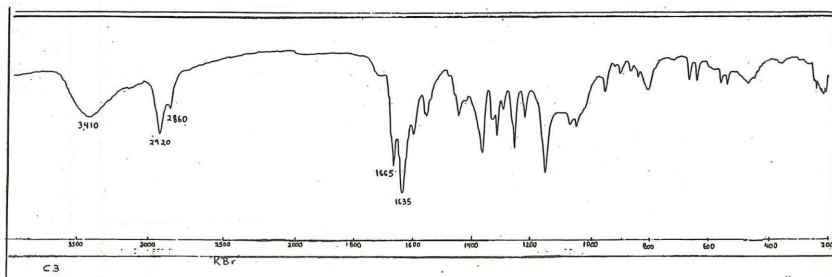


Fig. 50.- Espectro IR de 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano

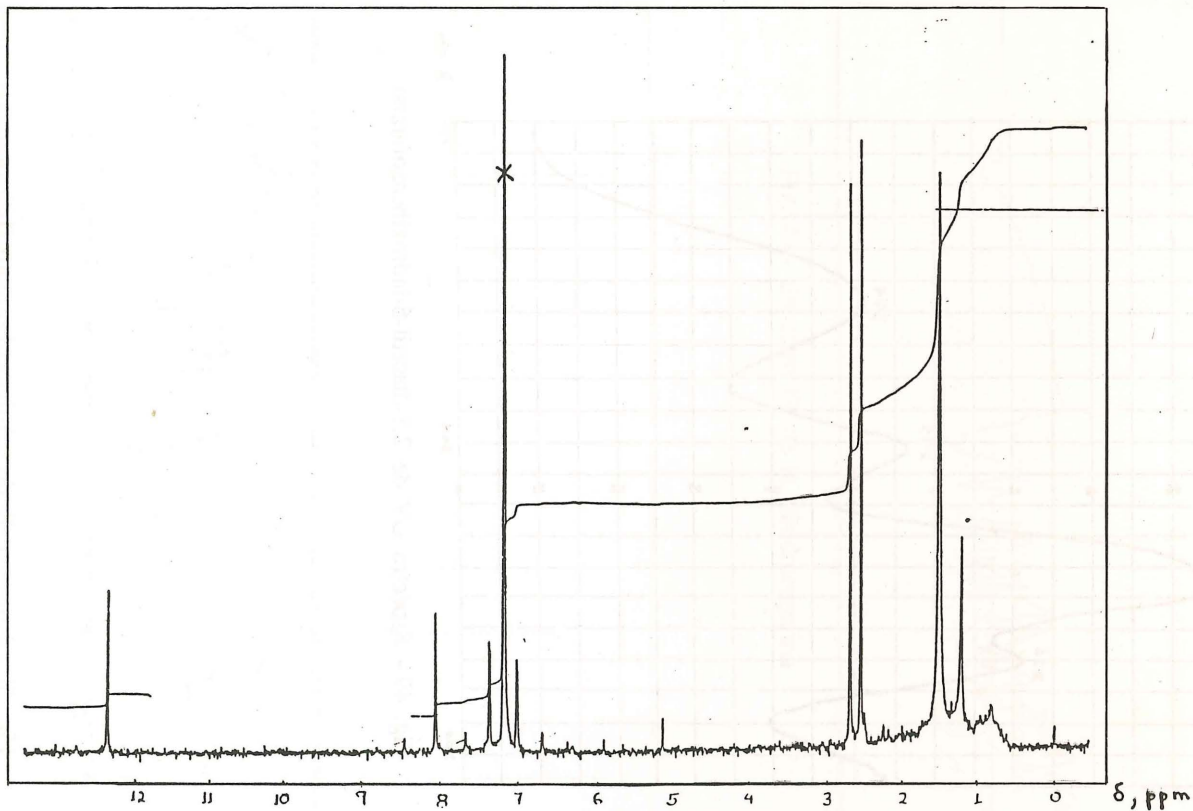


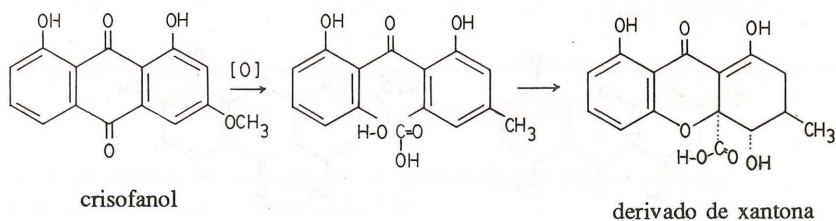
Fig. 51.- Espectro RMN- ^1H del 2,5-diacetil-6-hidroxi-benzofurano

5. XANTONAS

5.1. Generalidades

Son pigmentos fenólicos amarillos; químicamente son diferentes a los flavonoides, pero son muy similares en sus reacciones de coloración y en su movilidad cromatográfica. Se presentan especialmente en ciertas familias: Gutiferae, Gentianaceae, Moraceae y Polygonaceae, al estado libre o como O. glicosidadas, siendo menos comunes las C-glicosidadas¹. Algunos ejemplos se dan en la figura 52.

La gentiseína es probablemente formada a partir del ácido 4-hidroxibenzoico y de tres unidades de malonil CoA. Para otras xantonas se propone que se originan a partir de las antraquinonas; por ruptura oxidativa en el anillo B se forma derivados de benzofenona que luego son transformados en xantonas, como ocurre en el siguiente ejemplo a partir del crisofanol².

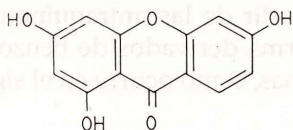


5.2. Técnicas generales^{47,135-139}

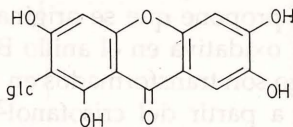
Las xantonas pueden ser extraídas del material que las contiene con solventes como CH_2Cl_2 o MeOH, y ser separadas por CCD sobre gel de sílice utilizando sistemas como n-hex:AcOEt (2:3), bz:AcOEt (3:1), CHCl_3 :AcOEt (en proporciones variadas), bz: CHCl_3 (3:7), CHCl_3 :MeOH (7:3); CHCl_3 :AcOH (4:1), tol:AcOEt: EtOH (7:3:1); para glicosidos puede utilizarse AcOEt:MeOH:H₂O (100:16.5:7). Para algunas xantonas solubles en agua como la mangiferina, puede utilizarse la CP.

Otra técnicas cromatográficas son también muy usuales como la filtración en Sephadex LH-20 con MeOH o $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1); o el HPLC usando columnas RP-18 con $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2). Para xantonas glicosidadas puede utilizarse la DCCC con el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{n.PrOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:12:1:8), en la que puede actuar como fase móvil tanto la fase superior mas polar como la fase inferior menos polar.

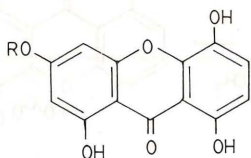
Pueden ser detectadas en una cromatografía por su coloración al UV con y sin amoníaco; con solución de KOH al 5% en MeOH, o en general usando reveladores para grupos fenólicos.



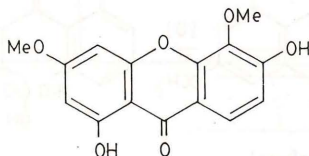
gentiseína



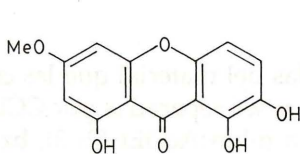
mangiferina



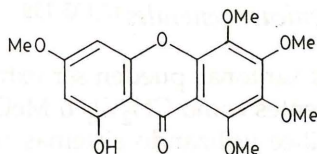
R=CH₃, bellidifolina
R=H, desmetilbellidifolina



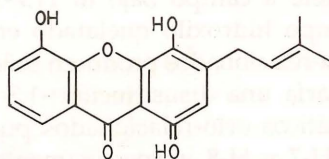
1,6-dihidroxi-3,5-
-dimetoxixantona



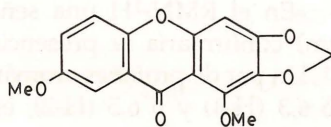
swertianina



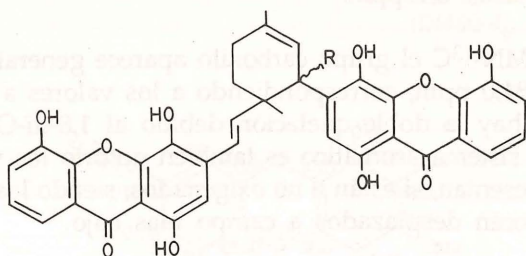
1-hidroxi-3,5,6,7,8-pentame-
toxixantona



1,4,5-trihidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)-xantona¹³⁶



1,7-dimetoxi-2,3-metilendioxi-xantona¹³⁷



1 R = - H garcilivina A

2 R = ||| H garcilivina B

Fig. 52.- Algunas xantonas¹³⁵⁻¹³⁹

Nota: por razones de conveniencia, la numeración utilizada es arbitraria y no está de acuerdo a las reglas IUPAC

Entre las propiedades espectrales señalaremos que en el UV presentan máximos de absorción a 230-245, 250-265, 305-330 y 340-400 nm. Al igual que los flavonoides sufren desplazamiento batocrómico con alcali, AlCl_3 y $\text{NaAcO-H}_3\text{BO}_3$, dependiendo del número y posición de los sustituyentes hidróxilos. Así un fuerte desplazamiento batocrómico con AlCl_3 indica la presencia del grupo OH *peri* a la función carbonilo, con $\text{NaOAc-H}_3\text{BO}_3$ en posición C-3 o C-6, etc..

En el IR presentan señales características a $1640-1660 \text{ cm}^{-1}$ del carbonilo conjugado, también como a 1610 y 1596 cm^{-1} del sistema aromático.

En el RMN-¹H una señal singulete a campo bajo (δ 11,7-13,4 ppm) confirmaría la presencia del grupo hidroxilo quelatado en el C-1. Un par de protones aromáticos meta-relacionados producen señales a δ 6,3 (H-4) y δ 6,5 (H-2), esto indicaría una disustitución -1,3- en el anillo A. Un par de protones aromáticos orto-relacionados puede aparecer, por ejemplo, a δ 7,0 y 7,8 (H-7 y H-8, respectivamente) ó δ 6,8-7,2 y 7,3-7,5 (H-5 y H-6, respectivamente). Los grupos metoxilos se presentan como singulete entre 3,90-4,10 ppm y el grupo metilendcoxi a 6,0-6,1 ppm.

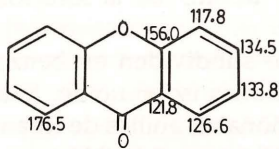
En el RMN-¹³C el grupo carbonilo aparece generalmente entre los 178,0 y 184,0 ppm, correspondiendo a los valores a campo mas bajo cuando hay la doble quelación debido al 1,8-di-OH. Para los carbonos del sistema aromático es tambien notorio los valores diferentes que presentan, si están o no oxigenados, siendo los oxigenados los que aparecen desplazados a campo mas bajo.

En la figura 53 se encuentran algunos ejemplos.

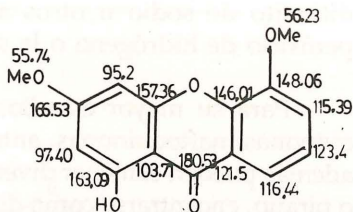
6. QUINONAS

6.1. Generalidades^{1,2,140-142}

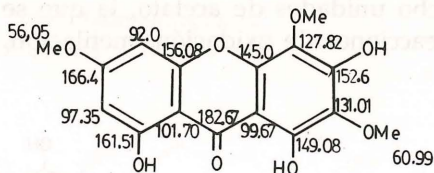
Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas, donde su color está enmascarado por otros pigmentos. En general, están ampliamente distribuídas pero contribuyen en muy pequeña extensión a la coloración de las plantas superiores, a diferencia por ejemplo de los carotenoides y antocianinas; en cambio hacen mayor contribución en las bacterias, hongos y líquenes. Se presentan mayormente al estado libre, pero las hidroxiladas pueden encontrarse glicosidadas. Para confirmar su presencia puede ser útil una simple reacción de color basada en las propiedades redox de las quinonas; así, la reducción a un producto incoloro (o menos intensamente coloreado) y la fácil regeneración de su color por oxidación es característico y distintivo de éllas (en comparación a otros compuestos naturales coloreados). La reducción puede efectuarse con solución neutra o alcalina de



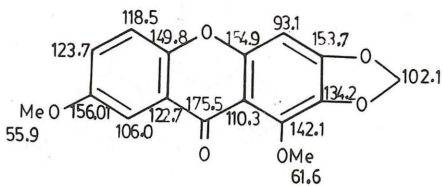
xantona



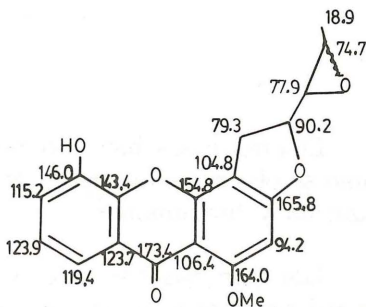
1-hidroxi-3,5-dimetoxixantona
(DMSO- d_6 , 50 MHz)



1,8-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona
(DMSO- d_6 , 50 MHz)



1,7-dimetoxi-2,3-metilendioxixantona
(CDCl_3 , 50 MHz)



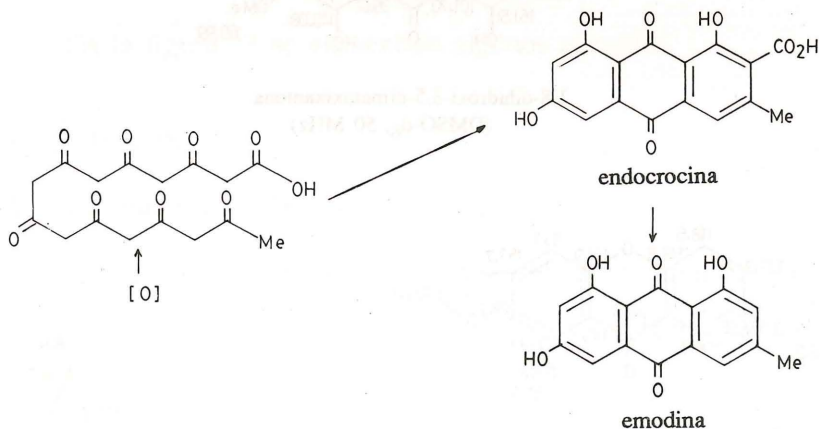
psorospermin
(DMSO- d_6 -50 MHz)

Fig. 53.- Algunas xantonas con los valores RMN- ^{13}C reportados

ditionito de sodio u otros agentes reductores, y la oxidación con peróxido de hidrógeno o la simple agitación -al aire- de la solución.

Para su mayor estudio, las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isoprenoide. Ellas además pueden contener diversos grupos funcionales, anillos de furano o pirano, encontrarse como dimeros, ser parcialmente reducidas como la antranoles y antronas, etc.. (Fig. 54).

Se asume que la mayoría de las antraquinonas han sido elaboradas a través de la ruta acetato-malonato como podemos observar para la endocrocina y emodina, formadas a partir de una cadena policetida de ocho unidades de acetato, la que se pliega, condensa y luego sufre reacciones de oxidación, metilación, descarboxilación, etc.^{1,2}.

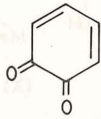


En otros casos, han sido formadas por la ruta del ácido shikimico como se observa en la figura 55 para la shikonina, juglona, lawsona, alizarina y filoquinona².

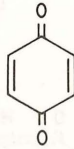
Las quinonas han sido conocidas desde Antigüo por sus propiedades tintóreas. Algunas presentan además otras propiedades como la emodina que es catártica; shikonina, antimicótica; rhein, bajo la forma de diacetato, antirreumático; plumbagina, muy activa para la leishmaniasis; lapachol, citostática, bacteriostática, fungistática, entre otros.

• benzoquinonas

(a) p. benzoquinona ; (b) o-benzoquinona



(a)

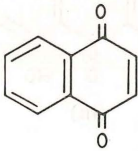


(b)

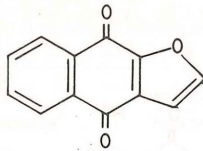
• naftoquinonas

(c) simple ; (d,e) furanonaftoquinona

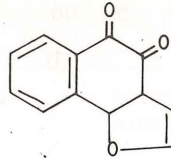
(f,g) piranonaftoquinona ; (h,i) dimera



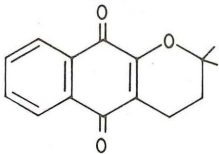
(c)



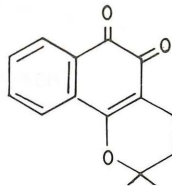
(d)



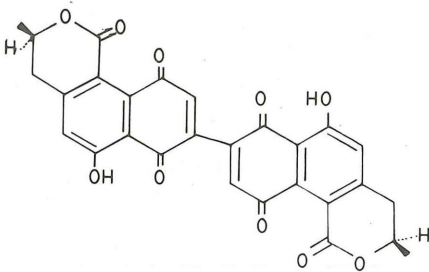
(e)



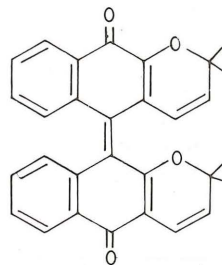
(f)



(g)



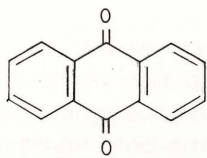
(h)



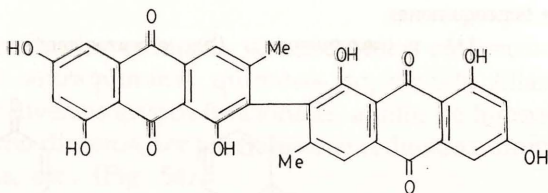
(i)

• antraquinonas

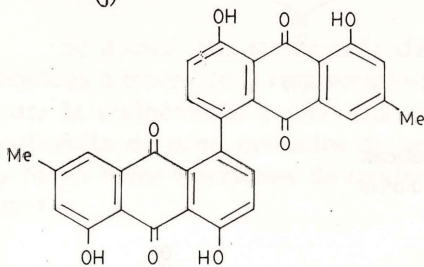
(j) simple ; (k,l,m) dimera ; (n) reducida (antrona)



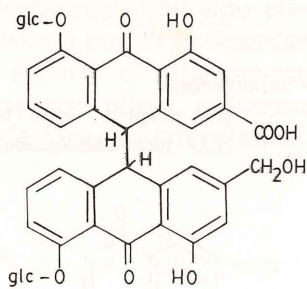
(j)



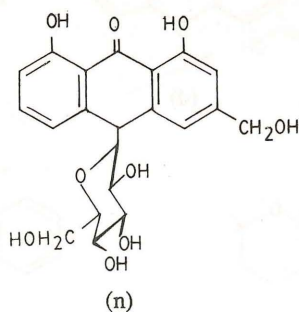
(k)



(l)

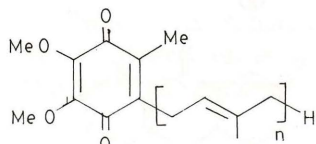


(m)

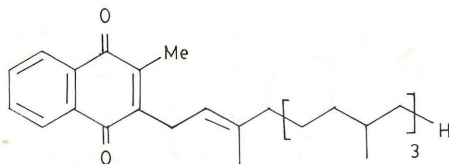


(n)

• quinonas isoprenoides



ubiquinona
(n=1a12)



filoquinona
(vitamina k)

Fig. 54.- Quinonas diversas

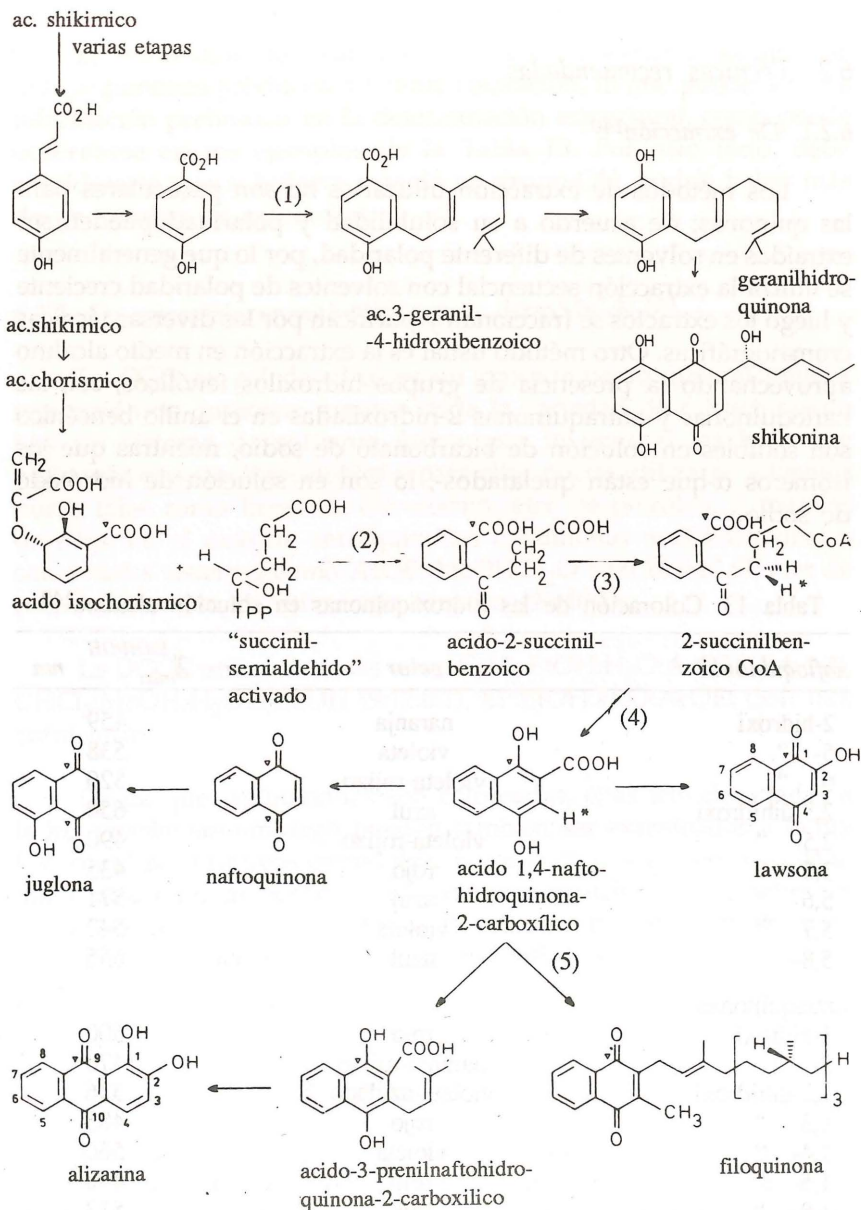


Fig. 55.- Biosíntesis de naftoquinonas y antraquinonas

(1) difosfato de geranilo: 4-hidroxi benzoato geraniltransferasa (2) sintasa-2-succinilbenzoato (3) 2-succinilbenzoato: CoA ligasa (4) sintasa naftoato (5) 1,4-dihidroxi-2-naftoato: polipreniltransferasa

6.2. Técnicas recomendadas

6.2.1. De extracción¹⁴⁰

Los métodos de extracción utilizados no son particulares para las quinonas; de acuerdo a su solubilidad y polaridad pueden ser extraídas en solventes de diferente polaridad, por lo que generalmente se utiliza la extracción secuencial con solventes de polaridad creciente y luego los extractos se fraccionan y purifican por las diversas técnicas cromatográficas. Otro método usual es la extracción en medio alcalino aprovechando la presencia de grupos hidroxilos fenólicos; así, las naftoquinonas y antraquinonas β-hidroxiladas en el anillo bencénico son solubles en solución de bicarbonato de sodio, mientras que los isómeros α-que están quelatados-, lo son en solución de hidróxido de sodio.

Tabla 13. Coloración de las hidroxiquinonas en solución alcalina¹⁴⁰

<i>naftoquinonas</i>	<i>color</i>	$\lambda_{max}^{EtOH/OH^-}$ nm
2-hidroxi	naranja	459
5- "	violeta	538
6- "	violeta-rojizo	520
2,3-dihidroxi	azul	650
2,5- "	violeta-rojizo	490
3,5- "	rojo	435
5,6- "	azul	571
5,7- "	violeta	542
5,8- "	azul	655
<i>antraquinonas</i>		
1-hidroxi	rojo	500
2- "	naranja-rojizo	478
1,2-dihidroxi	violeta-azulado	576
1,3- "	rojo	485
1,4- "	violeta	560
1,5- "	rojo	496
1,8- "	rojo	513
1,2,3-trihidroxi	verde	668
1,2,4- "	violeta-rojizo	544
1,4,5- "	violeta	561
1,4,5,8-tetrahidroxi	azul	630

Es interesante destacar que en exceso de solución alcalina las hidroxiquinonas producen diferente coloración, lo que puede ser una información preliminar en la determinación estructural, como puede observarse en los ejemplos de la Tabla 13. Por otro lado, debe considerarse que si hubiera más de un grupo-OH, podría haber más de un cambio de coloración.

6.2.2. De separación cromatográfica y de detección^{1,47,140}

La CCD en gel de sílice es un procedimiento general para la separación de quinonas, aunque dada la variedad de estructuras no hay un sistema de solvente único; por lo general las benzo- y naftoquinonas son liposolubles y para ellas puede utilizarse solventes puros tales como benceno, cloroformo, éter de petróleo, o mezclas de ellos; en el caso de antraquinonas o quinonas más hidroxiladas son usuales sistemas como AcOEt:MeOH:H₂O (100:16,5:13,5); éter de petróleo:formiato de etilo:ácido fórmico (90:40:1).

La DCCC utiliza sistemas como C₆H₆:EtOH:H₂O:AcOEt (5:4:1:2), CHCl₃:MeOH:H₂O:n-buOH (9:12:8:1), EP:EtOH:H₂O:AcOEt (5:4:1:2), entre otros.

Desde que las quinonas son coloreadas, ellas son detectadas a la luz visible; sin embargo pueden también ser examinadas a la luz UV, o utilizar reactivos cromogénicos como el azul de leucometileno que produce en las benzo y naftoquinonas manchas azules sobre un fondo blanco, o KOH metanólico al 10% que producen cambios de color de las manchas originales, de amarillo a rojo, violeta, verde o púrpura.

6.2.3. Técnicas espectrométricas^{140,141}

Las mediciones espectrales son esenciales para la identificación de las quinonas. El espectro UV-Vis indica la clase de quinona presente, desde que el número y posición de las bandas de absorción aumenta con la complejidad de la estructura. Por otro lado, presentan en el IR absorciones fuertes características del grupo carbonilo, y en el espectro de masa es característico la pérdida de una o dos moléculas

de monóxido de carbono a partir del pico padre. Mayores detalles se dan en los párrafos siguientes.

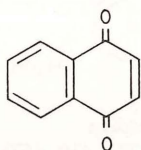
El espectro UV de la p-benzoquinona se caracteriza por una absorción intensa alrededor de 240 nm (ϵ_{\max} 26000), una de intensidad media a 285 nm (ϵ_{\max} 300) y una aún mucho más débil ($n \rightarrow \pi$) en la región visible. La introducción de grupos sustituyentes produce un pequeño desplazamiento batocrómico en la primera banda (~10nm), para la segunda banda el desplazamiento es mayor y dependiente del sustituyente (Me 27 nm, MeO 69 nm, OH 81 nm); la introducción de un segundo sustituyente no produce desplazamiento significativo.

En las naftoquinonas el espectro es más complejo desde que hay absorciones del sistema bencénico y quinónico. La naftoquinona padre presenta absorciones a 245, 257h y 335 nm ($\log \epsilon$ 4,34, 4,12 y 3,48 respectivamente). El hombro a 257 nm corresponde a las transiciones electrónicas en el sistema quinoideo, por lo que hay desplazamiento batocrómico si se introduce sustituyentes +I y +M (ejemplo 2-hidroxi, 275-280 nm); por otro lado, la *peri* sustitución por grupo hidroxilo produce en la banda del bencenoide (335 nm) un desplazamiento de alrededor de 100 nm (ejemplo 5-hidroxi:420 nm, 5.8-dihidroxi: 490 nm).

Las antraquinonas muestran intensa absorción bencenoide a 250 nm y de intensidad media a 322 nm; la absorción quinoidea fuerte se observa a 263 y 272 nm y una débil a 405 nm. La sustitución por grupos hidroxilo o alcoxilo invariablemente intensifica las bandas y provoca desplazamientos batocrómicos. Algunos ejemplos se observan en la figura 56.

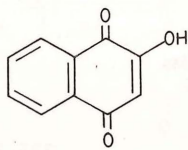
En el IR la absorción del grupo carbonilo se observa a 1669 cm^{-1} para la p-benzoquinona; la frecuencia aumenta con el número de anillos bencénicos fusionados lineales, ejm 1,4-naftoquinona, 1675 cm^{-1} ; 9,10-antraquinona, 1678 cm^{-1} ; la frecuencia disminuye por la presencia de enlaces de hidrógeno.

En el RMN se observa valores característicos para el protón del sistema quinónico (~ 6,5-7,0 ppm) y para el carbono carbonílico (~170,0-190,0 ppm), como podemos apreciar en la figura 57.



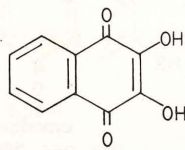
naftoquinona

245, 257h, 335
(4,34, 4,12, 3,48)



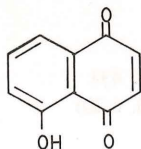
2-hidroksinaftoquinona
(lawsone)

249, 275,5, 282, 339
(4,20, 4,23, 4,24, 3,53)



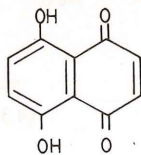
2,3-dihidroksinaftoquinona

240, 286, 418, 430
(4,00, 4,10, 3,56, 3,56)



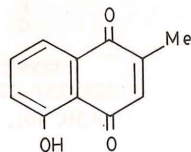
juglona

253,5, 337, 429
(4,19, 3,15, 3,64)



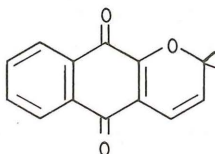
5,8-dihidroksinaftoquinona

269, 338, 490, 524
(3,87, 3,00, 3,73, 3,78)



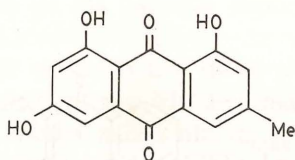
plumbagina

220, 266, 418
(3,87, 4,12, 3,61)

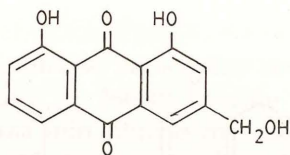


dehidro- α -lapachona

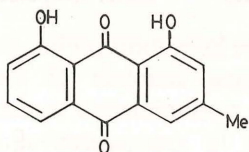
267, 276h, 333, 434
(4,35, 4,17, 3,40, 3,21)



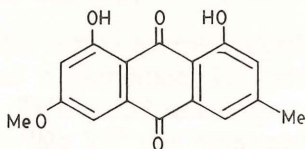
emodina
253, 266, 289, 436
(4,31, 4,29, 4,36, 4,14)



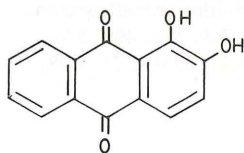
aloe emodina
225, 254, 276,5, 287, 430, 457h
(4,59, 4,34, 4,01, 4,03, 4,04, 3,89)



crysophanol
228, 257, 277, 287, 429
(4,30, 4,01, 4,03, 4,03)



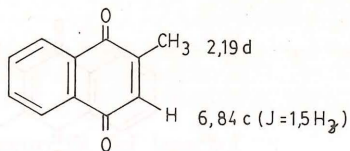
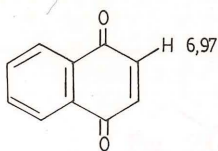
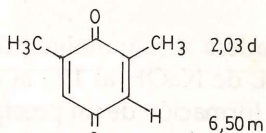
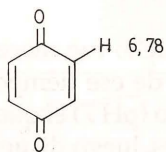
physcion
257h, 266, 288, 431
(4,35, 4,36, 4,30, 4,20)



alizarina
247, 278, 330, 434
(4,45, 4,13, 3,46, 370)

Fig. 56.- Propiedades espectrales UV-V de algunas quinonas de ocurrencia natural, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}^{\text{EtOH}}$, nm (log ϵ)

RMN-1H



RMN-13C

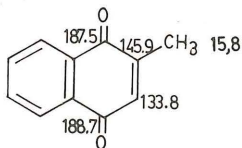
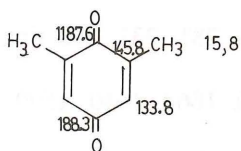
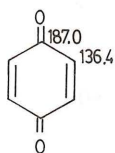
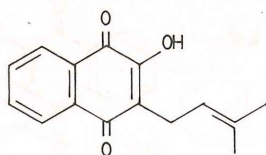


Fig. 57.- Algunas quinonas con sus valores RMN

6.3. Ejemplos de aplicación

- *Lapachol de especies de Tabebuia*¹⁴⁴

50 g de madera seca y molida de lapacho fue macerado durante 24 h con 300 mL de NaOH al 1%; al cabo de ese tiempo se le agregó HCl 6N hasta la formación de un precipitado (pH 7) el que fue separado por filtración, lavado con etanol varias veces, luego disuelto en CH₂Cl₂ y dejado recrystalizar. El proceso se repite varias veces hasta obtener cristales amarillos de lapachol (400 mg) de pf 137-139°C.



lapachol

Los datos espectroscópicos encontrados son:

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 252, 281, 331, 390 nm (Fig 58)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3360, 1660, 1640, 1590 cm⁻¹ (Fig 59)

RMN-¹H (CDCl₃, δ ppm) 8,01 (4H, m), 7,3 (1H, s), 5,1 (1H, m, J=8 Hz), 3,25 (2H, d, J=8 Hz), 1,75 y 1,54 (3H, c/u, s) (Fig 60)

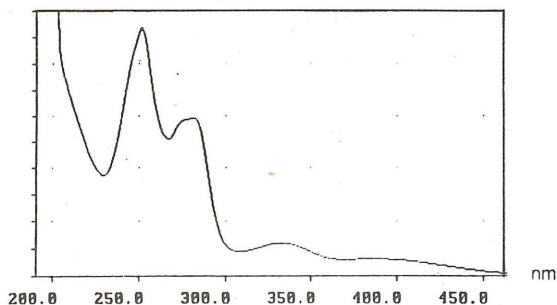


Fig. 58.- Espectro UV del lapachol

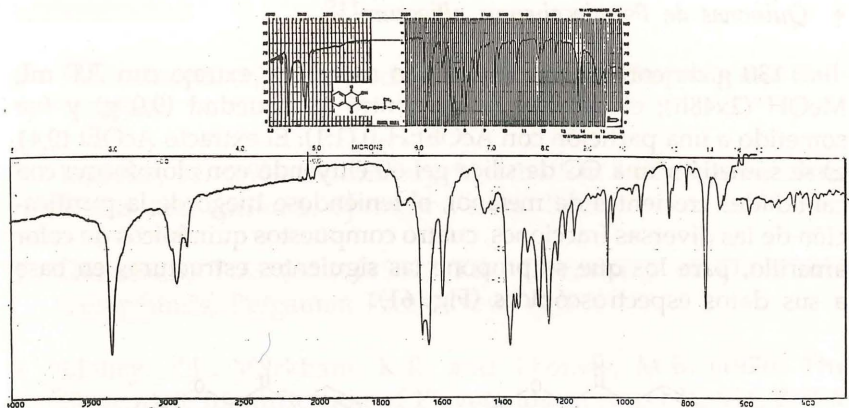


Fig. 59.- Espectro IR del lapachol

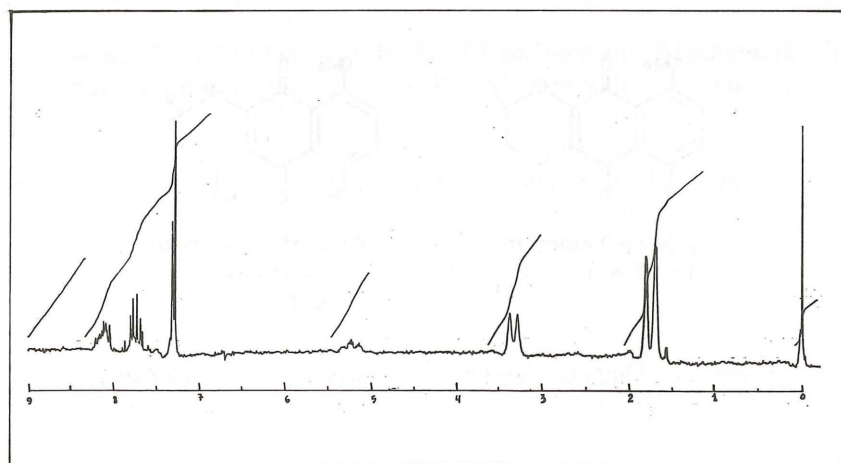
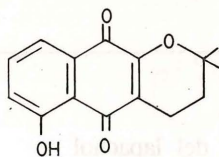


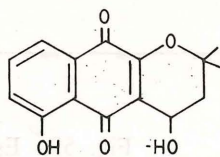
Fig. 60.- Espectro RMN-¹H del lapachol

• *Quinonas de Pseudocalymma alliaceum*¹⁴⁵

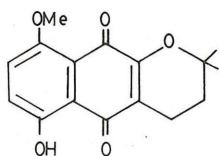
130 g de corteza y tallo de "ajo sachá" se extrajeron con 700 mL MeOH (2x48h); el extracto se concentró a sequedad (9,0 g) y fue sometido a una partición con AcOEt:H₂O (1:1). El extracto AcOEt (0,41 g) se sometió a una CC de silica gel 60 eluyendo con cloroformo con cantidades crecientes de metanol, obteniéndose luego de la purificación de las diversas fracciones, cuatro compuestos quinónicos de color amarillo, para los que se propone las siguientes estructuras en base a sus datos espectroscópicos (Fig. 61).



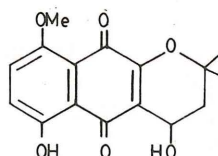
6-hidroxi- α -lapachona
(1,7 mg, pf 118.5--119.5°C)



4,6-dihidroxi- α -lapachona
(1,44 mg, pf 123-127, 5°C)



6-hidroxi-9-metoxi- α -
lapachona (1,1 mg)



4,6-dihidroxi-9-metoxi-
- α -lapachona
(1mg, pf 152-156°C)

Fig. 61.- Quinonas aisladas de *Pseudocalymma alliaceum*

REFERENCIAS

- 1 Harborne, J.B. (1973) **Phytochemical Methods**. Chapman and Hall-London.
- 2 Luckner, M. (1990) **Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and Animals**. Springer-Verlag, Berlin.
- 3 Geissman, T.A. (ed.) (1962) **The Chemistry of Flavonoid Compounds**, Pergamon Press, New York.
- 4 Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970) **The Systematic Identification of Flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin.
- 5 Harborne, J.B., Mabry, T.J. and Mabry, H. (ed.) (1975) **The Flavonoids**. Chapman and Hall, London.
- 6 Harborne, J.B. (1975) Review. Flavonoid Sulphates: A New Class of Sulfur Compounds in Higher Plants. *Phytochem.* **14**, 1147-1155.
- 7 Swain, T. (1976) Flavonoids. En: **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments** (Goodwin, T.W. eds.), Vol II. Academic Press, London.
- 8 Swain, T. (1976) Nature and Properties of Flavonoids. En: **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments** (Goodwin, T.W. eds.) Vol I. Academic Press, London.
- 9 Wollenweber, E. and Dietz, V.H. (1981) Occurrence and Distribution of Free Flavonoid Aglycones in Plants. *Phytochem.* **20**, 869-932.
- 10 Harborne, J.B. and Mabry, T.J. (ed.) (1982) **The Flavonoids. Advances in Research**. Chapman and Hall, London.
- 11 Markham, K.R. (1982) **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press, London.
- 12 Ingham, J.L. (1983) Naturally Occurring Isoflavonoids (1955-1981) En: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. (Herz, W., Grisebach, H., Kerby, G.W., eds.) Vol 43, Springer-Verlag, Wien.

- 13 Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. (ed.) (1986) **Plant Flavonoids in Biology and Medicine**. Alan R. Liss, Inc, N.Y.
- 14 Dhar, D.N. (1981) **The Chemistry of Chalcones and Related Compounds**. Wiley, New York.
- 15 Wong, E. (1976) Biosynthesis of Flavonoids. En: **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments** (Goodwin, T.W. eds.), Vol I. Academic Press, London.
- 16 Harborne, J.B. (1967) **Comparative Biochemistry of the Flavonoids**. Academic Press, New York.
- 17 Hoffmann-Bohn, K., Lotter, H., Seligmann, O., Wagner, H. (1992) Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the Leaves of *Allopyllus edulis*. *Planta Médica*, **58**, 544-548.
- 18 Gross, E.G., Pomillo, A.B. (1985) **Introducción al Estudio de los Productos Naturales**. Monografía N°30. Serie de Química OEA, Washington D.C.
- 19 Domínguez, X.A. (1973) **Métodos de Investigación Fitoquímica**. Limusa Wiley, México.
- 20 Harborne, J.B. (1959) The Chromatography of the Flavonoid Pigments. *J. Chromatogr.* **2**, 581-604.
- 21 Voirin, B. and Jay, M. (1977) Sur la Presence d'Amento Flavone chez *Tmesipteris tannensis*. *Phytochem.* **16**, 2043-2044.
- 22 Domínguez, X.A., Ramírez, R.H., Lock de Ugaz, O., García, J., Ketchan, R. (1968) Chemical Study of the Cactus *Ariocarpus retusus*. *Planta Médica* **16**, 182-183.
- 23 Markham, B., Porter, L.J. (1979) Flavonoids of the Primitive Liverwort *Takakin* and their Taxonomic and Phylogenetic Significance. *Phytochem.* **18**, 611-615.
- 24 Boulliant, M.L., Ferreres de Arce, F., Bonvin, J.F., Chopin, J., Zoll, A., et. Mathieu, G. (1979) Nouvelles C-glycosyl flavones Extraites de *Spergularia rubra*. *Phytochem.* **18**, 1043-1047.

- 25 Tschesche, R., Braun, T.M. and Sassen, W.V. (1980) Symploioside, a Flavonol Glycoside from *Symplocos uniflora*. *Phytochem.* **19**, 1825-1830.
- 26 Ghosal, S., Jaiswal, D.K. and Biswas, K. (1978) New Glycoxanthenes and Flavanone Glycosides of *Hoppea dichotoma*. *Phytochem.* **17**, 2119-2123.
- 27 Ulubelen, A., Kerr, K.M. and Mabry, T.J. (1980) New-6-hydroxyflavonoids and Their Methyl Ethers and Glycosides from *Neuroleana oaxacane*. *Phytochem.* **19**, 1761-1766.
- 28 Mues, R., Timmermann, B.N., Ohno, N. and Mabry, T.J. (1979) 6-Methoxyflavonoids from *Brickella californica*. *Phytochem.* **18**, 1379-1383.
- 29 Jay, M., Wollenweber, E. and Favre-Bonvin, J. (1979) Novel 2-Substitued Flavonols from the Farinosa Exudate of *Notholaena affinas*. *Phytochem.* **18**, 153-154.
- 30 Hostettmann Kaldas, M., et. Guillardmod, J. (1978) Xanthenes et C-glucosides Flavoniques du genre *Gentiana* (Sous genre *Gentianella*). *Phytochem.* **17**, 2083-2086.
- 31 Parker, W.H., Maze, J. and Mc Lachlan (1979) Flavonoids of *Abies amabilis* Needles. *Phytochem.* **18**, 508-510.
- 32 Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. (1984) **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography.** Springer-Verlag, Berlin.
- 33 Geiger, H. und Groot-Pfleindezer, W. (1979) Die Flavon-und Flavonol Glykoside von *Taxodium distichum*. *Phytochem.* **18**, 1709-1711.
- 34 Geiger, H., Lang, U., Britsch, E., Mabry, T.J., Suhrss-chücker, U. Vander-Velde, G. und Waldrun, H. (1978) Die Flavonglykoside von *Equisetum*. *Phytochem.* **17**, 336-337.
- 35 Karl, Ch., Pederson, P.A., Scharz, Ch. (1977) Ein neues Flavonol Acylglucosid aus *Salix viminalis*. *Phytochem.* **16**, 1117-1119.

- 36 Higuchi, R. and Donnelly, D.M.X. (1978) Acylated Flavonol Glucosides of *Pinus contorta* needles. *Phytochem.* **17**, 787-791.
- 37 Cabrera, J.L. and Juliani, H.R. (1979) Two New Quercetin Sulphates from Leaves of *Flaveria bidentis*. *Phytochem.* **18**, 510.
- 38 Ward, R.S., Pelter, A. (1974) The Analysis of Mixtures of Closely Related Naturally Occurring Organic Compounds Using High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 570-574.
- 39 Wulf, L.W., Nagel, C.W. (1976) Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids by High Pressure Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* **116**, 271-279.
- 40 Kingston, D.G.I. (1979) High Performance Liquid Chromatography of Natural Products. *J. Nat. Prod.* **42**, 237-260.
- 41 Castele, K.V., Van Sumere, C.F. (1982) Separation of Flavonoids by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* **240**, 81-94.
- 42 Daigle, D.J. and Conkerton, E.J. (1982) High Performance Liquid Chromatography of 34 Selected Flavonoids, *J. Chromatogr.* **240**, 202-205.
- 43 Daigle, D.J. and Conkerton, E.J. (1983) Analysis of Flavonoids by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **6** (Suppl. 1) 105-118.
- 44 Rouseff, R.L. and Ting, S.Y. (1979) Quantitation of Polymethoxylated Flavones in Orange Juice by High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **176**, 75-87.
- 45 Fondi, F., Kahie, Y.D. y col. (1989) Solvent Selectivity Effects in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Flavonoid Compounds. *J. of Chromatography* **461**, 281-292.
- 46 Fondi, F., Grassini-Strazza, G., Kahie, Y.D. y col. (1989) Comparison of Reversed-Phase Thin Layer and High Performance Liquid Chromatography of Flavonoid Compounds. *J. Of Chromatography* **462**, 205-207.

- 47 Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. (1986) **Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Products Isolation.** Springer-Verlag, Berlin.
- 48 Jurd, L. (1962) Spectral Properties of Flavonoid Compounds. En: **The Chemistry of Flavonoid Compounds** (Geissman, T.A., ed.) Pergamon Press, N.Y.
- 49 Jay, M., Gonnet, J.F., Wollenweber, E. and Voirin, B. (1975) Sur l'analyse Qualitative des Aglycones Flavoniques dans une Optique Chimiotaxinomique. *Phytochem.* **14**, 1605-1613.
- 50 Geissman, T.A. and Harborne, J.B. (1956) Anthochlor Pigments. XIII. The Ultraviolet Absorption Spectra of Phenolic Plant Pigments. Polyhydroxyaurones. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 832-837.
- 51 Jurd, L. and Horowitz, R.M. (1961) Spectral Studies on Flavonoid Compounds. III Polyhydroxychalcones. *J. Org. Chem.* **26**, 2561-2563.
- 52 Horowitz, R.M. and Jurd, L. (1961) Spectral Studies on Flavonoid Compounds. II Isoflavones and Flavanones. *J. Org. Chem.* **26**, 2446-2449.
- 53 Joseph-Nathan, P., Abramo-Bruno, D., Torres, Ma.A. (1981) Structural Elucidation of Polymethoxyflavones from Shift Reagent Proton NMR Measurements, *Phytochem.* **20**, 313-318.
- 54 Joseph-Nathan, P., Mares, J., Hernández, Ma.C. (1974) Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Flavone and Deuterated Analogs. *J. Mag. Reson.* **16**, 447-453.
- 55 Wenkert, E. and Gottlieb, H.E. (1977) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoid and Isoflavonoid compounds. *Phytochem.* **16**, 1811-1816.
- 56 Chari, V.M. (1981) ¹³C-NMR Spectroscopy of Flavonoid-O-and C-glycosides. Proceedings of International Bioflavonoid Symposium, Munich, FRG.

- 57 Wagner, H., Chari, V.M., Sonnenbichler, J. (1976) ^{13}C -NMR-Spektren Natürlich Vorkommender Flavonoide. *Tetrahedron Letters* **21**, 1799-1802.
- 58 Chari, V.M. and Wagner, H. (1977) Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. Proceedings of the 5th Hungarian Bioflavonoid Symposium, Matrafured, Hungary.
- 59 Agrawal, P.K., Rastogi, R.P. (1981) ^{13}C -NMR Spectroscopy of Flavonoids. *Heterocycles* **16**, 2185-2236.
- 60 Calvert, D.J., Cambie, R.C. and Davis, B.R. (1979) ^{13}C -NMR Spectra of Polymethoxy-and-Methylenedioxyflavonols. *Org. Magn. Reson.* **12**, 583-586.
- 61 Iinuma, M., Matsuura, S., Kusuda, K. (1980) ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectral Studies on Polysubstituted Flavonoids I. ^{13}C -NMR Spectra of Flavones. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 708-716.
- 62 Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H. and Mabry, T.J. (1978) Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids-III *Tetrahedron.* **34**, 1389-1397.
- 63 Ayanoglu, E., Ulubelen, A., Clark, W.D., Brown, E.K., Kerr, R.R., Mabry, T.J. (1981) Myricetin and Quercetin Methyl Ethers from *Haplopappus integerrimus* var. *Punctatus*. *Phytochem.* **20**, 1715-1717.
- 64 Costa, J., Sánchez, L., Lock de Ugaz, O., Ubillas, R., Tempesta, M. (1991) Flavonoids from *Andira inermis* Wright HBK. *Fitoterapia* **62**, 89.
- 65 Bonilla, P., Lock de Ugaz, O., Jurupe, H. (1991) Contribución al Estudio Químico-Biológico de la *Werneria dactilophylla*. *Bol. Soc. Quim. del Perú* **LVII**, 182-188.
- 66 Callo, N., Lock de Ugaz, O. (1993) Resultados no publicados.
- 67 Soine, T. (1964) Naturally Occurring Coumarins and Related Physiological Activities. *J. Pharm. Sci.* **53**, 231-264.

- 68 Cieri, V.R. (1969) Characterization of the Steam Non Volatile Residue of Bergamot Oil and Some Other Essential Oils. *J. Ass Off. Anal. Chem.* **52**, 719-728.
- 69 Murray, R.D.H., Mendez, J., Brown, S. (1982) *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons, Bristol.
- 70 Abernethy, J.L. (1969) The Historical and Current Interest in Coumarins. *J. Chem. Ed.* **46**, 561-568.
- 71 Dean, F.M. (1952) Naturally Occurring Coumarins. En: *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* (Zechmeister, L. ed.) Vol. 9. Springer-Verlag, Wien.
- 72 Dean, F.M. (1963) En: *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds* Butterworths, London.
- 73 Stanley, W.L. and Jurd, L. (1971) Citrus Coumarins. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1106-1110.
- 74 Murray, R.D.H. (1978) Naturally Occurring Plant Coumarins. En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Herz, W., Grisebach, H., Kerby, G.W., eds.) Vol 35. Springer-Verlag, Wien.
- 75 Gray, A.I., Watterman, P.G. (1978) Coumarin in the Rutaceae. *Phytochem.* **17**, 845-864.
- 76 Hernández, R., Massanet, G., Rodríguez, F., Salvá, J. (1990) 3-isoprenylcoumarins. *Phytochem.* **29**, 2053-2059.
- 77 Seshadri, T.R., Sood, M.S., Handa, K.L. and Vishwapaul (1967) Chemical Components of Roots of *Selenium vaginatum*. Coumarins of the Petroleum Ether Extract. *Tetrahedron*, **23**, 1883-1891.
- 78 Bohlman, F., Jakupovic, J. (1979) 8-Oxo- α -selenin-und neue Scopoletin-derivate aus *Conyza*-Arten. *Phytochem.* **18**, 1367-1370.
- 79 Dreyer, D.C., Lee, A. (1972) Extractions of *Geijera parviflora*. *Phytochem.* **11**, 763-767.

- 80 Harkar, S., Razdan, T.K. and Waight, E.S. (1984) Steroids, Chromone and Coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochem.* **23**, 419-426.
- 81 Borges del Castillo, J., Martinez-Martin, A.I., Luis, F.R., Rodríguez, U.J.C., Vasquez-Bueno, P. (1984) Isolation and Synthesis of two Coumarins from *Melanopodium divaricatum*. *Phytochem.* **23**, 859-861.
- 82 Stanley, W.L. and Vannier, S.H. (1957) Chemical Composition of Lemon Oil. I. Isolation of a Series of Substitued Coumarins. I. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3488-3491.
- 83 Stanley, W.L. and Vannier, S.H. (1967) Psoralens and Substitued Coumarins from Expressed Oil of Lime. *Phytochem.* **6**, 585-596.
- 84 Barik, B.R., Dey, A.K., Das, P.C., Chatterjee, A., Shoolery, J.N. (1983) Coumarins of *Murraya exotica*-Absolute Configuration of Auraptenol. *Phytochem.* **22**, 792-794.
- 85 Van Sumere, C.F., Wolf, G., Teuchy, H. and Kint, J. (1965) A New Thin Layer Method for Phenolic Substances and Coumarins. *J. Chromatogr.* **20**, 48-60.
- 86 Beyrich, T. (1964) Papier Chromatograpische Trennung von Furocoumarinen. *J. Chromatogr.* **13**, 181-187.
- 87 Swain, T. (1953) *Biochem. J.* **53**, 200.
- 88 Beyrich, T. (1965) Die Dünnschichtchromatografische Verteilung von Furocoumarinen. *J. Chromatogr.* **20**, 173-175.
- 89 Stermitz, F.D., Thomas, R.D. and Williams, M.C. (1975) Furocoumarins of *Cymopterus watsonie*. *Phytochem.* **14**, 1681.
- 90 Fisher, J.F. and Trama, L.A. (1979) High Performance Liquid Chromatographic Determination of Some Coumarins and Psoralens Found in Citrus Peels Oils. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1334-1337.
- 91 Shibata, S. and Noguchi, M. (1977) Two New Coumarins in *Boenninghausenia albiflora*. *Phytochem.* **16**, 291-293.

- 92 Swager, T.M. and Cardenilla, J.H. (1985) Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochem.* **24**, 805-813.
- 93 Hörhammer, L., Wagner, H. and Kraemer-Heydweiler, D. (1966) Neue Methoden im Pharmakognotischen Unterricht. *Dtsch. apoth. Zt.* **106**, 267-272.
- 94 Wheelock, Ch.E. (1959) The Fluorescence of Some Coumarins. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1348-1352.
- 95 Merck, E. **Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel.** Darmstadt, R.F. de Alemania.
- 96 Stahl, E., Schild, W. (1981) **Pharmazeutische Biologie. H. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen.** Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 97 Keith, R.W., Turneau, D.L., Mahlum, D. (1985) Quantitative Paper Chromatographic Determination of Phenols. *J. Chromatogr.* **1**, 534-536.
- 98 Feigl, F. (1966) **Spot Tests in Organic Analysis.** Elsevier Publishing Company, The Netherlands.
- 99 Mendez, J. and Lojo, M.I. (1969) Spectral Characterization of Coumarins and Cinnamic Acids. *Microchem. J.* **14**, 567-572.
- 100 Steck, W. and Mazureck, M. (1972) Identification of Natural Coumarins by NMR Spectroscopy. *Lloydia* **35**, 418-439.
- 101 Pozzi, H., Sánchez, E. and Comin, J. (1967) Heliettin, a New Furocoumarins from *Helietta longifoliata* Britt. *Tetrahedron* **23**, 1129-1137.
- 102 Joseph-Nathan, P., Hidalgo, J. and Abramo-Bruno, D. (1978) A New Coumarin from *Perezia multiflora*. *Phytochem.* **17**, 583-584.
- 103 Joseph-Nathan, P., Domínguez, M., Ortega, D.A. (1984) Shift Reagent $^1\text{H-NMR}$ Study of Methoxycoumarins. *J. Heterocyclic Chem.* **21**, 1141-1144.

- 104 Delle Monache, F., Cairo Valera, G., Marini-Bettolo, G.B., De Mello, J.F. and Goncalves de Lima, O. (1977) Coumarins of *Hortia arborea* II. Hortiolone and Hortinone. *Gazz. Chim. Ital.* **107**, 399-402.
- 105 Delle Monache, F., Cairo Valera, G., Sialer de Zapata, D. and Marini-Bettolo, G.B. (1977) 3-Aryl-4-Methoxycoumarins and Isoflavones from *Derris glabrescens*. *Gazz. Chim. Ital.* **107**, 403-407.
- 106 Banerjee, S.K., Gupta, B.D., Kumar, R., Atal, C.K. (1980) New Coumarins from the Umbels of *Seseli sibiricum*. *Phytochem.* **19**, 281-284.
- 107 Borges del Castillo, J., Luis, F.R. and Secundino, M. (1984) Angustifolin, a Coumarin from *Ruta angustifolia*. *Phytochem.* **23**, 2095.
- 108 Halim, A.F., Marwan, E.M., Bohlman, F. (1980) 6-Hidroxy-4-Methoxy-5-Methylcoumarins from *Gerbera jamesonii*. *Phytochem.* **19**, 2496.
- 109 Das, S., Barua, R.H., Sharma, R.P., Barua, J.N., Kulanthaivel, P. and Herz, W. (1984) 7-Methoxycoumarins from *Micromelum minutum*. *Phytochem.* **23**, 2317-2322.
- 110 Chan, K.K., Giannini, D.G., Cain, A.H., Roberts, J.D., Porter, W. and Tragger, W.F. (1977) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Coumarins and Related Compounds. *Tetrahedron* **33**, 899-906.
- 111 Günther, H., Prestien, J., Joseph-Nathan, P. (1975) Carbon-13 NMR Spectra of Coumarins and Methoxycoumarins. A Reinvestigation of Charge Density/Chemical Shift Relations. *Org. Mag. Reson.* **7**, 339-346.
- 112 Chang, C.J., Floss, H.G. (1977) Carbon-13 Magnetic Resonance Spectroscopy of Coumarins. Carbon-13-Proton Long-Range Couplings. *J. Org. Chem.* **42**, 1337-1340.

- 113 Elgamal, M.H.A., Elewa, N.H., Elkhriy, E.A.M., Duddeck, H. (1979) ^{13}C -NMR Chemical Shifts and Carbon-Proton Coupling Constants of Some Furocoumarins and Furochromones. *Phytochem.* **18**, 139-143.
- 114 Kutney, J.P., Eigendorf, G., Inaba, T. (1971) Mass Spectral Fragmentation Studies in Monomeric and Dimeric Coumarins. *Org. Mass Spectrometer* **5**, 249-263.
- 115 Fisher, J.F. and Nordby, H.E. (1965) Isolation and Spectral Characterization of Coumarins in Florida Grapefruit Peel Oil. *J. Food Sci.* **30**, 869-873.
- 116 Wagner, H. and Bladt, S. (1975) Cumarine aus Südafrikanischen Pelargonium arten. *Phytochem.* **14**, 2061-2064.
- 117 Lock de Ugaz, O., Ormachea, G. (1988) Avances en el Estudio de *Lepidophyllum tola*. *Rev. de Química PUCP* **2**, 11.
- 118 Angeles, L.R., Lock de Ugaz, O., Salked, I.C., Joseph-Nathan, P. (1984) A Coumarin from *Perezia coerulescens*. *Phytochem.* **23**, 2094-2095.
- 119 Proksch, P. and Rodríguez, E. (1983) Review: Chromenes and Benzofurans of the Asreracea, their Chemistry and Biological Significance. *Phytochem.* **22**, 2335-2348.
- 120 Lin, T.J., Ramstad, E. and Heistein, P. (1974) In vitro Biosynthesis of Isopentenylacetophenones in *Eupatorium rugosum*. *Phytochem.* **13**, 1817-1823.
- 121 Vyas, A.V. and Mulchandani, N.B. (1980) Biosynthesis of Precocenes -I y -II, Antijuvenile Hormones. *Phytochem.* **19**, 2597-2598.
- 122 González, A.G., Fraga, B.M., Hernández, M.G., García, V.P. (1982) Eupatarone, a 2-Acetilbenzofuran from *Eupatorium steinbergianum*. *Phytochem.* **21**, 1826-1827.

- 123 Budzikiewics, H., Laufenberg, G., Clark, C., Proksch, P. (1984) Benzofurans Derivatives from *Enceliopsis argophylla*. *Phytochem.* **23**, 2625-2627.
- 124 Bohlmann, F., Zdero, Ch., King, R.M., Robinson, R. (1984) Prenylated p-coumarates from *Werneria stuebelli*. *Phytochem.* **23**, 1135-1137.
- 125 Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S. and Marsella, P.A. (1976) Discovery of Insect Anti-Juvenile Hormone in Plants. *Science* **193**, 542-547.
- 126 Isman, M.B., Proksch, P. (1985) Deterrent and Insecticidal Chromenes and Benzofurans from *Encelia* (Asteraceae). *Phytochem.* **24**, 1949-1951.
- 127 Murae, T., Tanahashi, Y., Takahashi, T. (1968) 5,6-Dimethoxy-2-Isopropenylbenzofuran from *Ligularia stenocephala* Matsum et Koidz. *Tetrahedron* **24**, 2177-2181.
- 128 Herz, W. and Kumar, N. (1981) Aromatic and other Constituents of Four Verbesine species: Structure and Stereochemistry of Verbesindiol. *Phytochem.* **20**, 247-250.
- 129 Lock de Ugaz, O., Hajar, A., Borges del Castillo, J., Seligmann, O., Wagner, H. (1984) Dihydroeuparin from *Werneria ciliolata*, *Fitoterapia* **55**, 248-249.
- 130 Bjeldanes, L.F. and Geissman, T.A. (1969) Euparinoid Constituents of *Encelia californica*. *Phytochem.* **8**, 1293-1296.
- 131 Bohlman, F., Zdero,, Ch., King, R., Robinson, H. (1980) New Sesquiterpene Lactones and other Constituents from *Fitchia speciosa*. *Phytochem.* **19**, 1141-1143.
- 132 Mitsakos, A., Breuer, M., Budzikiewicz, H., Proksch, P. (1986) Benzofuran Derivatives from *Enceliopsis covillei*. *Phytochem.* **25**, 2243-2244.

- 133 Sütthfeld, R., Balza, F. and Towers, G.H.N. (1985) A Benzofuran from *Tagetes patula* Seedlings. *Phytochem.* **24**, 876-877.
- 134 Lock de Ugaz, O., Peralta, A. (1988) Benzofurano de la *Werneria ciliolata*. *Rev. Latinoamer. de Química* **19**, 71-72.
- 135 Wolfender, J.L., Hamburger, M., Msonthi, J.D., Hostettmann, K. (1991) Xanthones from *Chironia krebsii* (1991) *Phytochem.* **30**, 3625-3629.
- 136 Sordat-Diserens, I., Hamburger, M., Rogers, C., Hostettmann, K. (1992) Dimeric Xanthones from *Garcinia livingstonei*. *Phytochem.* **31**, 3589-3593.
- 137 Fujita, T., Liu, D.Y., Ueda, S., Takeda, Y. (1992) Xanthones from *Polygala tenuifolia*. *Phytochem.* **31**, 3997-4000.
- 138 Harrison, L.J., Leong, L.S., Sia, G.L., Sim, K.Y., Tan, H.T. (1993) Xanthones from *Garcinia forbesii*. *Phytochem.* **33**, 727-728.
- 139 Abou-Shoer, M., Suwanborirux, K., Habib, A.A., Ching-Je Chang, Cassidy, J.M. (1993) Xanthone and Vismiones from *Psorospermum febrifugum*. *Phytochem.* **34**, 1413-1420.
- 140 Thomson, R.H. (1971) **Naturally Occurring Quinones**. Academic Press. London.
- 141 Thomson, R.H. (1987) **Naturally Occurring Quinones III. Recent Advances**. Chapman and Hall, London.
- 142 Oliveira, A.B., Raslan, D.S., Miraglia, M., Mesquita, A., Zani, C., Ferreira, D., Maia, J. (1990) Estructura Química e Actividad Biológica de Naftoquinonas de Bignonaceas Brasileiras. *Química Nova* **13**, 302-307, y todas las referencias allí incluidas.
- 143 Grazziotin, J.D., Schapoval, E.S., Chaves, C.G., Gleye, J., Henriques, A.T. (1992) Phytochemical and Analgesic Investigation of *Tabebuia chrysantha*. *J. of Ethnopharmacology* **36**, 249-251.

- 144 Pacheco, M., Lock de Ugaz, O. (1994) Lapachol de una Especie de Tabebuia. *Revista de Química*, PUCP. En prensa.
- 145 Alvarez, C., Hubiecki, P., Lock de Ugaz, O., Elin, E. (1993) II Congreso Italo-Peruano de Etnomedicina, Lima-Perú.

IV

Alcaloides

1. GENERALIDADES

Los alcaloides constituyen el grupo mas grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos. Al año 1970 se reportaba alrededor de 5000 alcaloides aislados de aproximadamente 40 familias de plantas, principalmente de Apocinaceae (ca. 800), Papaveraceae (ca. 400), Ranunculaceae (ca. 300), Solanaceae (ca. 150), Rutaceae (ca. 250) y Rubiaceae (ca. 150)¹; al año 1990 se reporta alrededor de 7000².

Aunque no hay una definición exacta para el término alcaloide, en él se incluyen aquellas sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, que manifiestan significativa actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores; compuestos que llenan estas características, se dice que son *verdaderos alcaloides*, para diferenciarlos de los *protoalcaloides* o *aminas biológicas*, como las alquilaminas, bio-

sintetizadas también de aminoácidos, y de los *pseudoalcaloides*, aquellos que también poseen nitrógeno en un ciclo, pero no son originados por aminoácidos, por ejemplo: los derivados de purina y los esteroalcaloides³.

La función de los alcaloides en las plantas es aún no muy conocida, como ocurre con la mayoría de los productos naturales, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento, o como repelentes o atractores de insectos; el hecho que aproximadamente el 80% de las plantas no contienen alcaloides hace suponer que éstos no son vitales para los organismos vivos. Sin embargo,, por años, es conocida la acción fisiológica de muchos de ellos como los que se indican en la Tabla 14.

Tabla 1.- Principales alcaloides en el comercio. Su acción fisiológica

<i>Alcaloides</i>	<i>Acción fisiológica</i>
atropina	antiespasmódico, estimulante, analgésico
cocaína	estimulante, anestésico local, sedante
codeína	analgésico, sedante, hipnótico
emetina	emético, expectorante, antipirético, amebicida
escopolamina	hipnótico, sedante
esparteína	estimulante cardíaco, diurético
hiosciamina	hipnótico, sedante cerebral, midriático
morfina	narcótico, sedante hipnótico, analgésico
quinina	tónico, emenagogo, antiséptico, antipirético
efedrina	vasoconstrictor, asma, insuficiencia circulatoria
papaverina	relajante muscular
lobelina	expectorante, emético, estimulante respiratorio
reserpina	control de la presión alta de la sangre
tubocurarina	relajante muscular

Debido a la complejidad de estructuras que presentan los alcaloides, su nomenclatura no ha sido esquematizada y su clasificación ha sido generalmente en base a la similitud con estructuras moleculares más simples y así con clasificados, por ejemplo como alcaloides

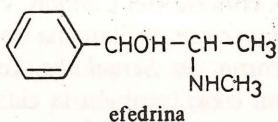
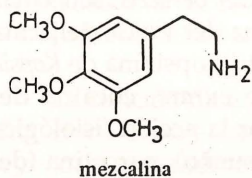
indólicos, alcaloides quinolínicos, alcaloides del tropano, etc. Otras veces son designados según su origen, género o especie de la planta, por ejemplo: papaverina del *Papaver*, berberina del *Berberis*, senecinas del *Senecio*, coniina del *Conium*, vincaleurocristina del *Vinca*, deljacina de *Delphinium ajacis*, millaurina de *Millettia laurentii*, kopsinina de *Kopsia teoi*, estricnina de *Strychnos*, tubocurarina de *curare*, cocaína del *Erytroxylum coca*; también la clasificación es por la acción fisiológica que presentan: morfina (de Morpheo, dios del sueño), narcotina (del griego narkoo, entorpecer), emetina (del griego emetiko, vomitar); o por el nombre de su descubridor, como la pelletierina de Pelletier, etc. Algunos ejemplos se dan en la figura 1.

El conocimiento de estos compuestos continúa desarrollándose y así en los últimos años se han encontrado nuevas estructuras que también muestran diversas acciones, por ejemplo: jatrofano y maitansina presentan acción antitumoral; codonopsina, cocculina y hoveína, hipotensivas; shikimianina, sedativa; carpaina, antibacterial; mitragina, analgésica; criogenina, anti-inflamatoria; foliosodina para la arritmia cardíaca; vincristina y vinblastina, antileucémicas, pilocarpina, para el tratamiento de la glaucoma, etc. (Fig. 2)⁵.

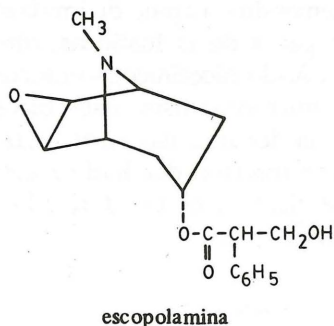
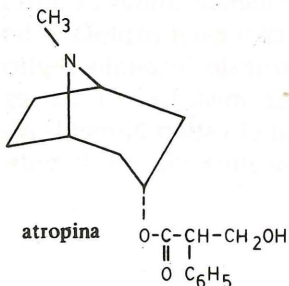
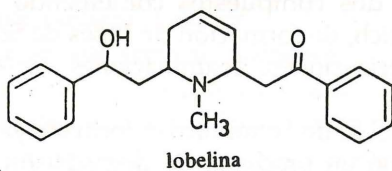
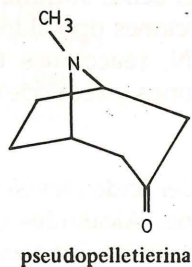
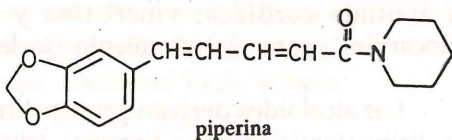
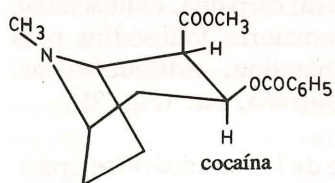
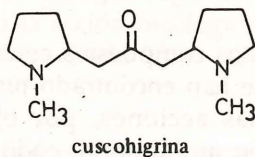
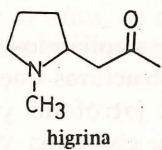
Los alcaloides derivan principalmente de los aminoácidos ornitina, lisina, fenilalanina (o tirosina), triptófano, y del ácido antranílico, a través de una serie de reacciones, entre ellas, reacciones tipo aldólica entre dos compuestos conteniendo grupos $-C=N$, reacciones tipo Mannich, de formación de bases de Schiff, oxidaciones y reducciones, isomerizaciones, deaminaciones, etc.^{2,6,7}.

El ácido antranílico es formado ya sea a partir del ácido chorísmico o como un producto de degradación del triptófano. Alcaloides conteniendo un anillo de imidazol, como la pilocarpina, son biosintetizados a partir de la histidina; otros, conteniendo anillo de piridina, como el ácido nicotínico, son formados a partir del triptófano (en animales o microorganismos aeróbicos) o a partir del 3-fosfato-D-gliceraldehído y el ácido L-aspartico (plantas superiores). La nicotina es originada por reacción del ácido nicotínico con el catión N-metil- Δ^1 -pirrolinio; la ricinina es un derivado de la nicotina via nicotamida, etc. (Fig. 3)^{2,7}.

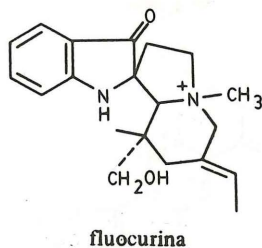
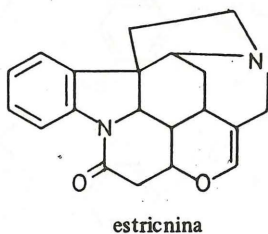
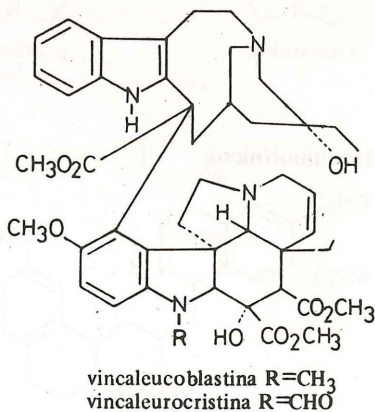
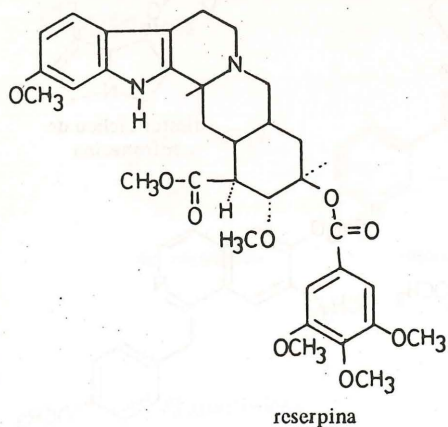
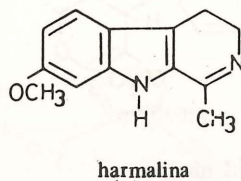
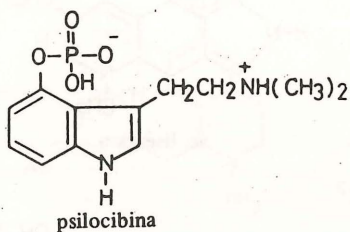
Feniletamínicos

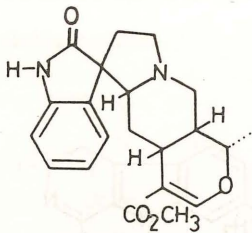


Pirrolidínicos, Piperidínicos, Alc. del tropano

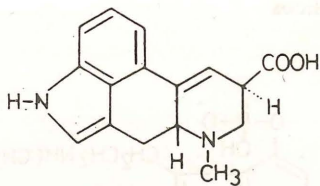


Indólicos



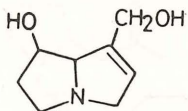


mitrafilina

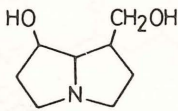


ác. lisérgico

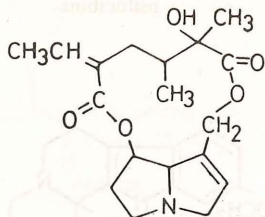
Pirrolizidínicos



retronecina

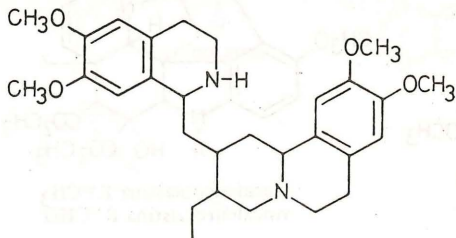


platinecina

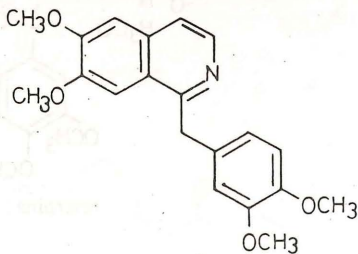


diéster cíclico de retronecina

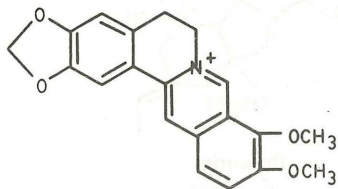
Isoquinolínicos



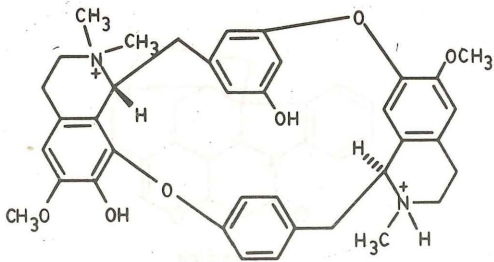
emetina



papaverina

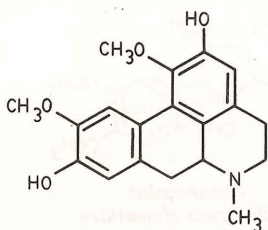


berberina



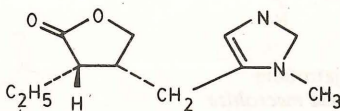
tubocurarina

Aporfínicos



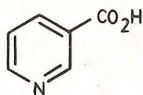
boldino

Imidazólicos

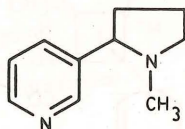


pilocarpina

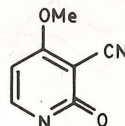
Piridinicos



ac. nicotínico

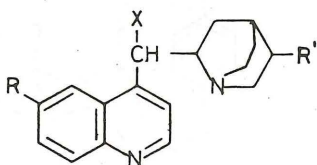


nicotina



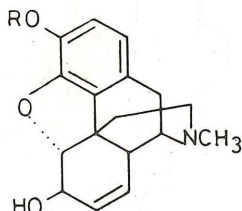
ricinina

Quinolínicos



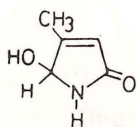
quinina X=OH, R=OCH₃, R'=CH=CH₂
cinchonidina X=OH, R=H, R'=CH=CH₂

Morfínicos

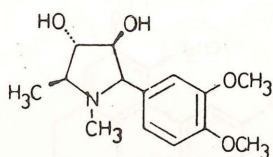


morfina R=H
codeína R=CH₃

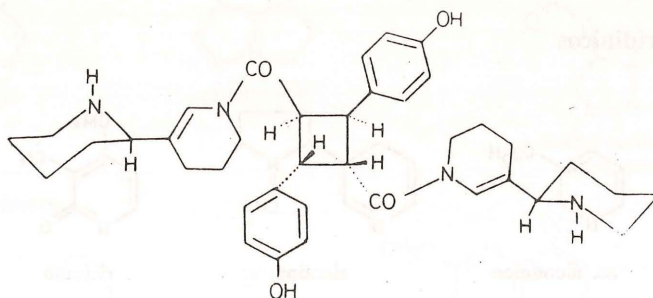
Fig. 1.- Alcaloides



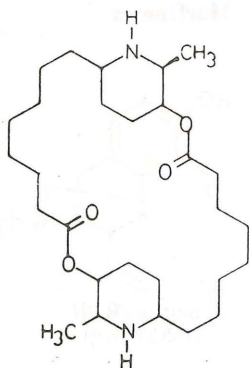
jatrofano
Jatropha macrohiza
antitumor



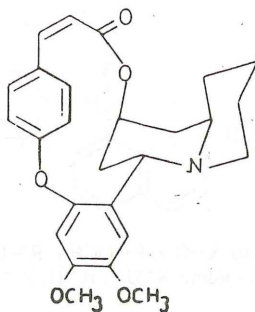
codonopsina
Codonopsis elematidea
hipotensivo



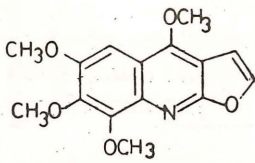
hoveína
Hovea longipes
hipotensivo



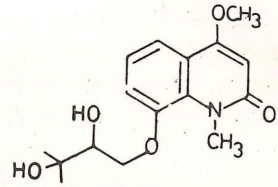
carpaína
Carica papaya
antibacterial y amoebicida



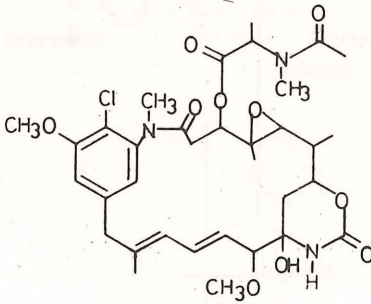
criogenina
especies de *Heimia* y *Decodon*
antiinflamatorio



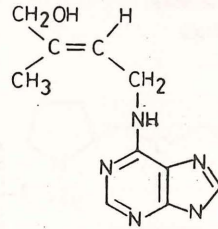
shikimianina
Fagara y *Zanthoxylum*
sedativo



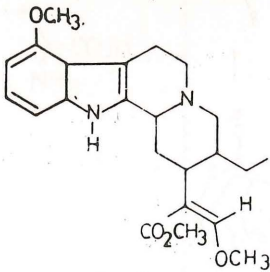
foliosodina
Haplophylum foliosum
contra arritmia cardíaca



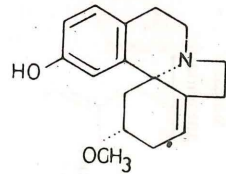
maitansina
Maytenus ovatus
antitumor y antimicótico



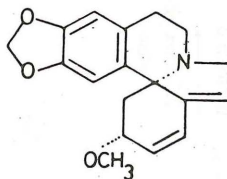
trans-zeatin
Zea mays
promotor de la división de células



mitragina
Mitragyna speciosa
analgésico



cocculina
Cocculus laurifolius
hipotensivo



eritralina
Erythrina spp.

Fig. 2.- Alcaloides con actividad farmacológica estudiadas después del año 1970

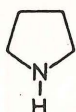
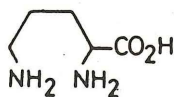
En la figura 4 se observan los núcleos básicos que originan cada uno de los precursores señalados en los párrafos anteriores, así como otros núcleos relacionados biogénicamente y un ejemplo para cada caso; el esquema biosintético para la cuscohigrina puede observarse en la figura 5.

Precursor

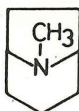
Núcleo básico y núcleos relacionados

Alcaloides tipo

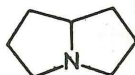
ornitina



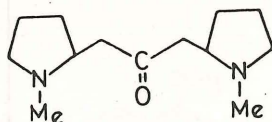
pirrolidina



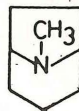
tropano



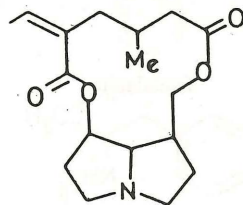
pirrolizidina



cuscohigrina

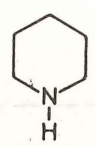
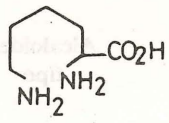


tropina

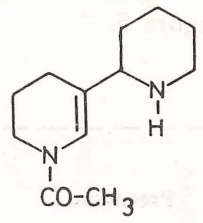


senecionina

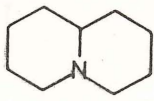
lisina



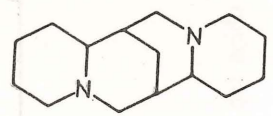
piperidina



ammodendrina

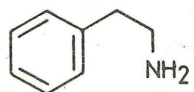
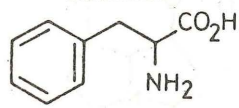


quinolizidina

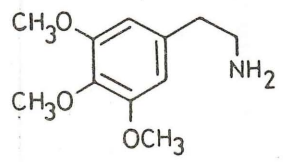


esparteína

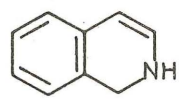
fenilalanina



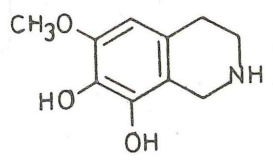
feniletilamina



mecalina



isoquinolina



anhalanina

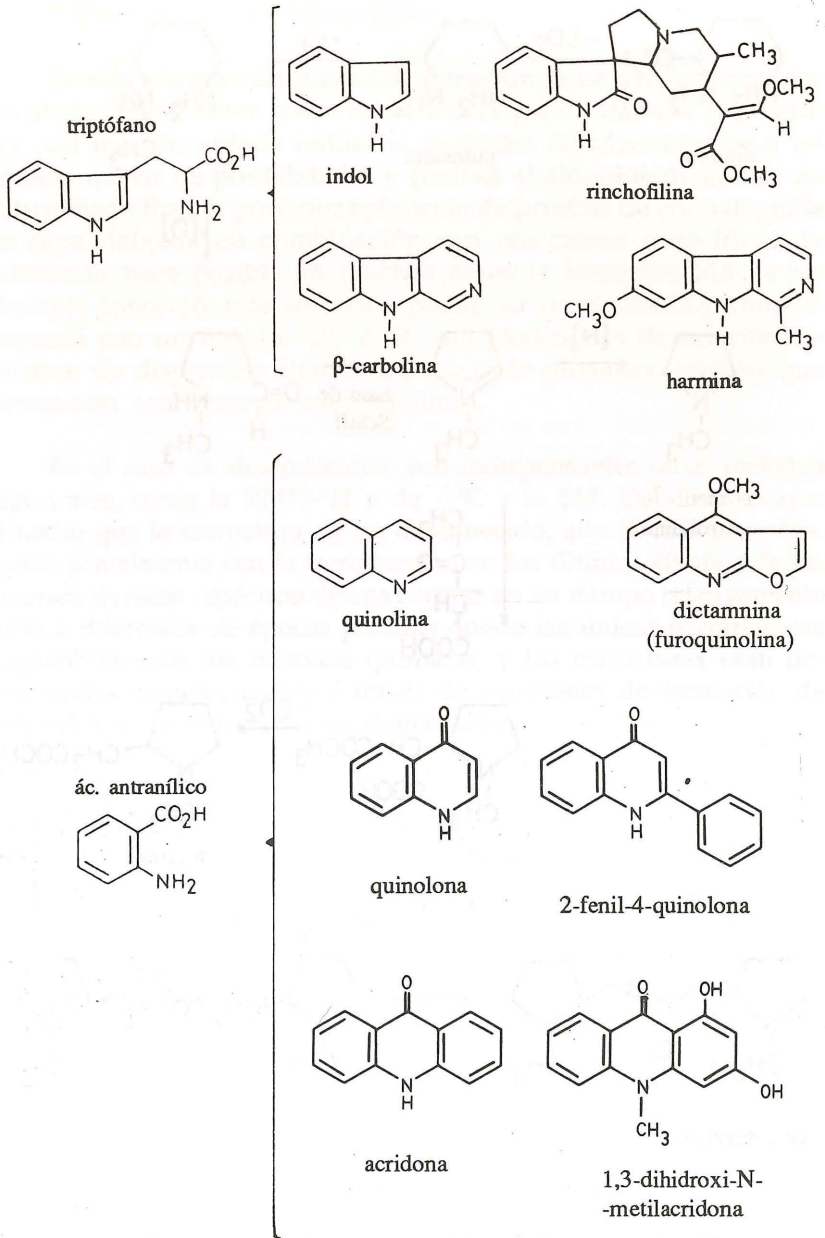


Fig. 4.- Aminoácidos y núcleos básicos que originan

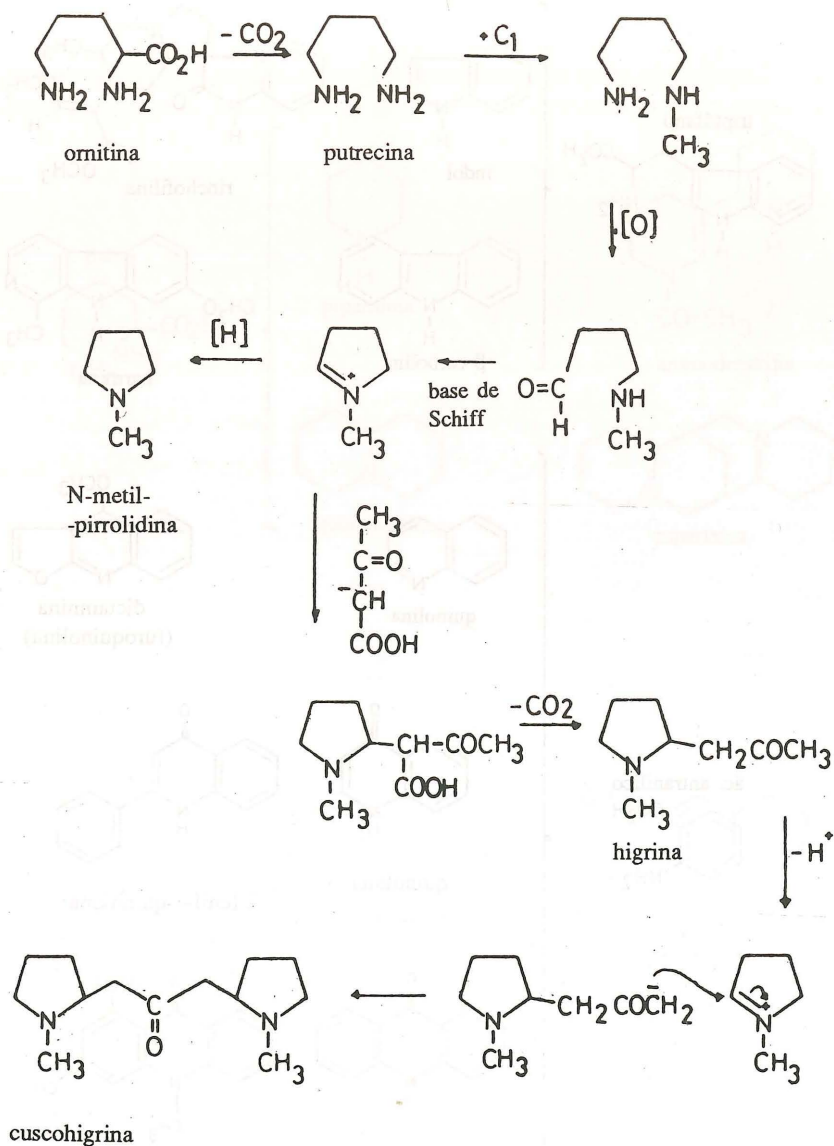


Fig. 5.- Ruta biogénica para alcaloides pirrolidínicos

2. TECNICAS RECOMENDADAS

Debido a la gran diversidad de estructuras que pueden presentar los alcaloides, el tener como referencia la planta (familia y género) del cual ha sido aislado reduce el problema de identificación a un número menor de posibilidades y clasifica al alcaloide dentro de un determinado tipo; la posterior aplicación de pruebas de cromatografía de capa delgada en combinación con reacciones específicas de coloración hace posible en muchos casos la identificación de un alcaloide conocido; esta asunción puede ser comprobada y complementada con un registro UV e IR, con mediciones de rotación específica, de dispersión rotatoria óptica o de dicroísmo circular que permitirían confirmar la estereoquímica.

En el caso de desconocidos, son indispensables otros métodos espectrales, como la RMN- ^1H y de ^{13}C y la EM. Debe remarcarse el hecho que la estructura de un desconocido, aún la más compleja, puede actualmente con la introducción en los últimos 40 años de las diversas técnicas espectroscópicas hacerse en un tiempo relativamente corto a diferencia de épocas pasadas donde las únicas herramientas disponibles eran los métodos químicos, y las estructuras eran determinadas completamente a través de reacciones de formación de derivados y de reacciones de degradación.

2.1. De extracción

Dada la importancia de los alcaloides se ha desarrollado diversos métodos para obtenerlos, resultando muchos muy particulares, lo cual no sorprende por la enorme variedad de estructuras que los caracteriza, y el amplio rango de solubilidad y de otras propiedades que presentan; sin embargo, en todos ellos se aprovecha su carácter básico para extraerlos de la planta que los contiene, siguiendo generalmente uno de los métodos que señalamos a continuación:

- usando una solución acuosa o alcohólica débilmente ácida (HCl 1N o H_2SO_4 1N, o de ácidos acético o tartárico al 10%), el extracto es luego alcalinizado con amoníaco, hidróxido de calcio o carbonato de sodio y los alcaloides así liberados, extraídos finalmente con solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, éter

etílico, entre otros, obteniéndose así el llamado "extracto crudo de alcaloides";

- liberando antes los alcaloides: humedeciendo el material con soluciones diluidas de amoníaco o carbonato de sodio, secado al aire, y extraído con solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo; el extracto orgánico se concentra y se trata con ácido diluido formando las sales de los alcaloides; se alcaliniza este extracto ácido y los alcaloides liberados se extraen con uno de los solventes inmiscibles señalados antes, teniendo así el "extracto crudo de alcaloides". En este método es algunas veces preferible desengrasar el material antes de iniciar todo el proceso.

2.2. Reacciones de coloración y de precipitación

Para la comprobación de la presencia de alcaloides se ha desarrollado también un gran número de reactivos de coloración y de precipitación; algunos de ellos son considerados de aplicación general mientras otros son de uso más específico y pueden servir para clasificaciones parciales de estas sustancias; generalmente se considera que hay presencia de alcaloides si dan reacción positiva a por lo menos 4 de estos reactivos. Son de uso general los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein^{1,8-10}. La preparación y aplicación de estos reactivos y de otros, se indican en el Apéndice.

2.3. Técnicas cromatográficas

Dentro de las técnicas cromatográficas, la CCD es la más usual utilizando principalmente silicagel G; otros adsorbentes usuales son: óxido de aluminio G, poliamida, celulosa o la misma silicagel G hecha alcalina por preparación de la placa con una solución de KOH 0,5N o NaOH 0,1N en vez de agua. Los sistemas de solventes son también muy variados, y al igual que las reacciones de coloración y de precipitación, algunos son considerados de uso general y otros han sido aplicados más específicamente como puede observarse en la Tabla 28-19.

Tabla 2.- Sistemas de solventes usuales para cromatografía de capa delgada de alcaloides

<i>Sistema</i>	<i>Aplicación</i>
En silicagel G:	
tol:EtOAc:Et ₂ NH (70:20:10)	general
EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:13,5:10)	general
MeOH:NH ₄ OH (220:3)	general
CHCl ₃ :Et ₂ NH (90:10)	alc de la corteza de quina
tol:Me ₂ CO:EtOH:NH ₃ conc (40:40:6:2)	alc. de opio
Me ₂ CO:H ₂ O:NH ₃ conc (90:7:3)	alc. de Solanaceae
HOAc:EtOH (1:3)	solanina
hept:MEK:MeOH (58:34:8)	alc. Rauwolfia
CHCl ₃ :MeOH (85:15)	alc. isoquinólico, alc. de ipecacuana, alc. del opio
n-propanol:HCO ₂ H:H ₂ O (90:1:9)	alc. de Berberis
ciclohexano:CHCl ₃ :H ₂ O glacial (45:45:10)	berberina
MEK:MeOH:NH ₃ 7,5% (6:3:1)	alc. tropano
DMF:Et ₂ NH:EtOH:HOAc glacial (1:1:6:12)	alc. tropano
Me ₂ CO:H ₂ O:NH ₃ (80:15:2)	alc. tropano
CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (45:2:0,1)	alc. indólico
bz:EtOH:NHEt ₂ (4:5:1)	alc. bisbencilisoquinolinico
bz:Me ₂ CO:NHEt ₂ (7:2:1,5:4:1)	alc. bisbencilisoquinolinico
hex:Me ₂ CO:NHEt ₂ (6:3:1)	alc. bisbencilisoquinolinico
n-propanol:NH ₃ conc. (8:2)	alc. β-carbolina
CHCl ₃ :MeOH (9:1)	alc. β-carbolina
CHCl ₃ :EtOH (9:1)	alc. de purina: cafeína, teobromina, teofilina
En silicagel G alcalino (con KOH 0,5N):	
EtOH 70%:NH ₃ 25% (99:1)	alc. tropano
En silicagel G/silicagel GF ₂₅₄ (1:1):	
CHCl ₃ :Me ₂ CO (5:4)	alc. oxindólico
CHCl ₃ :EtOH (19:1)	alc. oxindólico
CHCl ₃ :MeOH (49:1)	alc. oxindólico
Et ₂ O:EtOAc (1:1)	alc. oxindólico
En poliamida:	
ciclohexano:EtOAc:n-propanol:Me ₂ NH(300:25:9:1)	alc. de opio
En alúmina:	
CHCl ₃ :EtOH:Me ₂ CO (18:1:1)	alc. de Rauwolfia
En celulosa impregnada en DMF:	
hept:Et ₂ NH (500:1)	alc. tropano
bz:hept:CHCl ₃ :Et ₂ NH (6:5:1:0,02)	alc. tropano, alc. del opio
Et ₂ O:EtOH (95:1)	alc. tropano
hept:MEK (1:1) en atmósfera amoniaca	alc. Rauwolfia

El agente revelador de uso general es el reactivo de Dragendorff cuya aplicación produce manchas generalmente de color naranja; son reactivos más específicos, el reactivo de Ehrlich y el $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ para alcaloides indólicos, el reactivo de Marquis para la solanina, etc.²⁰.

La CCDP y la CC siguen constituyendo las técnicas más comunes para la separación de los alcaloides de los extractos crudos: los sistemas de solventes y los adsorbentes son generalmente los señalados para la CCD. Ultimamente se está generalizando el uso de Sephadex LH-20 por elución con metanol y el HPLC especialmente con columnas de fase reversa, con sistemas como metanol, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{Et}_3\text{N}$ (80:15:0,3), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:25\%\text{NH}_4\text{OH}$ (191:8:1), entre otros. La cromatografía contracorriente utiliza sistemas como $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{tol}$ (5:7:2:5), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:5\%\text{HCl}$ (5:5:3), $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (5:5:3 o 13:7:4), $\text{CHCl}_3:\text{bz}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (5: 5:7:2)²¹

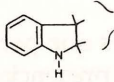
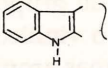
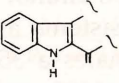
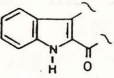
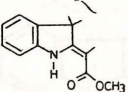
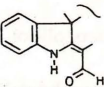
Aunque la cromatografía con fluido supercrítico (SFC) fue introducida alrededor de los años 60, es recién en los años 80 que su uso viene a ser significativo, logrando un rápido e importante avance y haciendo que actualmente su aplicación sea una necesidad en muchos laboratorios analíticos.

El SFC es un método cromatográfico instrumental similar al de CG con la diferencia que utiliza un fluido supercrítico como fase móvil, siendo el dióxido de carbono el más usual. Está actualmente siendo utilizado para separación de productos naturales, en el caso de los alcaloides ha sido aplicado para la separación de 8 alcaloides pirrolizidínicos en extractos de Senecio, de 40 alcaloides indólicos de *Catharanthus roseus*, de 6 alcaloides del opio, entre otros²².

2.4. Técnicas espectrométricas

El UV, siendo uno de los métodos espectrométricos más antiguos, es aún una herramienta útil en la identificación y elucidación estructural de los alcaloides. Hay grupos de alcaloides que no absorben en esta región como los alcaloides de pirrolidina, de piperidina y los esteroalcaloides, al menos que presenten substituyentes con grupos cromóforos; mientras, que otros debido a su naturaleza aromática presentan absorciones, las que pueden verse modificadas por la presencia de substituyentes en determinadas posiciones o por

Tabla 3.— Valores de absorción en el UV

del cromoforo indol	$\lambda_{\text{máx}}$, nm (ca)
	245
	283
	308
	315
	328
	360
de otros alcaloides	$\lambda_{\text{máx}}$, nm (en H ₂ SO ₄ 0.1 M)
berberina	228
quinina	250
estricnina	254
atropina	258
coniina	268
mezcalina	268
cocaína	275
morfina	284
codeína	284

cierta variación estructural como puede observarse en la Tabla 3 para el cromóforo indol. En la misma Tabla se dan ejemplos de otros alcaloides con sus valores de absorción^{14,23}.

En el IR los alcaloides carecen de absorciones que permiten identificarlos, pero proporciona información sobre la presencia o ausencia de ciertos grupos sustituyentes; las absorciones usualmente útiles son a $3700-3200\text{ cm}^{-1}$ para determinar presencia de grupos hidroxilo o amino; $3060-2800\text{ cm}^{-1}$ grupos metilo, metileno o vinílico; $1780-1620\text{ cm}^{-1}$ grupos carbonilo; $1600, 1550, 1500\text{ cm}^{-1}$ sistemas aromáticos, $900-800\text{ cm}^{-1}$ metoxilos y metilendioxi. Ejemplo: el alcaloide oxindólico rinchofilina, muestra señales a 3415 cm^{-1} de grupo amino, 1732 y 1708 cm^{-1} de grupo carbonilo, 1643 y 1623 cm^{-1} de sistema aromático; el alcaloide tipo carbazol glicozolidol muestra señales a 3500 cm^{-1} de grupo hidroxilo, 3440 cm^{-1} de grupo amino, 1625 y 1600 cm^{-1} de sistema aromático, 1208 cm^{-1} de éter aromático, 815 cm^{-1} de benceno sustituido, entre otros (Fig. 6)^{16,24}.

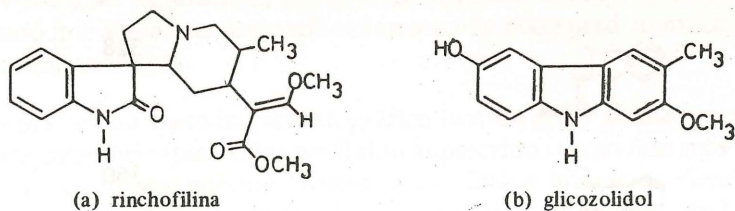
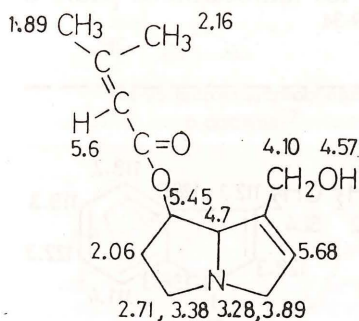


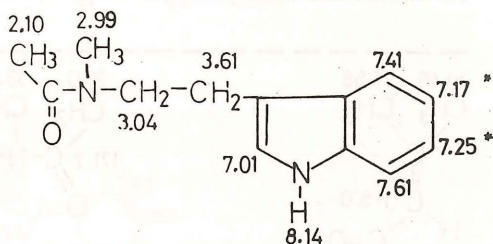
Fig. 6.- Alcaloide tipo oxindólico (a) y tipo carbazol (b)

El RMN-¹H puede también dar información directa, por los desplazamientos producidos, de la presencia de protones de ciertos grupos funcionales como aminas, hidroxilos, metoxilos, dobles enlaces y aromáticos; señales a 1,0-4,0 ppm serían indicativos de $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$, aunque en estructuras complejas, esta zona puede ser también muy compleja; a 4,0 ppm de metoxilo; a 6,0 ppm de metilendioxi; a 7,0-8,0 ppm de sistemas aromáticos y entre 7,2 y 9,2 ppm de protones heteroátomos; ejemplos: en la rinchofilina, el grupo metilo aparece a 0,77 ppm; el metoxilo unido al vinilo a 3,67 ppm, el metoxilo del éster a 3,58 ppm, los H aromáticos a 6,78-7,20 ppm, el protón vinílico a 7,21 ppm y el N-H a 8,48 ppm; en el glicozolidol, el grupo metilo

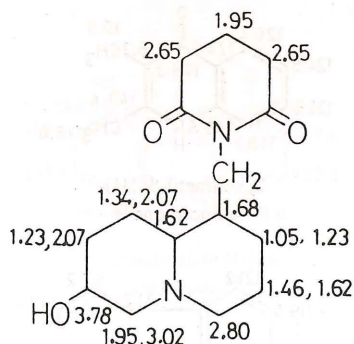
(=C-CH₃) aparece a 2,38 ppm, el metoxilo a 3,70 ppm; aromáticos entre 6,75 y 7,45 ppm; N-H a 8,0 ppm y el O-H a 10,8 ppm^{16,24}. Otros ejemplos se indican en la figura 7²⁵⁻²⁹.



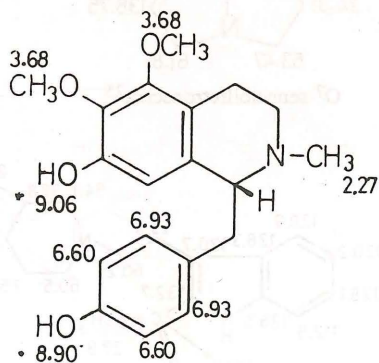
O⁷-senecioldretonecina²⁵



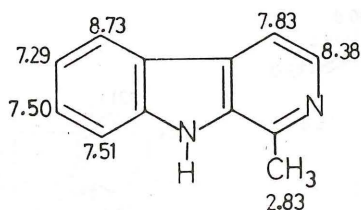
N-metil-N-acetiltriptamina²⁶



(+)-9B-hidroxiamprobolina²⁷



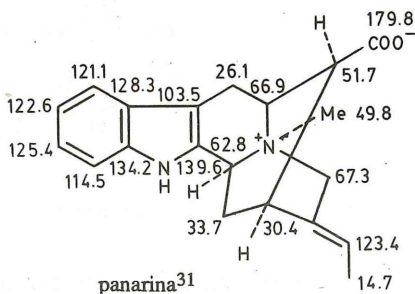
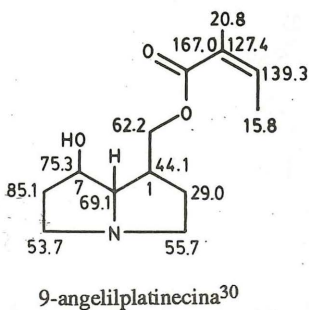
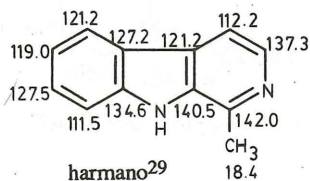
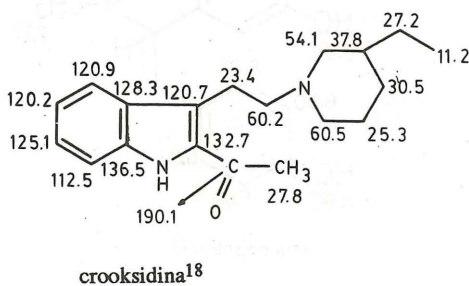
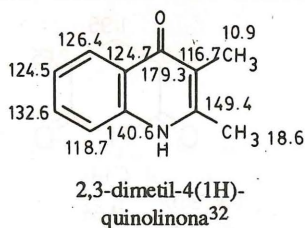
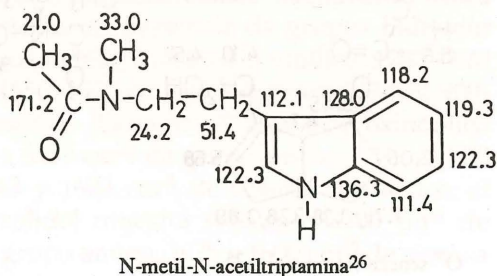
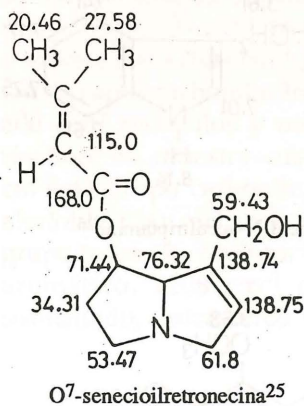
annoneliptina²⁸

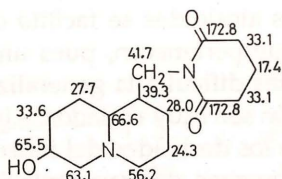


harmano²⁹

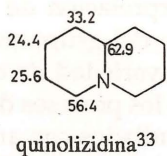
Fig. 7.- Valores de desplazamiento de RMN-¹H de algunos alcaloides

En el RMN-¹³C los desplazamientos de los diferentes carbonos de los alcaloides están dentro de los rangos correspondientes a los diferentes tipos de carbono. Una mejor correlación puede hacerse si se tienen los valores correspondientes a los hidrocarburos padre o de moléculas más simples (Fig. 8)^{25,27,29-34}.

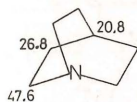




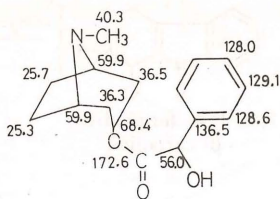
(+)-9β-hidroxilamprobolina
o cistisina²⁷



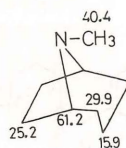
quinolizidina³³



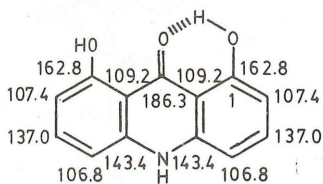
quinuclidina



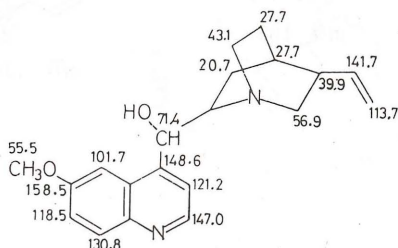
atropina



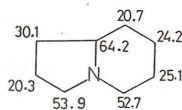
tropano



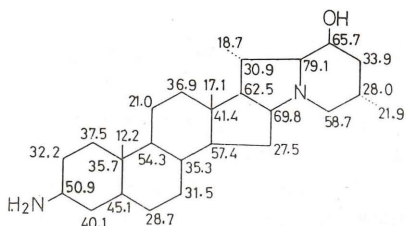
1,8-dihidroxi-9(10H)-
acridinona³²



quinina³³



indolizidina³³



solanopubamina³⁴

Fig. 8.- Valores de desplazamiento de RMN-¹³C de algunos alcaloides y de moléculas relacionadas de estructuras más simples

La interpretación de los EM de los alcaloides se facilita con el conocimiento del grupo estructural al que pertenecen, pues una vez más, la gran variedad de estas sustancias dificulta la generalización debido a que los procesos de fragmentación son muy variados. Algunos han sido estudiados con amplitud, como los derivados del indol: tipo β -carbolina o tipo oxindólico, cuyos esquemas de fragmentación se señalan en las figuras 9 y 10 respectivamente³⁵⁻³⁷.

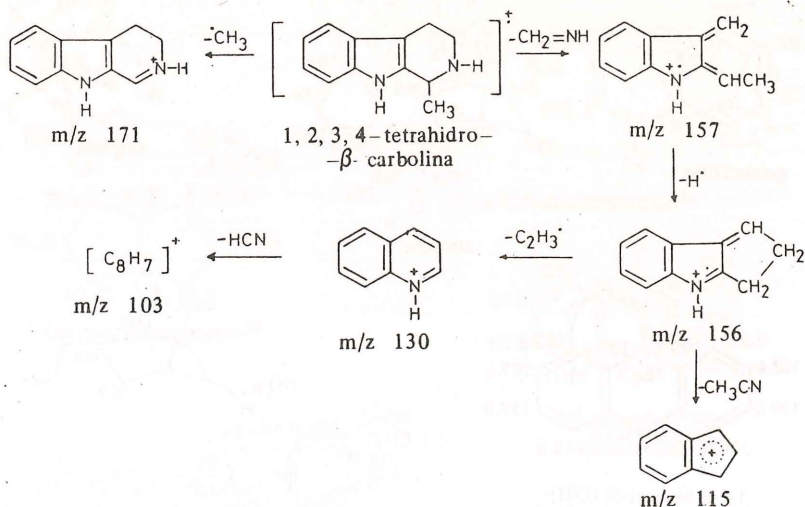


Fig. 9.- Esquema de fragmentación de un alcaloide tipo β -carbolina

2.5. Determinación cuantitativa de los alcaloides

Dada la importancia de los alcaloides, se ha desarrollado diversos métodos para cuantificarlos directamente en el material vegetal así como en un extracto bruto; el contenido se expresa como porcentaje de alcaloides totales, referido al de mayor concentración, por ejemplo: los alcaloides de la belladona se expresan como atropina, los de la coca como cocaína, los de la quina como quinina, etc.³⁸⁻⁴⁰.

A continuación se da algunos ejemplos:

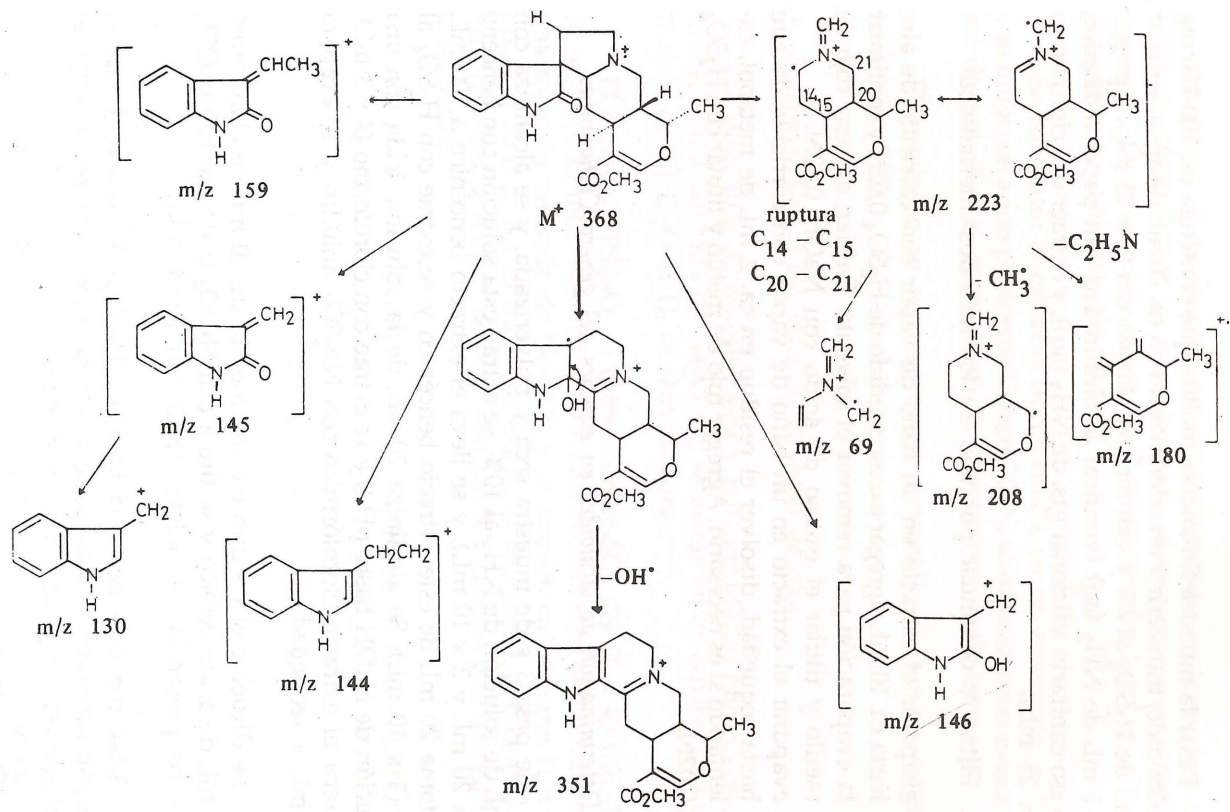


Fig. 10.- Esquema de fragmentación de un alcaloide oxindólico

- *Método general de titulación:*

Pesar la muestra finamente molida que contenga ca. 100-200 mg de alcaloide, transferir a un erlenmayer con ca. 20 mL de agua, agregar 1 mL de H_2SO_4 al 2% y extraer con cloroformo (3 x 25 mL). Agregar ca. 1 mL de NH_3 (aq) (verificar la alcalinidad con papel indicador, en caso contrario adicionar gts. de NH_3 (aq)), y extraer con cloroformo (4 x 25 mL).

Filtrar y continuar por uno de los métodos alternativos:

- a) evaporar el extracto en un baño de vapor con corriente de aire hasta ca. 10 mL, agregar exceso medido de H_2SO_4 0,02N y continuar la evaporación para remover el solvente. Enfriar, agregar rojo de metilo y titular el exceso de ácido con NaOH 0,02N.
- b) evaporar el extracto en un baño de vapor con corriente de aire hasta sequedad, disolver el residuo en ca. 2 mL de metanol, calentando si es necesario. Agregar rojo de metilo y titular con H_2SO_4 0,02N.

- *Determinación de alcaloides en especies del género Catharantus*

Se pesa 3 g de muestra seca y pulverizada, y se alcaliniza con 3 mL de solución de NH_3 al 10%, se extrae esta solución con benceno (1 x 20 mL y 2 x 10 mL), y se lleva el extracto bencénico a 100 mL. Se toma 20 mL de este extracto bencénico y se extrae con H_2SO_4 al 2% (3 x 10 mL). Se alcaliniza 20 mL de la solución ácida con una solución de NaOH hasta pH 8 y se extrae con cloroformo (4 x 5 mL). Se seca el extracto clorofórmico con Na_2SO_4 anhidro y se evapora 10 mL a sequedad.

Se disuelve el residuo en una mezcla de 10 mL de cloroformo y 5 mL de ácido acético y se titula con $HClO_4$ 0,01N en HOAc: CCl_4 (1:1), en presencia de violeta cristal como indicador.

3,544 mg de vincamina base ($C_{21}H_{26}O_3N_2$) requiere 1 mL de solución estándar; de esta manera se determina el contenido total de alcaloide en 0,2 g de planta pulverizada.

El resultado se expresa como porcentaje de vincamina.

- *Determinación de alcaloides en el Lupinus mutabilis, "tarwi":*

Se pesa 1 g de muestra seca y pulverizada, se humedece con 1 mL de KOH al 15%. La pasta formada se seca en un mortero con 3 g de Al_2O_3 y se extrae luego con 3 porciones de cloroformo hasta completar un volumen de 50 mL.

Se concentra el extracto clorofórmico, en un rotavapor, a 30°C y se titula con ácido p-toluensulfónico 0,01N, utilizando como indicador sal de potasio del éster etílico de tetrabromofenoltaleína.

El resultado se expresa como porcentaje de lupanina (peso molecular 248).

- *Determinación de alcaloides en las hojas de coca:*

Se pesa 10 g de muestra seca y pulverizada, se humedece con una solución saturada de Na_2CO_3 y se extrae en un soxlhet con una mezcla de EP:Et₂O (1:1), durante 8 horas.

El extracto EP:Et₂O, se extrae con H_2SO_4 2N (1 x 40 mL, 1 x 30 mL, 1 x 20 mL). Los extractos ácidos reunidos se alcalinizan con una solución saturada de Na_2CO_3 y se extraen con hexano (1 x 40 mL, 1 x 30 mL, 1 x 25 mL). Los extractos hexánicos, que contienen los alcaloides, se reúnen, se secan con Na_2SO_4 anhidro y se concentran a sequedad.

La mezcla sólida de alcaloides se disuelve en 30 mL de H_2SO_4 0,1N, se agrega indicador rojo de metilo y se titula con NaOH 0,1N.

El resultado se expresa como porcentaje de cocaína.

- *Determinación de alcaloides en las hojas de belladona:*

Se pesa 10 g de muestra y se humedece con una mezcla conteniendo 8 mL de NH_3 conc., 10 mL de etanol y 20 mL de éter, y se extrae luego con éter, en un soxlhet, durante 3 horas como mínimo.

El extracto obtenido se trata con H_2SO_4 0,5N; se separa la solución ácida y se alcaliniza con NH_3 , y luego es extraído con cloroformo (5

x 20 mL). Se reúnen los extractos clorofórmicos, que contienen los alcaloides, y se evaporan a sequedad.

Se disuelve el residuo en pocos mL de cloroformo, se agrega 15 mL de H_2SO_4 caliente (para expulsar el cloroformo); se enfría, se añade gotas de indicador rojo de metilo y se titula el exceso de ácido con NaOH 0,02N.

El resultado se expresa como porcentaje de atropina.

3. EJEMPLOS DE APLICACION

- Dos nuevos alcaloides oxindólicos aislados de *Hamelia patens* Jacq:

Las partes aéreas de *Hamelia patens* Jacq se refluaron en etanol obteniéndose un extracto crudo de alcaloides. La cromatografía de este extracto en silicagel 60 usando proporciones variadas de bz:EtOAc dio en las fracciones de polaridad media un alcaloide oxindólico, palmirina I, de fórmula molecular $C_{22}H_{26}N_2O_5$, de pf 101-102°C (por recristalización en MeOH:H₂O) y de $[\alpha]^{20}_{D} -56,5$; y de las fracciones eluidas con acetato de etilo, un segundo alcaloide oxindólico, rumberina II, de fórmula molecular $C_{21}H_{24}N_2O_5$, de pf 188-189°C (por recristalización en ciclohexano) y de $[\alpha]^{20}_{D} -48,0$ (Fig. 11)^{41,42}.

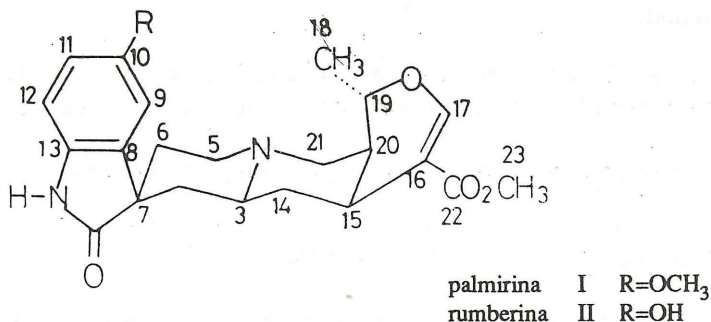


Fig. 11.- Alcaloides oxindólicos aislados de la *Hamelia patens* Jacq.)

Los datos espectroscópicos de cada uno de los alcaloides se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4.- Valores espectroscópicos de los alcaloides aislados de *Hamelia patens* Jacq.^{41,42}

<i>Palmirina</i>		<i>Rumberina</i>	
IR	$\nu_{\text{máx}}^{\text{nujol}}$ cm ⁻¹ 3300 (NH), 1720 (COOR), 1600 (CONH)	IR	$\nu_{\text{máx}}^{\text{nujol}}$ cm ⁻¹ 3300 (a. NH y OH), 1720 (COOR), 1690 (CONH)
UV	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm 312 (ε 2990), 255 (ε 24900), 220 (ε 30900)	UV	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$, nm 312 (ε 2900), 255 (ε 18100), 227 (ε 12600)
RMN- ¹ H, Me ₂ CO-d ₆ , δ ppm	1,42 (3H, d, J=7 Hz), 3,54 (3H, s), 3,72 (3H, s), 4,38 (1H, m), 6,70-7,00 (3H, sistema ABC), 7,38 (1H, s), 9,24 (1H, s.a. desaparece con D ₂ O)	RMN- ¹ H, Me ₂ CO-d ₆ , δ ppm	1,40 (3H, d, J=7 Hz), 3,56 (3H, s), 4,40 (1H, m), 6,70-7,10 (3H, sistema ABC), 7,39 (1H, s), 7,20 (1H, desaparece con D ₂ O)
EM m/z M ⁺	398 (83), 223 (100), 208 (48), 189 (18), 180 (36), 174 (37), 160 (36), 69 (57).	EM m/z M ⁺	384 (90), 223 (100), 208 (53), 180 (47), 146 (37), 69 (80).

continuación Tabla 4

RMN-¹³C

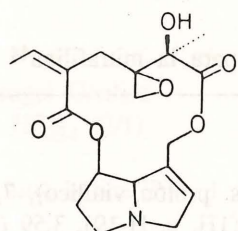
C	Palmirina	Rumberina	δ (ppm)	multiplicidad
2	181,0	181,3		s
3	72,3	72,0		d
5	53,6	53,4		t
6	34,9	34,9		t
7	17,6	57,2		s
8	135,3	134,7		s
9	109,9	112,9		d
10	156,0	152,3		d
11	112,2	114,3		d
12	111,9	109,5		d
13	133,8	133,2		s
14	30,3	30,6		t
15	30,7	30,9		d
16	110,0	110,2		s
17	155,1	155,3		d
18	18,6	18,7		c
19	71,3	71,3		d
20	38,2	37,8		d
21	54,1	54,1		t
22	167,6	167,9		s
23	51,0	51,1		c
24	55,7			c

• *Alcaloides pirrolizidínicos de especies de Senecio:*

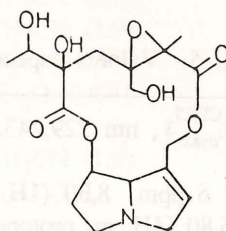
El tratamiento que se señala a continuación fue aplicado por separado a tres especies de Senecio (*S. usgorensis* Cuatr., *S. dolichodoryius* Cuatr. y *S. laricifolius*)⁴³.

Las partes aéreas secas se refluaron con Et₂O:EP:MeOH (1: 1:1) y los extractos obtenidos se trataron con HCl 2N y cloroformo. A las fases acuosas concentradas se les agregó NH₃ y los alcaloides se extrajeron con cloroformo; se separaron, otra vez, de la fase orgánica por agitación con HCl 2N y se extraen finalmente con cloroformo, luego de la adición de NH₃ conc.

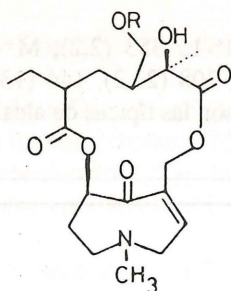
Las separaciones posteriores de los alcaloides fueron hechas por CCDP sobre silicagel, usando mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ conc. (85:14:1, 92:7:1, 94:5:1), y por HPLC-RP-8. Los compuestos aislados (Fig. 12) fueron identificados por IR, RMN- ^1H , EM, por comparación con estándares y con datos de la literatura.



epóxido de seneciofilina
(de *S. usgorensis* Cuatr.)



epóxido
(de *S. dolichodoryus* Cuatr.)



18-hidroxisenkirkina R=H
18-acetoxisenkirkina R=Ac
(de *S. laricifolius*)

Fig. 12.- Alcaloides pirrolizidínicos de especies de *Senecio*

- Alcaloide oxindólico pentacíclico de *Uncaria guianensis*, "uña de gato" o "garabato colorado":

Las hojas secas y molidas de *U. guianensis* fueron desengrasadas con benceno, luego humedecidas con NH_3 al 10% (72 horas), y finalmente maceradas con acetato de etilo (72 horas).

El extracto acetato de etilo se concentró, se extrajo con H_2SO_4 al 2% y se alcalinizó con NH_3 hasta pH 11. El precipitado formado

se separó y se trató con cloroformo; el extracto clorofórmico obtenido, de color amarillo verdoso, fue concentrado y el residuo recristalizado por varias veces en una mezcla de CHCl_3 :MeOH, obteniéndose agujas cristalinas de pf 262-263°C identificadas como mitrafilina, alcaloide oxindólico pentacíclico, en base a los datos espectroscópicos indicados en la Tabla 5⁴⁴.

Tabla 5.- Valores espectroscópicos hallados para la mitrafilina⁴⁴

UV $\lambda_{\text{máx}}^{\text{CHCl}_3}$, nm 229,243,270h 290

RMN-¹H δ ppm 8,30 (1H, s, NH), 7,40 (1H, s, protón vinílico), 7,20-6,80 (4H, m, protones aromáticos), 4,30 (1H, c, H-19), 3,59 (3H, s, COOCH₃), 3,40-1,40 (11H, m), 1,1 (3H, d, J=6 Hz, ¹⁸CH₃-H₁₉) (Fig. 13).

EM m/z M⁺ 368 (90,5), M⁺-15 353 (2,2), M⁺-OH 351 (7,2), M⁺-OMe 337 (8,7), 223 (100), 208 (23,2), 144 (13,2), 130 (24,6), 69 (84,7) (las fragmentaciones son las típicas de alcaloide oxindólico señaladas en la Fig. 10).

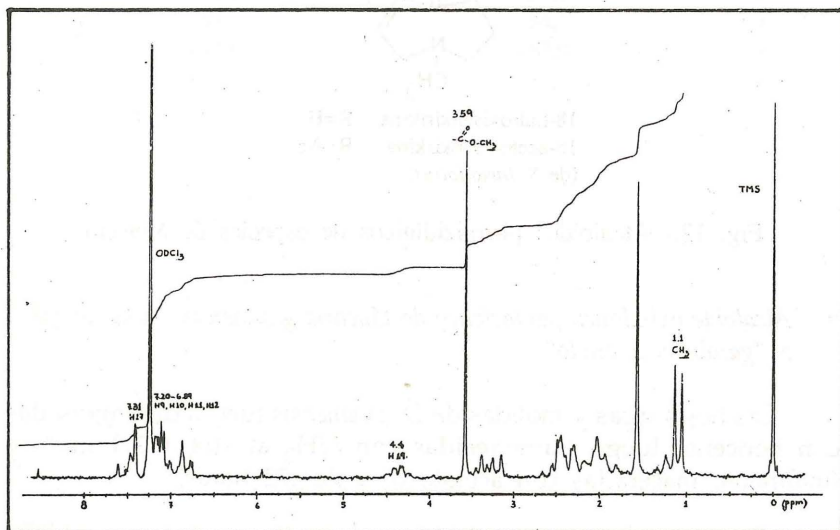


Fig. 13.- Espectro RMN-¹H de la mitrafilina

La pureza de la mitrafilina fue comprobada por diversas CCD:

Adsorbente	Sistema	R _f
silicagel GF ₂₅₄	EtOAc: isopropanol: NH ₃ conc . (16:3:1)	0,22
	CHCl ₃ :CH ₃ CN (1:9)	0,38
	MeOH:CH ₃ CN (1:9)	0,25
	Et ₂ NH:Et ₂ O (3:1)	0,20
silicagel G/silica- gel HF ₂₅₄ (2/1)	CH ₃ CN:Et ₂ O:MeOH (1:1:1)	0,75
	MeOH:CH ₃ CN (1:9)	0,54
alúmina básica Tipo 1	EtOAc:Et ₂ O (9:1)	0,48

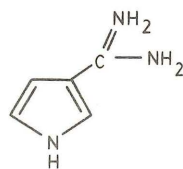
Revelador: Reactivo de Dragendorff.

• *Pirrol-3-carbamida de Brunfelsia latifolia*⁴⁵

100 g de corteza de tallo seco y molido de *B. latifolia* "chiric-sanango" se maceraron en metanol durante 15 días. El extracto metanólico se llevó a sequedad obteniendo 4,0 g del extracto seco, el que fue sometido a una partición con AcOEt:H₂O (1:1).

La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se llevó a sequedad en un rotavapor (3,5 g) y se sometió a varias CCDP en placas de silicagel 60 GF₂₅₄, por elución con el sistema CHCl₃:MeOH 90% (2:1), desorbiéndose posteriormente la zona de intensa fluorescencia azul a la luz UV₃₆₆. La fracción así obtenida se sometió a purificaciones por HPLC preparativas utilizando columnas RP₈ y sistema MeOH 5% + 0,1% TFA y recromatografiado en MeOH 80% + 0,1% TFA. La concentración de la fracción purificada (tr 2,73 min) dió lugar a la aparición de cristales incoloros (15 mg) en forma de agujas de pf 206-207°C que revela violeta con el reactivo de Erlich.

Con los datos espectroscópicos señalados en la Tabla 6 se determinó la estructura como pirrol-3-carbamida.



pirrol-3-carbamida

Tabla 6. Valores espectroscópicos encontrados para el pirrol-3-carbamida

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$, nm 234,5, 262,1 (Fig. 14)

IR ν_{\max}^{KBr} , cm^{-1} 3311, 3128, 1691, 1668, 1582, 1517, 1438, 1419, 1190, 1136, 1055, 806, 706, 677

RMN- ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm) 6,4 (1H, s), 6,8 (1H, s), 7,4 (1H, s) (Fig. 15)

EM m/z M^+ 109, 93, 66 (Fig. 16)

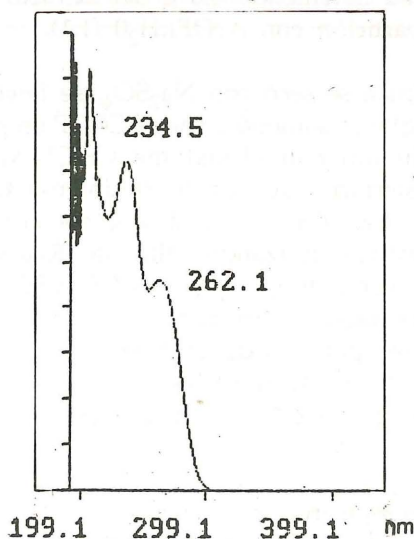
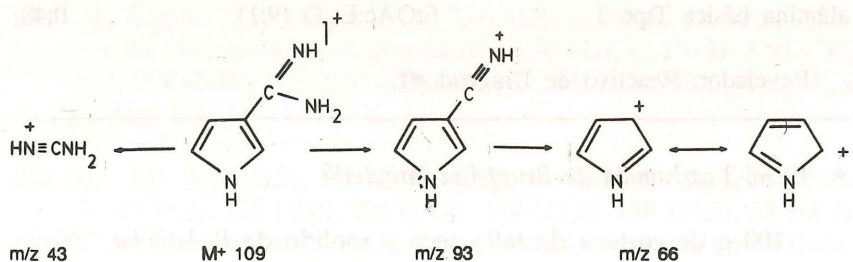


Fig. 14.- Espectro UV del pirrol-3-carbamida

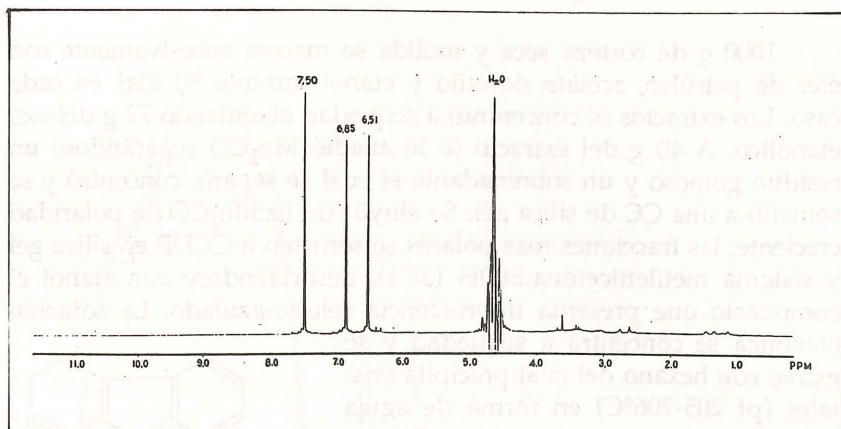


Fig. 15.- Espectro RMN- ^1H del pirrol-3-carbamida

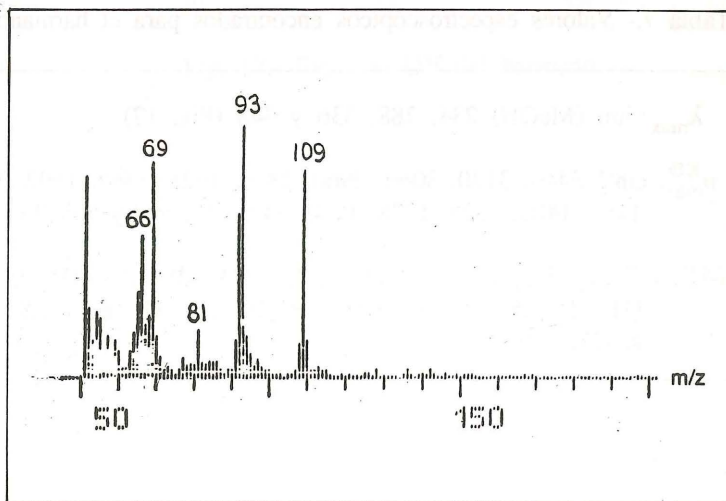
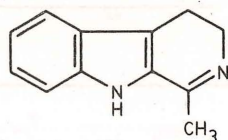


Fig. 16.- Espectro de masas del pirrol-3-carbamida

• *Harmano de Sickingia tinctoria (HBK) Schum*⁴⁶:

1000 g de corteza seca y molida se macera sucesivamente con éter de petróleo, acetato de etilo y etanol durante 30 días en cada caso. Los extractos se concentran a sequedad obteniendo 72 g del ext. etanólico. A 40 g del extracto se le añadió Me₂CO separándose un residuo gomoso y un sobrenadante el cual se separó, concentró y se sometió a una CC de silica gel. Se eluyó con bz:Me₂CO de polaridad creciente; las fracciones mas polares se someten a CCDP en silica gel y sistema metiletilcetona:EtOH (3: 1), desorbiéndose con etanol el compuesto que presenta fluorescencia celeste-azulado. La solución etanólica se concentra a sequedad y se extrae con hexano del cual precipita cristales (pf 205-206°C) en forma de aguja color amarillento, que se identificaron como harmano de acuerdo a los datos espectroscópicos reportados en la Tabla 7.



harmano

Tabla 7.- Valores espectroscópicos encontrados para el harmano

UV	λ_{\max} , nm (MeOH)	234, 288, 336 y 348 (Fig. 17).
IR	ν_{\max}^{KBr} , cm ⁻¹	3440, 3130, 3060, 2960, 2870, 1625, 1565, 1502, 1475, 1455, 1405, 1328, 1288, 1240, 745, 640, 590 y 565 (Fig. 18).
RMN- ¹ H:	(CDCl ₃ , δ ppm)	8,57 (1H, s), 8,40 (1H, d), 8,08 (1H, d), 7,85 (1H, d), 7,52 (1H, s), 7,51 (1H, d), 7,30 (1H, m) y 2,83 (3H, s) (Fig. 19).

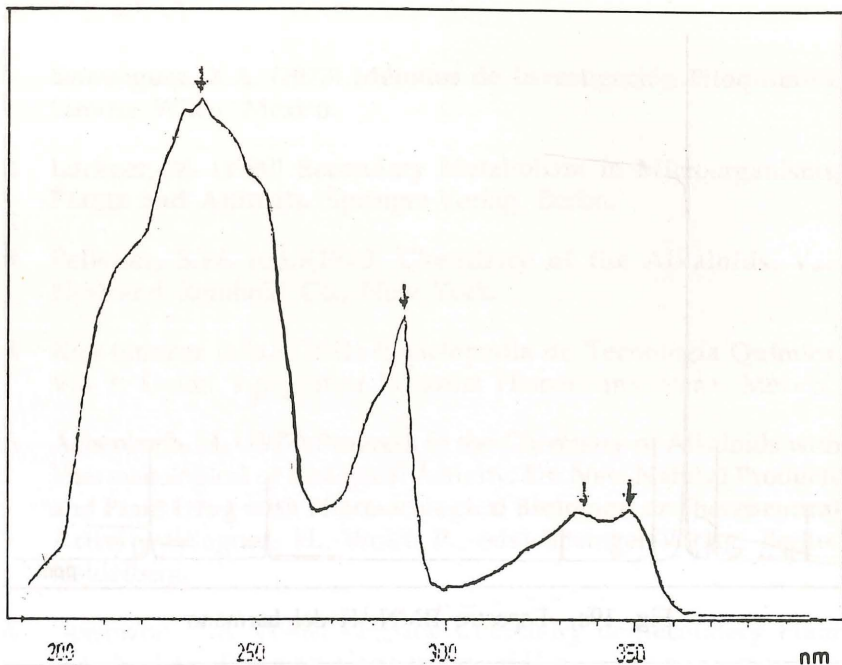


Fig. 17.- Espectro UV del harmano

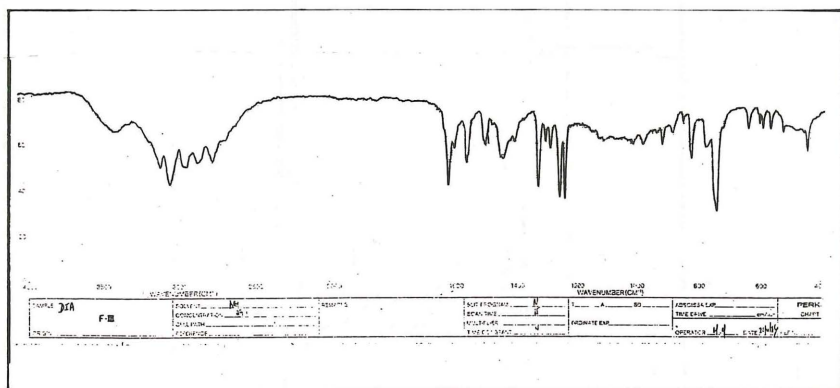


Fig. 18.- Espectro IR del harmano

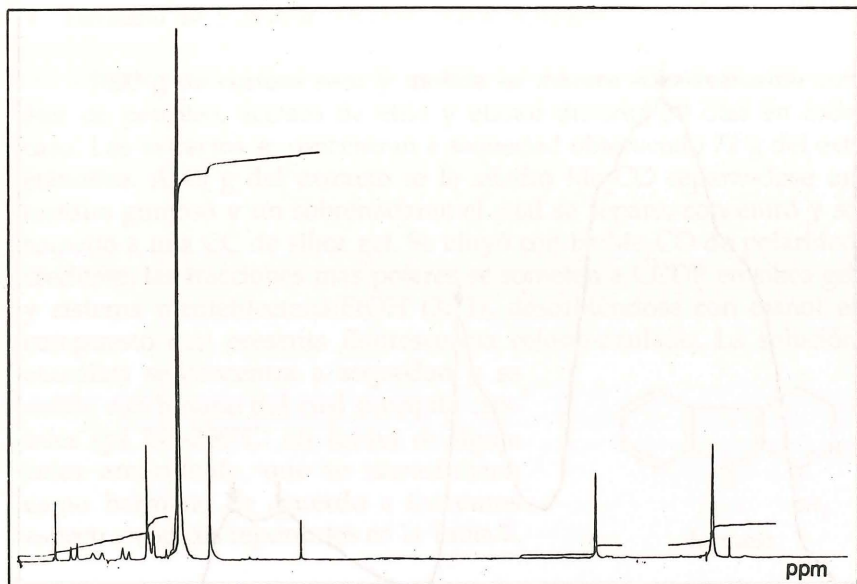


Fig. 19a.- Espectro RMN- ^1H del hermano

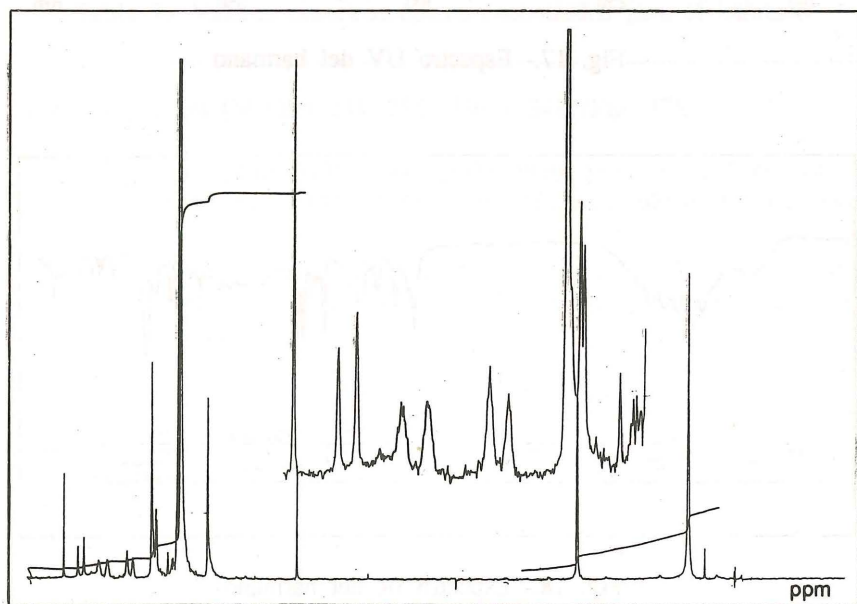


Fig. 19b.- Espectro ampliado de RMN- ^1H del hermano

REFERENCIAS

- 1 Domínguez, X.A. (1973) **Métodos de Investigación Fitoquímica**. Limusa Wiley, México.
- 2 Luckner, M. (1990) **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals**. Springer-Verlag, Berlin.
- 3 Pelletier, S.W. (ed.) (1970) **Chemistry of the Alkaloids**. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- 4 Kirk-Othmer (eds.) (1961) **Enciclopedia de Tecnología Química**. Vol 1. Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana, México.
- 5 Achenbach, H. (1977) Progress in the Chemistry of Alkaloids with Pharmacological or Biological Activity. En: **New Natural Products and Plant Drug with Pharmacological Biological or Therapeutical Activity** (Wagner, H., Wolff, P., eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- 6 Geismann, T.A. (1969) **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. Freeman Cooper Co., E.U.A.
- 7 Mann, J. (1987) **Secondary Metabolism**. Clarendon Press. Oxford Chemistry Series. U.S.A.
- 8 Overton, K.H. (1963) Isolation and Purification. En: **Elucidation of Structures by Physical and Chemical Methods**, Vol XI de Techniques of Organic Chemistry. Interscience Publisher, New York.
- 9 Gibaja, S. (1977) **Guía para el Análisis de los Compuestos de Carbono**. Ed. UNMSM, Perú.
- 10 Stahl, E., Schild, W. (1981) **Pharmazeutische Biologie**. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 11 Wagner, H., Blatt, S., Zgainsky, E.M. (1984) **Plant Drug Analysis**. Springer-Verlag, Berlin.
- 12 Randerath, K. (1978) **Cromatografía de Capa Fina**. Enciclopedia de Química Industrial. Tomo 8. Ed. Urmo, Bilbao.

- 13 Macek, K., Haller, A. (1975) Chromatography of Drugs. En: **Chromatography** (Heftmann, ed.) Van-Nostrand Reinhold Co., New York.
- 14 Harborne, J.B. (1973) **Phytochemical Methods**. Chapman and Hall, London.
- 15 Mc Isaac, N.M., Ho, B.T., Estevez, V., Powers, D. (1967) Chromatography of β -Carbolines. *J. Chromatogr.* **31**, 446-454.
- 16 Trager, W.F., Lee, C.M., Phillipson, J.D., Haddock, R.E., Dwumabadu and Beckett, A.H. (1968) Configurational Analysis of Rhynchophylline-Type Oxindole Alkaloids. *Phytochem.* **24**, 523-543.
- 17 Christen, P., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., Evans, W.C. (1993) Alkaloids of *Erythroxylum zambesiacum* Stem-bark. *Phytochem.* **34**, 1147-1151.
- 18 Mrove, M.A., Ghuman, M.A., Alam, M. (1993) Crooksidine, an Indole Alkaloid from *Haplophyton crooksii*. *Phytochem.* **33**, 217-219.
- 19 Xian-Kaiwang, Tong-Fang Zhao, Sheng Lai, Yoshikazu Shizuri and Shosuke Yamamura (1993) Head to Tail Bizbencilisoquinoline Alkaloids from *Cydea sutchuenensis*. *Phytochem.* **32**, 1253-1256.
- 20 Merck, E. Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel. Reactivos Merck, Darmstadt, R.F.A.
- 21 Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. (1986) **Preparative Chromatography Techniques**. Springer-Verlag, Berlin.
- 22 Foley, J.P., Crow, J.A. (1991) Supercritical Fluid Chromatography for the Analysis of Natural Products. En: **Modern Phytochemical Methods** (Fischer, N.H., Isman, M.B., Stafford, H.A., ed.) Plenum Press, N.Y.
- 23 Verpoorte, R. (1986) Methods for the Structure Elucidation of Alkaloids. *J. of Nat. Prod.* **49**, 1-25.

- 24 Bhattacharyya, P., Chakrabartty, P.K. and Chowdhury, B.K. (1985) Glycozolidol, an Antibacterial Carbazole Alkaloid from *Glycomis pentaphylla*. *Phytochem.* **24**, 882-883.
- 25 Roeder, E., Widenfeld, H., Britz-Kirstgen, R. (1985) Pirrolizidine Alkaloids from *Senecio cacaliaster*. *Phytochem.* **23**, 1761-1763.
- 26 Kawanishi, K., Uhara, Y. and Hashimoto, Y. (1985) Alkaloids from the Hallucinogenic Plant *Virola sebifera*. *Phytochem.* **24**, 1373-1375.
- 27 Asres, K., Gibbons, W.A., Phillipson, J.D., Mascagani, P. (1986) The Alkaloids of *Sophora velutina*. *J. of Nat. Prod.* **49**, 117-121.
- 28 Sandoval, D., Preiss, A., Schreiber, K., Ripperger, H. (1985) Annonelliptine, an Alkaloid from *Annona elliptica*. *Phytochem.* **24**, 375-376.
- 29 Coune, C.A., Angenot, J.G., Denoel, J. (1980) ¹³C NMR des Alcaloides Strychnos Les Derives de L'Harman et De L' Usambarensine. *Phytochem.* **19**, 2009-2011.
- 30 Grue, M.R., Liddell, J.R. (1993) Pirrolizidin Alkaloids from *Senecio chrysocoma*. *Phytochem.* **33**, 1517-1519.
- 31 Quetin-Leclerq, Angenot, L., Dupont, L., Bisset, N.G. (1988) Isolation and Purification of Panarine, an Alkaloid from a Venezuelan curare. *Phytochem.* **27**, 4002-4004.
- 32 Ashan, M., Gray, H.I., Leach, G., Waterman, P.G. (1993) Quinolone and Acridone Alkaloids from *Boronia lanceolata*. *Phytochem.* **33**, 1507-1510.
- 33 Breitmaier, E., Voelter, W. (1978) ¹³C NMR Spectroscopy. Verlag Chemie, Weinheim.
- 34 Krishna, G.N.K., Mohan, L.J., Raja, K.V., Prakasa, N.S., Kaneko, K. (1985) Solanopubamine, a Steroidal Alkaloid from *Solanum pubescens*. *Phytochem.* **24**, 1369-1371.
- 35 Shoemaker, D.W. and Bidder, T.G., Boettger, H.G., Cummins, J.T. and Evans, M. (1979) Combined Gas Chromatography and Mass Spectrometry of Aromatic β -carboline. *Chromatogr.* **11**, 159-164.

- 36 Gilbert, B., Aguayo Brissolese, J., Finch, N., Taylor, W.I., Budzikiewicz, H., Wilson, J.M. and Djerassi, C. (1963) Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems XX. Carapanaubine, a New Alkaloid from *Aspidosperma carapanauba* and Some Observations of Mass Spectra of Oxindole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 20, 1523-1527.
- 37 Shamma, M. and Foley, K.F. (1967) Mass Spectrometry and the Stereochemistry of the Pentacyclic Oxindole Alkaloids. *J. Org. Chem.* 32, 4141-4142.
- 38 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1980), (Horwitz, W. ed.) 30th ed., E.U.A.
- 39 The United States Pharmacopeia, USP (1980) 20th ed., E.U.A.
- 40 Gyenes, L. (1967) *Titration in Non Aquos Media*. Akademiai Kiadó, Budapest.
- 41 Borges, J., Manresa, M.T., Martin, R.J.L., Pascual, C., Rumbero, A. (1979) Two New Oxindole Alkaloids Isolated from *Hamelia patters* Jacq. *Tetrahedron Letters*, 34, 3197-3200.
- 42 Borges, J. Comunicación personal.
- 43 Bohlman, F., Zdero, Ch., Jakupovic, J., Grenz, M., Castro, V., King, R.M., Robinson, H., Vincent, L.P.D. (1986) Further Pirrolizidine Alkaloids and Furoeremophilanes from *Senecio* species. *Phytochem.* 25, 1151-1159.
- 44 Lock de Ugaz, O., Sánchez, O., Alvarez, C. (1988) *Revista de Química*, PUCP, 2, 11.
- 45 Tavera, L., Alvarez, C., Elin, E., Lock de Ugaz, O. (1993) Pirrol-3-carbamida de *Brunfelsia latifolia*. XVIII Congreso Peruano de Química.
- 46 Infantes, D., Lock de Ugaz, O. (1993). En prensa.

Reactivos de colocación para radiografía
de cara bucal

APENDICES

1

Reactivos de coloración para cromatografía de capa delgada

1. GENERAL

1.1. *Acido sulfúrico*

- A. solución de ácido sulfúrico al 50% en etanol, o
B. ácido sulfúrico concentrado (no utilizable para cromatografía de papel).
- Aspersar y calentar 3-5 min. a 100°C. Evaluar a la luz Vis o a la luz UV 365 nm.
- Detección: reactivo universal.

1.2. *Permanganato de potasio-ácido sulfúrico*

- 0,5 g de permanganato de potasio se disuelven en 15 mL de ácido sulfúrico.
Precaución: peligro de explosión por la formación de heptósido de manganeso.
- Detección: reactivo universal.

1.3. *Permanganato de potasio neutro*

- Solución acuosa de permanganato de potasio al 0,5% (o en otras concentraciones).
- Detección: compuestos fácilmente oxidables.

1.4. *Permanganato de potasio alcalino*

- Sol. *a*: solución acuosa de permanganato de potasio al 1%.
Sol. *b*: solución acuosa de carbonato de sodio al 5%. Mezclar volúmenes iguales de *a* y *b*.
- Detección: sustancias reductoras.

1.5. *Reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina*

- 0,1 g de 2,4-DNFH se disuelve en 100 mL de metanol seguido por adición de 1 mL de ácido clorhídrico al 36%.
- Aspersar y evaluar en el Vis.
- Detección: aldehídos y cetonas.

1.6. *Reactivo yodo*

- Colocar aproximadamente 10 g de yodo en una cámara.
- Evaluar en el Vis.
- Detección: compuestos con doble enlaces conjugados.

2. TERPENOIDES Y ESTEROIDES

2.1. *Acido 3,5-dinitrobenzoico (reactivo de Kedde)*

- 1 g de ácido 3,5-dinitrobenzoico se disuelve en una mezcla de 50 mL de metanol y 50 mL de solución de KOH 2N.
- Aspersar y evaluar en el Vis. Manchas violeta-azuladas.
- Detección: glicósidos cardíacos.

2.2. *Acido 3,5-dinitrobenzoico (reactivo de Kedde) (método alternativo)*

- Sol. *a*: solución de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2% en metanol).

Sol. *b*: 5,7 g de KOH se disuelven y completan a 100 mL con metanol.

- Pulverizar primero con solución *a* y luego exceso de *b*. Observar manchas violeta-azuladas.
- Detección: glicósidos cardíacos:

2.3. *Acido fosfomolibdico*

- Solución etanólica al 20% de ácido fosfomolibdico.
- Aspersar y calentar a 100°C por 5 min.
- Detección: aceites esenciales.

2.4. *Acido 2,4,6-trinitrobenzoico*

- Sol. *a*: solución de ácido trinitrobenzoico (0,1% de una mezcla de dimetilformamida-agua).
Sol. *b*: solución de Na_2CO_3 (5% en agua).
Sol. *c*: solución de dihidrogenosulfato sódico (5% en agua).
- Pulverizar sucesivamente con *a* y luego con *b*, calentar 4-5 min. a 100°C, después enfriar, pulverizar con *c*. Manchas rojo-anaranjadas.
- Detección: glicósidos cardíacos.

2.5. *Aldehido cinámico-anhidrido acético-acido sulfúrico*

- Sol. *a*: solución de aldehído cinámico (1% en etanol).
Sol. *b*: mezclar 12 vol. de anhidrido acético y 1 vol. de ácido sulfúrico conc. Preparar poco antes de su uso.
- Pulverizar con *a*, secar 5 min. a 90°C y pulverizar con *b*. Se deja actuar *b* 1-2 min. a temperatura ambiente y luego calentar a 90°C hasta que aparezcan manchas coloreadas.
- Detección: sapogeninas esteroidales.

2.6. *Anisaldehído-ácido sulfúrico*

- 0,5 mL de anisaldehído se mezcla con 10 mL de ácido acético glacial, seguido por 85 mL de metanol y 5 mL de H_2SO_4 conc. (en ese orden) (el reactivo es de limitada estabilidad, por ello descartar si el color se torna violeta).

- Aspersar la placa, calentar a 100°C por 5-10 min. y evaluar el Vis o UV-365 nm.
En el visible los componentes de los aceites esenciales muestran coloraciones intensas: azul, verde, roja y marrón; algunos compuestos fluorescen bajo UV-365 nm.
- Detección: aceites esenciales, saponinas, principios amargos, etc.

2.7. Anisaldehído-ácido sulfúrico

- Solución recién preparada de 0,5 mL de anisaldehído en 50 mL de HOAc glacial, con adición de 1 mL de H₂SO₄ conc.
- Aspersar y calentar a 100-105°C. Colores violeta, azul, roja, gris o verde. Evaluar en Vis o UV-365 nm.
- Detección: azúcares, esteroides y terpenos.

2.8. Cloruro de antimonio (III)-ácido acético

- 20 g de cloruro de antimonio (III) en una mezcla de 20 mL de ácido acético glacial y 60 mL de cloroformo.
- Aspersar y calentar 5 min. a 100°C. Coloración amarillo-rojiza hasta azul-violeta. Observar también a la luz UV-365 nm.
- Detección: diterpenos y esteroides.

2.9. Cloruro de antimonio (V)

- Mezclar 2 vol. de cloruro de antimonio (V) con 8 vol. de tetracloruro de carbono o cloroformo (preparar poco antes de su uso).
- Aspersar y calentar a 120°C hasta que aparezcan las manchas. Observar también a la luz UV-365 nm.
- Detección: terpenos, saponinas esteroides.

2.10. Cloruro de zinc

- Disolver 30 g de cloruro de zinc completando a 100 mL con metanol y filtrar.
- Aspersar y calentar 5-10 min. a 105°C. Fluorescencia a la luz UV de onda larga. Observar manchas.
- Detección: saponinas esteroidales.

2.11. 4-hidroxibenzaldehído-ácido sulfúrico (reactivo de Komarowsky)

- Sol. *a*: ácido sulfúrico al 50%.
Sol. *b*: solución de 4-hidroxibenzaldehído al 2% en metanol. Poco antes de su uso se mezclan 5 mL de *a* con 50 mL de *b*.
- Aspersar y calentar 3-4 min. a 105°C ó 10 min. a 60°C. Manchas amarillas a rosadas.
- Detección: sapogeninas y corticoesteroides.

2.12. Paraformaldehído-ácido fosfórico

- Disolver agitando a temperatura ambiente, 0,30 g de paraformaldehído en 100 mL de ácido fosfórico (85%).
- Detección: esteroalcaloides de *Solanum* y sapogeninas esteroidales.

2.13. Reactivo de Carr-Price

- Solución saturada de cloruro de antimonio (III) en cloroformo o tetracloruro de carbono.
- Aspersar y calentar 10 min. a 100°C. Observar también a la luz UV-365 nm.
- Detección: carotenoides, sapogeninas y glicósidos esteroidales, derivados terpénicos, vitaminas A y D.

2.14. Reactivo de Liebermann-Burchard

- Mezclar 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico conc.. Esta mezcla se agrega con cuidado y enfriando, a 50 mL de etanol (preparar poco antes de su uso).
- Aspersar y calentar 10 min. a 110°C. Mancha fluorescente a la luz UV-365 nm.
- Detección: Δ^5 -3-esteroides; otros esteroides y glicósidos triterpénicos.

2.15. Sulfato de cerio (IV)-ácido sulfúrico

- Solución saturada de sulfato de cerio (IV) en ácido sulfúrico 65%.

- Calentar 15 min. a 120°C (no usar sobre capas de óxido de aluminio).
- Detección: esteroalcaloides del *Solanum* y sapogeninas esteroides.

2.16. *Vainillina-ácido fosfórico*

- Disolver 0,1 g de vainillina en 100 mL de solución ácido fosfórico (50% en agua).
- Aspersar y calentar 10-20 min. a 120°C. Evaluar en Vis o UV 365 nm.
- Detección: esteroides y terpenoides.

2.17. *Vainillina-ácido sulfúrico*

- A. Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de H₂SO₄ conc., o
B. Disolver 0,5 g de vainillina en 100 mL de una mezcla de H₂SO₄:etanol (40:10).
- Aspersar y calentar a 120°C hasta intensidad de coloración óptima de manchas.
- Detección: alcoholes superiores, fenoles y esteroides.

2.18. *Vainillina-ácido sulfúrico*

- Sol. *a*: solución etanólica de H₂SO₄ al 5%.
Sol. *b*: solución etanólica de vainillina al 1%.
- Aspersar con *a* y luego con *b*. Calentar 5-10 min. a 110°C. Evaluar la placa en el Vis. Las coloraciones son similares a las obtenidas con anisaldehído-ácido sulfúrico.
- Detección: aceites esenciales, terpenoides, derivados de fenilpropano, fenoles, etc.

3. COMPUESTOS FENOLICOS

3.1. *Acetato de plomo básico*

- Solución de acetato de plomo básico (25% en agua).
- Aspersar y observar manchas fluorescentes a la luz UV de onda larga.
- Detección: flavonoides.

3.2. *Acido p-toluensulfónico*

- Solución de ácido p-toluensulfónico (20% en cloroformo).
- Aspersar y calentar pocos minutos a 100°C. Observar manchas fluorescentes UV 365 nm.
- Detección: esteroides, flavonoides y catequinas.

3.3. *4-aminoantipirina-hexacianoferrato (III) de potasio (reacción de Emerson)*

- Sol. *a*: solución de 4-aminoantipirina (2% en etanol).
Sol. *b*: solución de hexacianoferrato (III) de potasio (18% en agua).
- Aspersar con *a* y luego con *b*; colocar el cromatograma en una cámara preparada en solución de amoniaco al 25%. Se forman zonas rojo-anaranjadas o rojo-salmón.
- Detección: fenoles.

3.4. *Bencidina*

- Disolver 0,5 g de bencidina en 20 mL de ácido acético glacial y 80 mL de etanol.
- Aspersar y calentar 15 min. a 100°C.
- Detección: aldehídos terpénicos, flavonoides, hidratos de carbono.

3.5. *Cloruro de aluminio*

- Solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol.
- Aspersar y observar fluorescencia amarilla a la luz UV-365 nm.
- Detección: flavonoides.

3.6. *Cloruro de antimonio (III)*

- Solución de cloruro de antimonio (III) al 10% en cloroformo.
- Aspersar y observar manchas fluorescentes a la luz UV-365 nm.
- Detección: flavonoides.

3.7. Cloruro de hierro (III)

- A. Solución de cloruro de hierro (III) al 1 ó 5% en ácido clorhídrico 0,5N, o
- B. Solución de cloruro de hierro (III) al 10% en agua.
- Aspersar y observar manchas azules o verdes de fenoles o rojas de ácidos hidroxámicos.
- Detección: fenoles y ácidos hidroxámicos.

3.8. Complejo ácido difenilboriloxietanolamina (*naturstoffreagenz-a*)

- Solución del ácido difenilboriloxietanolamina al 1% en metanol.
- Aspersar y observar manchas en UV o Vis.
- Detección: 3',4'-dihidroxi flavonas y -flavonol como manchas naranjas; sus equivalentes 4'-hidroxi como manchas amarillas verdosas.

3.9. Hidroxido de potasio (*reacción de Bornträger*)

- Solución de hidróxido de potasio al 5% ó 10% en etanol (o metanol).
- Aspersar y evaluar en Vis o UV-365 nm.
- Detección: cumarinas (azul, UV-365 nm), antrona (amarilla, UV-365 nm), antraquinona (roja).

3.10. Hexacianoferrato (III) de potasio - cloruro de hierro (III)

- Sol. *a*: solución de hexacianoferrato (III) de potasio (1% en agua).
- Sol. *b*: solución de cloruro de hierro (III) (2% en agua). Mezclar volúmenes iguales de *a* y *b*.
- Aspersar y observar; la coloración se intensifica por aspersión posterior con ácido clorhídrico 2N. Compuestos fenólicos azul oscuro; cumarinas fluorescen violeta a azul; furanocumarinas rojizo-marrón o amarillo.
- Detección: fenoles, cumarinas, aminas y otras sustancias reductoras.

3.11. Reactivo de Folin-Ciocalteu

- Sol. *a*: solución de carbonato de sodio (20% en agua).
- Sol. *b*: antes de su uso se diluye 1 vol. de la solución de reserva con 3 vol. de agua.
- Sol. de reserva: disolver 10 g de wolframato de sodio y 2,5 g de molibdato de sodio en 70 mL de agua y se agregan sucesivamente 5 mL de solución de ácido fosfórico (85%) y 10 mL de ácido clorhídrico (36%). La mezcla se calienta 10 horas a reflujo. Luego se agregan 15 g de sulfato de litio, 5 mL de agua y 1 gota de bromo, se vuelve a calentar 15 min. y se completa, después de enfriar, con agua en un matraz aforado a 100 mL.
- Aspersar con *a*, secar brevemente y aspersar con *b*.
- Detección: fenoles.

3.12. Sulfato de cobre-citrato de sodio (reactivo de Benedict)

- 1,73 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 17,3 g de citrato de sodio y 10 g de carbonato de sodio anhidro se disuelven y completan a 100 mL con agua.
- Aspersar y observar en el Vis y en UV. Las sustancias con -OH orto inicialmente fluorescentes a la luz UV onda larga, se extinguen total o parcialmente con este reactivo, mientras que se refuerzan o mantienen en caso de no existir -OH orto.
- Detección: flavonoides y cumarinas con grupos hidroxilo en orto.

3.13. Vainillina-ácido clorhídrico

- Solución de vainillina al 5% en etanol se mezcla con ácido clorhídrico conc. en la relación 4:1, justo previo al uso.
- Aspersar, si es necesario calentar; aparición de manchas rojas o rojo púrpura para catequinas y proantocianidinas.
- Detección: catequinas y proantocianidinas.

4. ALCALOIDES

4.1. *Acido nítrico*

- Dejar reaccionar 100 mL de etanol con aproximadamente 50 gts. de ácido nítrico (65%).
- Aspersar y evaluar a la luz UV o la aparición de manchas rojas.
- Detección: alcaloides como ajmalicina y brucina.

4.2. *Cloruro de hierro (III)-ácido perclórico*

- Solución de cloruro de hierro (III) 0,2N en ácido perclórico acuoso al 35%.
- Aspersar y calentar a 100°C.
- Detección: alcaloides oxindólicos.

4.3. *Yodoplatinato de potasio*

- Dejar reaccionar 5 mL de solución ácido hexacloroplatínico (5%) con 45 mL de solución de KI (10% en agua), diluir con 100 mL de agua. Preparar poco antes de su uso.
- Aspersar y observar manchas azul-violeta.
- Detección: alcaloides.

4.4. *Yodo-yoduro de potasio ácido*

- Disolver calentando 1 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua y se acidifica con 2 mL de HOAc glacial. Completar con agua hasta 100 mL.
- Detección: alcaloides.

4.5. *Reactivo de Dragendorff según Munier*

- Sol. a: disolver 1,7 g de nitrato básico de bismuto en 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua.
- Sol. b: disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua.
- Sol. de reserva: mezclar vol. iguales de las soluciones a y b, conservar en refrigeración.

- Para usar: disolver 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua y agregar 5 mL de solución de reserva.
- Detección: alcaloides y otros compuestos nitrogenados.

4.6. Reactivo de Ehrlich

- Disolver 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en una mezcla de 25 mL de ácido clorhídrico (36%) y 75 mL de metanol.
- Aspersar y calentar la placa. Aparición de manchas azules, violetas, verdes o rojas.
- Detección: alcaloides indólicos y derivados.

4.7. Reactivo de Marquis

- 3 mL de formaldehído se diluye a 100 mL con ácido sulfúrico conc.
- Aspersar y evaluar en el Vis.
- Detección: alcaloides tipo morfina, codeína, tebaína.

4.8. Reactivo de Mayer

- Sol. a: 13,5 g de cloruro de mercurio (II) y 49,8 g de yoduro de potasio, se disuelve cada uno en 20 mL de agua, se mezclan y se completa a 100 mL. Agregar a la mezcla 15 mL de ácido clorhídrico en solución acuosa al 17%.
- Sol. b: 5 g de cloruro de zinc (II) en 80 mL de ácido clorhídrico (37%).
- Sol. c: solución amoniacal al 15%.
- Aspersar con a, se lava el cromatograma con agua durante 10 min., se deja escurrir, se aspersa con b y después con c. Observar aparición de manchas marrones.
- Detección: alcaloides.

4.9. Reactivo de yodo-ácido clorhídrico

- Sol. a: 1 g de yoduro de potasio y 1 g de yodo se disuelven en 100 mL de etanol.
- Sol. b: 25 mL de ácido clorhídrico al 25% se mezcla con 25 mL de etanol 95%.

- Aspersar primero con *a*, luego con *b*. Observar manchas marrones en el Vis.
- Detección: derivados de purina (cafeína, teofilina, teobromina).

4.10. Reactivo de yodo-cloroformo

- Solución de yodo al 0,5% en cloroformo.
- Aspersar y calentar a 60°C durante 5 min.
- Detección: alcaloides de ipecacuana.

4.11. Reactivo de Van Urk

- 0,2 g de p-dimetilaminobenzaldehído se disuelven en 100 mL de ácido clorhídrico al 25% con la adición de 1 gt de solución de cloruro de hierro (III) al 10%.
- Aspersar y evaluar en el Vis.
- Detección: alcaloides del Secal.

4.12. Sulfato de amonio y cerio (IV)

- Solución de sulfato de amonio y cerio (IV) al 1% en ácido fosfórico 85%.
- Detección: alcaloides del Vinca.

4.13. Sulfato de amonio y hierro (III)

- 1 g de sulfato de amonio y hierro (III) en 100 mL de ácido fosfórico 85%.
- Aspersar sobre la placa previamente calentada a 100°C.
- Detección: alcaloides del Vinca.

4.14. Sulfato de cerio (IV)-ácido sulfúrico (reactivo modificado según Sonneschein)

- Suspender 0,1 g de sulfato de cerio (IV) en 4 mL de agua. Agregar 1 gt de ácido tricloroacético, hervir y añadir lentamente gts de ácido sulfúrico conc. hasta que la solución se vuelva clara.
- Aspersar y calentar algunos minutos a 110°C hasta aparición de manchas.

- Detección: alcaloides como brucina, apomorfina, colchicina, papaverina.

4.15. *Tiocianato de cobalto (II)*

- Disolver 3 g de tiocianato de amonio y 1 g de cloruro de cobalto (II) en 20 mL de agua.
- Aspersar y observar aparición de manchas azules sobre fondo blanco o rosado.
- Detección: alcaloides y aminas.

4.16. *Tetrafenilborato de sodio*

- Sol. *a*: tetrafenilborato de sodio al 1% en metil etil cetona saturada en agua.
Sol. *b*: solución de fisetina o quercetina al 0,015% en metanol.
- Aspersar con *a*, secar al aire y luego aspersar con *b*, secar nuevamente al aire. Observar manchas anaranjadas a rojas, fluorescentes a la luz UV-365 nm.
- Detección: alcaloides.

4.17. *Reactivo de Wagner*

- Disolver 1 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua, acidificar con 2 mL de ácido acético glacial; completar con agua a 100 mL.
- Aspersar y observar la formación de manchas marrones.
- Detección: alcaloides.

Reacciones de coloración y precipitación para grupos funcionales

Método	Procedimiento	Color	Aplicación y Comentario
DOBLES ENLACES OLEFINICOS			
Tetranitrometano, TNM	0,5 mg <i>Ms</i> /1-2 mL CHCl ₃ o CCl ₄ + 1-2 g TNM.	amarillo-rojo	pos: dobles enlaces y compuestos aromáticos; color incrementa con número de dobles enlaces conjugados; neg: Δ ^{α,β} -ácidos, ésteres, aldehídos, alcoholes, éteres.
Permanganato de potasio, KMnO ₄	10 mg <i>Ms</i> /2 mL de H ₂ O. <i>R</i> : KMnO ₄ 0,01% H ₂ O. <i>Ms</i> + <i>R</i> + 1 gt sol. Na ₂ CO ₃ 5%.	decoloración	pos: dobles enlaces; neg: Ar ₂ C=CAr ₂ ; interferencia fenoles, aminas aromáticas u otros compuestos oxidables.
Bromo, Br ₂ /CCl ₄	20 mg <i>Ms</i> /2 mL CCl ₄ . <i>R</i> : 5 mL Br ₂ /100 mL CCl ₄ . <i>Ms</i> + <i>R</i> por gts hasta decoloración.	decoloración	pos: dobles y triples enlaces.

Método	Procedimiento	Color	Aplicación y Comentario
ANILLOS AROMATICOS			
Formaldehído ácido sulfúrico	10 mg <i>Ms</i> /1 mL CCl ₄ R: 2 mL H ₂ SO ₄ conc. + 2 gts de HCHO al 37%. 2 gts <i>Ms</i> + 1 mL R.	rojo, verde, azul o púrpura	pos: anillos aromáticos; neg: si los anillos aromáticos contienen grupos -SO ₃ H, -NO ₂ , -CO ₂ H.
ALCOHOLES			
Xantatos	20 mg <i>Ms</i> + 1 lenteja KOH + 0,5 mL EtOH. Calentar. Enfriar, + 1 mL Et ₂ O + gt a gt CS ₂ hasta for- mación de un ppdo. amarillo.	ppdo. amarillo	pos: alcoholes.
ALDEHIDOS			
Schiff	1-2 mg <i>Ms</i> /1-2 mL fucsina 0,025%/ H ₂ O justo en la decoloración con SO ₂ , agitar.	rojo a violeta	pos: algunos aldehídos aromáticos.
Fehling	a: 35 g CuSO ₄ .5H ₂ O/500 mL H ₂ O b: 175 g sal de Rochelle + 50 g NaOH/500 mL H ₂ O.	ppdo. rojo	pos: aldehídos y otros grupos reduc- tores; neg: aldehídos aromáticos y cetonas

	<i>R</i> : 1 <i>a</i> + 1 <i>b</i> . Fresco. 5-10 mg <i>Ms</i> /1 mL <i>R</i> . Dejar 5 min., calentar.		
Tollens	<i>R</i> : 2 mL AgNO ₃ 5% + 1 gt NaOH 10% + NH ₄ OH 2% hasta aclarar Sol. fresca. <i>Ms</i> + <i>R</i> . Calentar.	ppdo. negro o espejo de plata	pos: aldehídos aromáticos y alifáticos, aminas aromáticas; neg: cetonas

LACTONAS INSATURADAS

Legal	1-2 mg <i>Ms</i> /2-3 gts Py + 1 gt nitroprusiato de sodio 0,5% + 1-4 gts KOH 2N.	rojo oscuro	pos: lactona- α,β insaturada.
Baljet	<i>a</i> : 1 g ác pícrico/EtOH 95%. <i>b</i> : 10 g NaOH/100 mL H ₂ O. <i>R</i> : 1 <i>a</i> + 1 <i>b</i> . <i>Ms</i> + gts de <i>R</i> .	rojo claro a oscuro	pos: lactona- α,β -insaturada.

ESTERES CARBOXILICOS

Ac. hidroxámico	1 gt <i>Ms</i> /1 mL NH ₂ OH.HCl 0,5N/ EtOH + 0,2 mL NaOH 6N. Hervir. Enfriar, + 2 mL HCl 1N + EtOH (hasta aclarar) + 1 gt FeCl ₃ 10% Hacer blanco.	magenta	interferencia: compuestos que contienen nitrógeno.
-----------------	--	---------	--

Método	Procedimiento	Color	Aplicación y Comentario
--------	---------------	-------	-------------------------

FENOLES

Cloruro férrico	1-2 gts <i>Ms</i> /2 mL H ₂ O o MeOH + 1 gt FeCl ₃ 1%/H ₂ O o MeOH.	colores intensos	pos: fenoles; -OH enólicos.
-----------------	---	------------------	-----------------------------

CETONAS Y METIL-CETONAS

2,4-Dinitrofenil- hidrazina (2,4- DNHF)	<i>R</i> : 3 g 2,4-DNHF/15 mL H ₂ SO ₄ conc. Agregar sobre 20 mL H ₂ O y 70 mL EtOH 95%, filtrar. 20 mg <i>Ms</i> /1 mL EtOH 95% + 2 mL <i>R</i> . Calentar si es necesario.	ppdo. amarillo o naranja-rojizo	pos: cetonas alifáticas, conjugación varía coloración de amarillo a roji- zo.
Legal	1-2 mg <i>Ms</i> /H ₂ O o EtOH (libre de aldehído) + 1 mL sol. fresca de nitroprusiato de sodio 0,5% H ₂ O.	colores caracte- rísticos, rojo oscuro	pos: cetonas, menos marcado para aldehídos; también lactonas- α,β - insaturadas.
Yodoformo	<i>R</i> : 20 g KI + 10 g I ₂ /100 mL H ₂ O. 10 mg <i>Ms</i> /1 mL H ₂ O + 0,2 mL NaOH 2N + <i>R</i> por gt hasta que per- sista color oscuro por 5 min. calen- tar 2 min a 60°C si es necesario. Decolorar con NaOH 2N.	CHI ₃ , olor caracte- rístico	pos: metilcetonas y metilcetonas potenciales.

REACCIONES DE COLORACION O PRECIPITACION PARA ALGUNOS
PRODUCTOS NATURALES

NUCLEO ESTEROIDAL O TRITERPENOIDA

Ac. fosfomolibdico	<i>R</i> : ác. fosfomolibdico 10%/EtOH.		
Ac. silicotungstico	<i>R</i> : ác. tungstico 15%/H ₂ O.		
Ac. tricloroacético	<i>Ms</i> + cristales de ác. tricloroacético	naranja, rojo, rojo oscuro	triterpenos tetracíclicos y esteroides desarrollan color a 60°C, triterpenos pentacíclicos a 110°C.
Carr-Price	1 mg <i>Ms</i> /CHCl ₃ + 2 mL SbCl ₃ al 30% en CHCl ₃ .	azul	originalmente para vitamina A; pos: derivados de colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.
Kedde	<i>a</i> : ác. 3,5-dinitrobenzoico 2% en MeOH. <i>b</i> : KOH 5,7% en H ₂ O. <i>R</i> : mezclar <i>a</i> + <i>b</i> , volúmenes iguales 1 mg <i>Ms</i> + 2 gts <i>R</i> .	púrpura o violáceo	pos: glicósidos cardíacos, para anillos γ -lactona- α,β -insaturado.
Liebermann-Burchard	1 mg <i>Ms</i> /pocas gotas HOAc + 3 mL Ac ₂ O/H ₂ SO ₄ (50:1).	verde, azul verdoso (vía rojo o azul)	pos: esteroides conteniendo 2 C=C conj. o formados por deshidratación con H ₂ SO ₄ .

<i>Método</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>Color</i>	<i>Aplicación y Comentario</i>
Noller	R: FeCl_3 o SbCl_3 anh. 0,1%/SOCl ₂ . Ms + 0,2 mL R.	cambios coloración/60°C	triterpenoides.
Rosenthaler	Ms/sol. etanólica de vainillina al 1% + 1 gt HCl conc.	varios	para sapogeninas esteroidales y triterpenoidales.
Salkowski	1-2 mg Ms (seco o 1 mL CHCl ₃) + 1 mL H ₂ SO ₄ + Ac ₂ O.	amarillo-rojo sangre	aplicación como para Liebermann.
Tortelli-Jaffé	0,5 mg Ms/0,2 mL HOAc (+ gts CHCl ₃ para disolver). Agregar cuidadosamente 0,1 mL Br ₂ 2%/CHCl ₃ .	verde en la interfase	para esteroides, dobles enlaces terciarios o potenciales.
Zimmermann (Raymond)	0,5 mg Ms/1 mL KOH 2N/EtOH + 0.1 mL 1% m-dinitrobenzaldehído (recrist.)/EtOH, 10 min. Diluir a 10 mL EtOH.	azul o violeta	para grupos metilenos activados generalmente en esteroides y triterpenoides.
SbCl ₃ /HClO ₄	Ms + R. R: sol. al 25% de SbCl ₃ en HClO ₄ al 60%.	rosado	Δ^5 -sapogenina.
di-t-butil-p- cresol	Ms/2,6-di-t-butil-p-cresol	violeta, amarillo-verde	para sapogeninas triterpenoidales y esteroidales.

FLAVONOIDES Y OTROS COMPUESTOS FENOLICOS

Bornträger	<i>Ms/bz</i> + NaOH 5% aq.	rojo en fase acuosa	pos: antraquinonas y naftoquinonas.
Cloruro férrico	<i>R</i> : 1 gt FeCl ₃ /100 mL H ₂ O. <i>Ms</i> + 1 gt <i>R</i> .	azul, verde negro.	pos: comp. fenólicos, taninos.
Dimroth (ác. bórico)	<i>Ms</i> /acetona + ác. bórico y ác. cítrico (u oxálico).	amarillo o amarillo verde	pos: 5-hidroxi flavona.
Gelatina-cloruro de sodio	<i>R</i> : 1 g gelatina/100 mL H ₂ O + 10 g NaCl. <i>Ms</i> + 1 gt <i>R</i> .	ppdo.	pos: taninos.
Marini-Bettolo	5 mg <i>Ms</i> /5 mL CCl ₄ + 1 mL SbCl ₅ 2%/CCl ₄ .	ppdo. amarillo ppdo. rojo a violeta	pos: flavonas, flavonoles, flavanonas pos: chalconas
Shinoda	<i>Ms</i> + limadura Mg + HCl conc.	tonos rojos	pos: núcleo de γ -benzopirona (flavonoides*, si se añade alcohol isoamílico y agita, el color pasa a la capa isoamílica). * excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavononas.

Método	Procedimiento	Color	Aplicación y Comentario
Rosenheim	<i>Ms</i> + HCl 2N/1-propanol. Hervir 15-30 min.	rojo	pos: leucoantocianidinas; catequinas; marrón.

ALCALOIDES
Reacciones de Coloración

DMB	<i>R</i> : 4-dimetilaminobenzaldehído al 5% en ác. ortofosfórico/MeOH. <i>Ms</i> + 1 gt <i>R</i> .	violeta	ácido lisérgico y sus amidas.
Ehrlich	0,5 mg <i>Ms</i> /1 mL EtOH + 1 mL 4-dimetilaminobenzaldehído 5%/HCl.	violeta	pos: si $>CH \alpha$ o β a $>NH$.
Erdmann	<i>a</i> : 6 gts HNO ₃ /100 mL H ₂ O. <i>R</i> : 10 gts <i>a</i> + 20 gts H ₂ SO ₄ . 1-2 mg <i>Ms</i> + 8-10 gts <i>R</i> .	rojo, otros colores	brucina, tebaína, veratrina, morfina, codeína, colchicina, atropina.
Fröhde	<i>R</i> : 5 mg ác. molíbdico o molibdato de sodio/1 mL H ₂ SO ₄ . Fresco <i>Ms</i> + 2-3 gts <i>R</i> .	rojo, verde, azul	brucina, tebaína, veratrina; apomorfina, berberina, emetina; codeína, morfina, papaucrina.
Keller	<i>Ms</i> /HOAc + trazas FeCl ₃ anh/ H ₂ SO ₄ .	azul intenso en interfase	alc. ergot.

Mandelin	<i>Ms</i> + 10 mg vanadato de amonio en 2 mL H ₂ SO ₄ .	violeta, azul rojo	solanina, estricnina.
Marquis	<i>a</i> : 8-10 gts de aldehído fórmico al 40% en 10 mL HOAc glacial. <i>b</i> : H ₂ SO ₄ conc. <i>Ms</i> + 1 gt <i>a</i> + 3 gts <i>b</i> .	naranja violeta púrpura	mezcalina y anfetamina; alc. del opio; heroína, morfina.
Mecke	<i>a</i> : 0,25 g de ác. selenioso en 25 mL de HOAc glacial. <i>b</i> : H ₂ SO ₄ conc. <i>Ms</i> + 1 gt <i>a</i> + 3 gts <i>b</i> .	azul-verdoso	morfina y heroína.
Otto	<i>Ms</i> /H ₂ SO ₄ 80% + 1 gt K ₂ Cr ₂ O ₇ diluido.	rojo-violeta a azul púrpura	estricnina; otros alc. indólicos.
Shaer	<i>R</i> : 1 mL H ₂ O ₂ 30% + 10 mL H ₂ SO ₄ . Fresco. 0,1 mg <i>Ms</i> + 2-3 gts <i>R</i> .	verde	alc. del tropano.
Tiocianato de cobalto	<i>R</i> : 0,8 g tiocianato de cobalto + 1 mL ác. ortofosfórico/100 mL MeOH:H ₂ O (2:3). <i>Ms</i> + 1 gt <i>R</i> .	azul-turquesa	cocaína, antes de 5 seg.; después de 5 seg. otros anestésicos.

Método	Procedimiento	Color	Aplicación y Comentario
Reacciones de precipitación			
Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)	a: 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /20 mL HNO_3 . b: 27,2 g KI/50 mL H_2O . Mezclar, reposar, decantar supernadante. Diluir a 100 mL.	rojo a naranja	agregar a solución ácida de alc.
Hager (ác. pícrico)	Sol. acuosa saturada de ácido pícrico.		agregar a solución ácida, particularmente con alc. cinchona.
Mayer (yoduro de mercurio y potasio)	a: 1,36 g HgCl_2 /60 mL H_2O . b: 5 g KI/10 mL H_2O . Mezclar. Diluir a 100 mL.	blanco a crema	agregar a solución acidulada, precipita sólo en exceso de reactivo.
Reineckato de amonio ($\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	R: reineckato de amonio, sol. aq. al 4% (100 mL) conteniendo 300 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$. Acidular con HCl.	ppdo. floculante color rosa	general.
Scheibler (ác. fosfortungstico)	100 g tungstato de sodio + 70 g Na_2HPO_4 /500 mL H_2O . Acidificar con HNO_3 .	blanco	estricnina, quinina.

Sonneschein (ác. fosfomolibdico)	Sol. ácida de molibdato de amonio, agregar sol. ác. saturada de Na_2HPO_4 hasta formación de ppdo. Filtrar, lavar ppdo. y disolver en sol. saturada de Na_2CO_3 . Evaporar a sequedad. Disolver 10 g del residuo en 100 mL HNO_3 30%.	naranja	general.
Wagner (yodo-yoduro de potasio)	1,27 g I_2 + 2 g KI/5 mL H_2O . Diluir a 100 mL.	marrón	general

Miscelaneas

I. DETERMINACION DE ACEITES ESENCIALES

1. *Indice de acidez (IA)*

Pesar 1 g de muestra, agregar 5 mL de EtOH y 5 gts de fenolftaleína (usar rojo de fenol en caso de aceites esenciales fenólicos) y titular con KOH etanólico 0,1N hasta la aparición de una coloración persistente por 30 seg. Hacer paralelamente un blanco.

2. *Indice de éster (IE)*

Pesar 2 g de muestra, agregar 25 mL de KOH etanólico 0,5N y reflujar por 45 min. Enfriar. Agregar 20 mL de agua destilada y 5 gts de fenolftaleína (usar rojo de fenol en caso de aceites esenciales fenólicos). Titular con HCl 0,5N o H_2SO_4 0,5N. Paralelamente hacer una prueba en blanco.

II. REACCIONES QUIMICAS

Se dan ejemplos de reacciones de acetilación, hidrólisis, metilación y demetilación aplicado a flavonoides:

1. *Acetilación:*

Disolver el flavonoide (20 mg) en piridina (0,5 mL) y agregar Ac_2O (0,5 mL). Dejar en un frasco tapado durante toda la noche a temperatura ambiente. Vaciar la mezcla de reacción en agua (ca. 30 mL) con agitación y dejar por una hora. Separar el acetato insoluble usando un pequeño embudo büchner. Si la filtración es difícil extraer la mezcla acuosa con éter. Recristalizar el acetato.

2. *Hidrólisis de O-glicósidos de flavonoides:*

Disolver el glicósido flavonoide (1 mg) en 5 mL de HCl 2N: MeOH (1:1) en un balón de 25 mL y reflujar en un baño de vapor por 60 min. Evaporar a sequedad en un rotavapor. Disolver el residuo completamente en un mínimo de MeOH:H₂O (1:1) y cromatografiar el producto, paralelo al material inicial, para determinar si la hidrólisis ha tenido lugar.

Si la hidrólisis ha ocurrido, evaporar la solución acuosa-metanólica a la mitad del volumen para remover el MeOH y extraer varias veces con EtOAc, agitando vigorosamente el tubo. La aglicona estará en la fracción EtOAc y el azúcar en la fase acuosa.

3. *Metilación con sulfato de dimetilo del 5,4'-dihidroxi-7,2'-dimetoxi isoflavanona*

10 mg de muestra en 5 mL de acetona previamente secada, 1 g de K_2CO_3 anhidro y 15 mL de Me_2SO_4 secado (sobre K_2CO_3 anhidro) se reflujan por 2 horas colocando en el tope del condensador un tubo con CaCl_2 . Se filtra, evapora y se cromatografía sobre SiO_2 y CHCl_3 , obteniéndose 5-hidroxi-7,2',4'-trimetoxiisoflavanona.

Nota: El 5-OH es difícil metilar.

4. Demetilación:

La muestra (2 mg) se coloca en un pequeño balón y se cubre con cristales de fenol, se agrega 1 mL de HI. Se refluja la mezcla por 6 horas. Se agrega H₂O (5 mL) y se extrae el producto con EtOAc. Purificar el producto por CP.

III. ANALISIS ESPECTRAL UV PARA FLAVONOIDES USANDO REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO

1. Preparación de soluciones de reserva de:

1.1 *Flavonoide*: Disolver una pequeña cantidad de flavonoide (0,1 mg), en 10 mL de MeOH grado espectroscópico, tal que el pico de mayor absorción entre 250 y 400 nm presente una densidad óptica entre 0,6 y 0,8.

1.2 *NaOMe*: Agregar cuidadosamente 2,5 g de Na metálico recién cortado a 100 mL de MeOH anhidro grado espectroscópico.

1.3 *AlCl₃*: Agregar cuidadosamente 5 g de AlCl₃ anhidro reactivo a 100 mL MeOH grado espectroscópico.

1.4 *HCl*: HCl conc. grado reactivo (50 mL) se mezcla con agua destilada (100 mL). Almacenar en un frasco tapado.

1.5 *H₃BO₃*: Se usa H₃BO₃ anhidro en polvo grado reactivo para el procedimiento (b), y una solución de MeOH (100 mL) grado espectroscópico saturado con H₃BO₃ anhidro grado reactivo para el procedimiento (a).

2. Análisis espectral:

2.1 *En MeOH*: Medir el espectro con 2 ó 3 mL de la solución de reserva 1.1.

2.2 *En NaOMe*: Medir inmediatamente después de la adición de 3 gts de solución de reserva 1.2 a la solución anterior 2.1. Medir nuevamente el espectro después de 5 min. Descartar la solución.

2.3 *En AlCl₃*: Medir después de la adición de 3 gts de solución de reserva 1.3 a 2-3 mL de la solución de reserva 1.1.

2.4 *En AlCl₃/HCl*: Medir inmediatamente después de la adición de 3 gts de solución de reserva 1.4 a la solución 2.3. Descartar la solución.

2.5 *En NaOAc*: Se determina después de agregar un exceso de NaOAc en polvo, a la cubeta conteniendo 2-3 mL de solución de reserva 1.1. Registrar dentro de 2 min de la adición y nuevamente a los 5-10 min para comprobar si hubo o no descomposición. Descartar la solución.

2.6 *En NaOAc/H₃BO₃*: Puede aplicarse 2 métodos dependiendo de si hubo o no descomposición durante el registro en NaOMe. En el primer caso usar *procedimiento (a)*, y en el segundo caso el *procedimiento (b)*:

- *Procedimiento (a)*: 5 gts de solución de reserva 1.5, se agrega a 2-3 mL de solución de reserva 1.1. Saturar rápidamente la solución con NaOAc y registrar el espectro.
- *Procedimiento (b)*: A la cubeta de 2.5 agregar suficiente H₃BO₃ en polvo, grado reactivo, para dar una solución saturada. Registrar el espectro y descartar la solución.

IV. ANALISIS FITOQUIMICO

Aparte de las marchas fitoquímicas presentadas en el capítulo 1 se puede realizar ensayos directos sobre el material vegetal, para cada uno de los productos naturales analizados y otros. A continuación se da algunos métodos:

1. *Saponinas y compuestos relacionados*:

- *Prueba de la espuma*: Con el material pulverizado se prepara un extracto acuoso al 1%, se filtra y el filtrado se agita vigorosamente por 30 seg. La presencia de la saponina es indicada por la formación de una espuma persistente por 30 min.

- Reacción de Liebermann-Burchard: Se añade una solución reciente de una gt de H_2SO_4 en 1 mL de Ac_2O helado a 1 mL de extracto clorofórmico del material pulverizado. Se observa el desarrollo del color a los 2, 5, 20 y 60 min después de realizada la mezcla.

2. *Glicosidos cardíacos:*

- Reacción de Kedde: Se agrega 1-2 gts del R de Kedde sobre las fracciones obtenidas siguiendo la marcha fitoquímica de la Fig. 4 (Cap. 1). Los cardenólidos y sus agliconas dan colores azules o violetas que desaparecen en 1-2 horas. Se efectúa un ensayo en blanco reemplazando el R por una solución de KOH 0,5N. Para preparar el reactivo mezclar volúmenes iguales de ác. 3,5-dinitrobenzoico al 2% en MeOH y de KOH al 5,7% en H_2O .

3. *Compuestos fenólicos:*

- Reactivo de cloruro férrico: Unas gts de solución de $FeCl_3$ al 1% sobre un extracto etanólico del material, darán coloraciones azul, verde o negra con compuestos fenólicos.

4. *Flavonoides:*

- Reacción de Shinoda: A una solución alcohólica del material se agrega un pequeño trozo de cinta de magnesio seguido por gts de HCl conc., las coloraciones roja (flavonas), roja a crimson (flavonoles), crimson a magenta (flavanonas) y algunas veces azul o verde, son consideradas positivas. Las chalconas y auronas, dan coloración roja directamente por adición de HCl conc. al extracto alcohólico.

5. *Cumarinas:*

Utilizar uno de los métodos siguientes:

- Se coloca en un tubo de ensayo 0,5 g de material pulverizado con 5 mL de agua destilada y se cubre con un papel filtro humedecido con solución de NaOH al 10%. El tubo así cubierto se coloca en un baño de agua en ebullición por varios minutos,

se remueve el papel y se expone a la luz ultravioleta. La aparición de una fluorescencia amarilla-verdosa o azul es indicativa de la presencia de cumarina. El procedimiento es aplicable sólo a cumarinas volátiles.

- El material seco y pulverizado previamente desengrasado con éter de petróleo (para remover los lípidos), se extrae con una solución diluida de álcali (se forman los cumarinatos solubles). Se extraen con éter las impurezas orgánicas neutras y se acidifica la solución acuosa para regenerar la cumarina padre la cual es luego extraída con éter. Las impurezas ácidas presentes pueden ser removidas con solución de NaHCO_3 . La solución etérea conteniendo las cumarinas pueden ser concentradas y usadas para estudios cromatográficos o prueba a la gota (1 gt de extracto + 1 gt de solución saturada de hidrocloreuro de hidroxilamina en alcohol y 1 gt de solución alcohólica de KOH al 1%, se calienta hasta burbujeo, después de enfriar se añade HCl 0,5N para acidificar la mezcla seguida de 1 gt de solución de FeCl_3 al 1%; el test es positivo si hay un color violeta indicativo de la presencia de lactona).

6. *Taninos:*

- Reacción de gelatina-sal: Se obtiene un extracto acuoso a partir de un extracto etanólico del material seco y pulverizado. A una solución de NaCl al 5% se agrega una porción de este extracto; a una segunda porción se le agrega solución de gelatina al 1% y a una tercera el reactivo gelatina-sal. La precipitación con este último reactivo, o con ambos el 2° y el 3°, es indicativo de la presencia de taninos. Si solamente ocurre con el 1°, el test es falso. También puede comprobarse si al extracto inicial se agrega solución de FeCl_3 y aparecen colores azul, azul negro, verde o azul verdoso y precipitado.

7. *Antraquinonas*

Utilizar uno de los métodos siguientes:

- Reacción de Bornträger: El material seco y pulverizado se macera en benceno, se separa el benceno el cual se agita con

solución acuosa de NH_3 o NaOH , la producción de una coloración rosada a roja en la capa acuosa es indicativa de antraquinona.

- Reacción de Bornträger modificado por Kraus: El material seco y pulverizado (0,3 g) se hierve por pocos minutos con KOH 0,5N (10 mL) al cual se le ha agregado 1 mL de H_2O_2 diluido. Después de enfriar la mezcla se filtra y 5 mL es acidificado con 10 gts de HOAc . La mezcla acidulada se extrae por agitación con benceno, tomando el benceno un color amarillo. 5 mL de este extracto bencénico se agita con 2,5 mL de NH_3 (aq), una reacción positiva es evidenciada por la aparición de un color rojo en la fase alcalina.
- Glicósido antraquinónico: 0,5 g de material seco y pulverizado se extrae con 30 mL de CHCl_3 para separar la antraquinona libre; el marco se calienta con 25 mL de HCl al 10% por 30 min. Se enfría y se extraen las agliconas con éter. El extracto etéreo se prueba como para antraquinona libre.

8. *Alcaloides:*

Se hace ensayos generales con reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Hager, Sonneschein, sobre el extracto ácido (acuoso o alcohólico). Se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen resultados positivos a por lo menos cuatro de los reactivos citados, u otros. Los ensayos pueden realizarse también sobre extractos más elaborados, obtenidos por los métodos siguientes:

- El extracto ácido, acuoso o alcohólico, se hace básico y se extrae con solvente orgánico (usualmente CHCl_3 o Et_2O) y luego los alcaloides se extraen de la solución orgánica con ácido acuoso diluido; esto tiene la ventaja de eliminar un gran número de compuestos que pueden dar una reacción positiva falsa.
- Se remueve el solvente de un extracto alcohólico y luego se agrega ácido para disolver los alcaloides. Se puede probar directamente en este extracto ácido. En otro caso se puede purificar parcialmente este extracto ácido siguiendo la secuencia anterior de tratamiento con base-extracción con solvente orgánico-extracción con ácido. Probar este nuevo extracto ácido.

- Se humedece el material con un álcali seguido por extracción con solvente orgánico y partición del extracto con ácido acuoso diluido. Este método falla para alcaloides cuaternarios, pero el extracto está libre de muchas sustancias.

REFERENCIAS

APENDICE 1

Las referencias 1-4 contienen la preparación de todos los reactivos de coloración indicados. Para detalles específicos de algunos de ellos pueden usarse las referencias 5-21 (entre paréntesis se indica el número del reactivo R).

- 1 Merck, E. **Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel.** Darmstad, RFA.
- 2 Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. (1984) **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 3 Stahl, E. y Schild, W. (1981) **Drogenanalyse II. Inhaltsstoffe und Isolierungen.** Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 4 Stahl, E. (1969) **Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook.** 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 5 Jones, D. and Radley, M. (1963) Plant Hormones III. Identification of Giberellic Acid in Inmature Barley and Inmature Grass. *Phytochem.* 2, 307-314 (R 1.1).
- 6 Lisboa, B.P. (1964) Characterization of Δ^4 -3-oxo-C₂₁-Steroids on Thin Layer Chromatograms by "in situ" Colour Reactions. *J. Chromatogr.* 16, 136-151 (R 2.6 y 2.7).
- 7 Stahl, E., Kattenbach, U. (1961) Dünnschicht-Chromatographie VI. Mittelung. Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten. *J. Chromatogr.* 5, 351-355 (R 2.6 y 2.7).

- 8 Ikan, R., Kashman, J., Bergmann, E.D. (1964) Thin Layer Chromatography of Tetra and Pentacyclic Triterpenes. *J. Chromatogr.* **14**, 275-279 (R 2.9).
- 9 Stevens, P.J. (1964) Thin Layer Chromatography of Steroid Specificity of two Locations Reagents. *J. Chromatogr.* **14**, 269-273 (R 2.10 y 2.11).
- 10 Davis, R., Mc Mahon, J., Kalmitsky, G. (1952) Separations of D Vitamins from others Sterols by Paper Chromatography and the Quantitative Determination of 7-Dehydrocholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4483-4484 (R 2.9).
- 11 Scheriber, K., Aurich, O., Oskke, G. (1963) Solanum Alkaloiden XVIII. Dünnschicht-Chromatographie von Solanun-Steroidalkaloiden und Steroidsapogeninen. *J. Chromatogr.* **12**, 63-69 (R 2.12 y 2.15).
- 12 Takeda, K., Hara, S., Wada, A., Matsumoto, N. (1963) A Systematic Simultaneous Analysis of Steroid Sapogenins by Thin Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* **11**, 562-564 (R 2.13 y 2.14).
- 13 Tschesche, R., Lampert, F. und Snatzke, G. (1961) Über Triterpenes VII Dünnschicht und Ionenanous tauscherpapier Chromatographie von Triterpenoiden. *J. Chromatogr.* **5**, 217-224 (R 2.13 y 2.14).
- 14 Thyhák, E., Vagujfalvi, D., Hágony, P.L. (1963) Mittelung, Trans-Trans und Cis-Trans Farnesol und Derivate. *J. Chromatogr.* **11**, 45-49 (R 2.17).
- 15 Matthews, J.S. (1963) Steroids. CCXXIII. Color Reagent for Steroids in Thin Layer Chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 163-165 (R 2.17).
- 16 Hörharmmer, L., Wagner, H., Hein, K. (1964) Kiesselgel Dünnschicht-Chromatographie von Flavonoiden. *J. Chromatogr.* **13**, 235-237 (R 3.1).
- 17 Jones, K. y Pridham, J. (1954) A Colorimetric Estimation of Sugar using Benzidine. *J. Biochem.* **58**, 288-290 (R 3.4).

- 18 Keith, K.W., Le Turneau, D., Mahlum, D. (1958) Quantitative Paper Chromatographic Determination of Phenols. *J. Chromatogr.* **1**, 534-536 (R 3.11).
- 19 Heacock, R.A., Mahon, M.E. (1965) The Colour Reactions of the Hidrokskatoles. *J. Chromatogr.* **17**, 338-348 (R 4.6).
- 20 Lane, E.S. (1965) Thin Layer Chromatography of Long Chain Amines and Related Compounds. *J. Chromatogr.* **18**, 426-430 (R 4.15).
- 21 Neu, R. (1963) Ein Neuer Aber Farbigen Nachweis von Alkaloiden und Organischen Basen Mit Tetraphenylbornatrium. *J. Chromatogr.* **11**, 364-368 (R 4.16).

APENDICE 2

- 22 Overton, K.H. (1963) Isolation and Purification, En: **Elucidation of Structures by Physical and Chemical Methods**, Vol XI de Techniques of Organic Chemistry, Interscience Publisher, New York.
- 23 Domínguez, X.A. (1962) Análisis Fitoquímico. *Ciencia* **21**, 125-135.
- 24 Farnsworth, N.R. (1966) Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* **55**, 225-275.
- 25 Clarke, E.G.C. y Berle, J. (1969) **Isolation and Identification of Drugs**. Pharmaceutical Press, Londres.
- 26 Domínguez, X.A. (1973) **Métodos de Investigación Fitoquímica**. Limusa Wiley, México.
- 27 Gibaja, S. (1977) **Guía para el Análisis de los Compuestos del Carbono**. UNMSM, Lima-Perú.

APENDICE 3

Referencias 23, 24, 26 del Apéndice 2.

- 28 Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970) **The Systematic Identification of Flavonoids.** Springer-Verlag, Berlin.
- 29 Markham, K.R. (1982) **Techniques of Flavonoid Identification.** Academic Press, London.

Indice de Materias*

- Aceites esenciales 24
- Agentes cromogénicos
 - aceites esenciales 34
 - cumarinas 153
 - esteroides 83
 - flavonoides 124
 - preparación 255
 - sesquiterpenlactonas 58
 - triterpenos 83
- Alcaloides 211
 - cuantificación 234
 - extracción 225
- Análisis fitoquímico 3, 284
- Benzofuranos 170
- Biosíntesis
 - alcaloides 213
 - cumarinas 149
 - flavonoides 118
 - quinonas 187
 - terpenoides 25, 31
- Cromatografía de capa delgada
 - aceites esenciales 34
 - alcaloides 226
 - benzofuranos 172
 - cromenos 172
 - cumarinas 152
 - esteroides 83
 - flavonoides 122
 - quinonas 189
 - sesquiterpenlactonas 58
 - triterpenos 83
 - xantonas 179
- Cromatografía de columna
 - cumarinas 151
 - flavonoides 124
- Cromatografía de gas líquido
 - aceites esenciales 35
 - triterpenos 84
- Cromatografía de papel
 - cumarinas 152
 - flavonoides 121
- Cromatografía en contracorriente
 - flavonoides 126
 - quinonas 189
- Cromatografía líquida de alta performance, HPLC
 - cumarinas 152
 - flavonoides 125
 - sesquiterpenlactonas 58
 - triterpenos 83
 - xantonas 180
- Cromenos 170
- Cumarinas 146
- Diterpenos 64
- Espectrometría de masa
 - aceites esenciales 37
 - alcaloides 234
 - cumarinas 158
 - esteroides 90
 - flavonoides 132
 - sesquiterpenlactonas 59
 - triterpenos 90
- Esteroides 23, 72

* En la mayoría de los casos se señala solamente la página inicial de la materia.

Flavonoides 114

Glicósidos cardiacos 80

Infrarrojo, espectroscopía

aceites esenciales 35

alcaloides 230

benzofuranos 172

cromenos 172

cumarinas 156

esteroides 84

flavonoides 130

quinonas 190

sesquiterpenlactonas 59

triterpenos 84

xantonas 181

Monoterpenos 29

Plantas aromatizantes 16 (tabla)

Plantas colorantes 19 (tabla)

Plantas medicinales 12 (tabla)

Quinonas 182

Reacciones de color y precipitación

aceites esenciales 33

alcaloides 226

esteroides 82

flavonoides 120

para grupos funcionales 269

quinonas 188

sesquiterpenlactonas 59

triterpenos 82

Resonancia magnética nuclear, espectroscopía

aceites esenciales 37

alcaloides 230

benzofuranos 172

cromenos 172

cumarinas 156

esteroides 86

flavonoides 130

quinonas 190

sesquiterpenlactonas 59

triterpenos 86

xantonas 182

Saponinas 75

Sesquiterpenlactonas 53

Sesquiterpenos 30

Terpenoides 23

Triterpenos 72

Ultravioleta, espectroscopía

aceites esenciales 35

alcaloides 228

cumarinas 154

flavonoides 127, 283

quinonas 189

sesquiterpenlactonas 59

xantonas 181

Xantonas 179

Índice de Compuestos

Alcaloides

ac. lisérgico 216
ajmalicina 15
atropina 12, 212, 214, 229,
238
berberina 12, 19, 216, 228
boldino 14, 217
carpaína 218
cocaína 212, 214, 229, 237
cocculina 219
codeína 212, 229
codonopsina 218
coniina 214, 229
criogenina 213, 218
efedrina 212, 214
emetina 12, 212, 216
eritralina 219
escopolamina 212, 214
esparteína 212, 222
estricnina 215, 229
fluocurina 215
foliosodina 213, 219
glicozolidol 230
harmalina 215
harmano 231, 232, 246
harmina 223
higrina 214, 224
hiosciamina 12, 13, 212
hoveína 218
indolizidina 233
jatrofano 213, 218
lobelina 212, 214
lupanina 237
maitansina 213, 219
mezcalina 214, 222, 229
mitrafilina 216, 241
mitragina 213, 219

morfina 212, 217, 229
nicotina 217
palmirina 238
panarina 232
papaverina 212, 216
pilocarpina 213, 217
piperina 214
pirrol-3-carbamida 243
platinecina 216
pseudopellieterina 214
psilocibina 215
quinina 13, 212, 217, 229, 233
quinolizidina 233
reserpina 212, 215
retronecina 216
ricinina 217
rinchofilina 223, 230
rumberina 238
seneciofilina 241
senecioilretronecina 232
senecionina 221
shikimianina 213, 219
solanopubamina 233
tubocurarina 13, 212, 216
vinblastina 12, 213, 215
vincamina 236
vincristina 12, 213, 215

Aromáticos

anetol 29
anisaldehído 29
azarona 29
carvacrol 17, 18, 29, 41
cumínico, aldehído 16, 29, 41
eugenol 28, 29, 41
safrol 29
timol 17, 29, 41

turmerona 16
vainillina 29

Cromenos y benzofuranos

2,5-diacetil-6-hidroxi-benzofurano 174
6-metoxieuparina 171
7-hidroxi-cecalin 171
dehidrotremetona 171
dihidroeuparina 174
euparina 172
eupatorona 171
precoceno 171
toxol 171
tremetona 171
wernerias-cromeno 171

Cumarinas

3,4,8-trimetoxi-5-formil-2H-1-benzopiran-2-ona 165
4-metoxicumarina 159
6,7-dihidroxycumarina 157
7-metoxicumarina 148, 159
8-hidroxi-pereflorina 165
aflatoxina 146, 148
angelicina 148
angustifolina 157
aurangin 148
bergapteno 146, 148
cumarina 146, 159
dicumarol 146, 148
escopoletina 148
imperatorina 159
murrangatina 157
novobiosina 146, 148
osthol 159
pereflorina 165
psoraleno 148
racemosina 148
seselinal 157

sesilina 148
surangin 146
tomentina 148
umbeliferona 160
xantiletina 148
xantotoxina 146

Diterpenos

7 α -etoxiroyleanona 69
abietano 65
ac. 16-hidroxycarnósico 67
ac. abiético 66
ac. agático 66
ac. giberélico 66
ac. hardnickico 66
ac. tucumanoico 68

atisano 65
beyerano 65
cajucaronólido 64, 67
cassano 65
cembreno 65
clerodano 65
forbol 64, 67
forskolin 64, 67
giberalano 65
gnidicina 67
grayanotoxina 66
ingenol 67
jatrofona 64, 66
kaurano 65
labdano 65
manoilo, óxido de 70, 71
pimarano 65
podocarpano 65
steviósido 15, 64, 67
taxano 65
taxodiona 64, 66
taxol 15, 64, 66

Esteroides

ac. cólico 78
androsterona 76
colesterol 76, 79
corticosterona 77
cortisona 77
digitoxigenina 13, 77
diosgenina 13, 78, 79, 80, 81, 85,
88, 90, 96
esmilagenina 89
estigmasterol 76
estradiol 77
estriol 77
estrofantidina 77
estrona 77
hecogenina 89
physalolactona 78
pregnelona 76, 81
progesterona 76, 81
sarsapogenina 78, 89, 99
sitosterol 76
solanidina 78
solasodina 79, 89
testosterona 76, 81
tomatidina 78
yamogenina 79, 85

Flavonoides

apigenina 115, 117
buteína 116
cartamina 119
daidzeína 136
formometina 136
genisteína 116, 136
hesperetina 116
hibiscetina 119
hispidol 116
kaempferol 115
lonchocarpina 116
luteolina 115

luteona 133
morina 119
naringenina 116, 133
nobiletina 119
pseudobaptigenina 136
quercetina 115, 133, 144
quercetrina 119
ramnetina 119
retusina 135
rotenona 14, 116
rutina 117, 119, 141
silimarina 15, 117
sulferetina 116, 133

Monoterpenos

1,8-cineol 17, 18, 29, 33, 39, 41,
43
bornano 39
bornileno 31, 39
canfor 28, 29, 31
careno 29, 31
carvona 29, 39, 41
citral 16, 29, 33, 39, 41
citronelal 17, 29, 33, 41
fenchona 29
geraniol 29, 39
limoneno 16, 29, 31, 39, 41
linalol 16, 29, 17
mentano 39
mentol 17, 29, 33
mirceno 29
neral 29
norbornano 39
ocimeno 29
perillilaldehido 29
pineno 17, 18, 29, 31, 39
pulegona 29
terpinoleno 29
tuyona 18, 29, 31, 41
 α -terpineol 29, 41

Sesquiterpenlactonas

- alantolactona 57
- allamandina 56
- altamisina 60, 62
- amatolina 57
- ambrasanolido 54
- ambrosina 56, 62
- bakkenólido 55
- cadinanólido 55
- elemanolido 54, 55
- eremofilanolido 54, 55
- eudesmanólido 55
- germacranólido 55
- guaianólido 54, 55
- helenalina 57
- linearilobin 61
- molefantinina 56
- neurolanina 63
- pseudoguaianólido 55
- psilotachinólido 54, 55, 60, 62
- santanólido 54
- santonina 57
- schkuripinnatólido 63
- vernolepina 57

Sesquiterpenos

- bisaboleno 32
- cadineno 30, 32, 40
- cariofileno 30, 32
- cedrol 30
- ciperano 30
- elemano 30
- farnesano 17, 30
- farnesol 30
- germacreno 40
- guaiol 44
- himachale 30, 32
- humuleno 30, 32, 40
- longicanfano 30
- sativeno 30

- selinano 30
- zingibireno 30

Quinonas

- alizarina 187, 192
- antraquinonas, mono
a tetrahidroxiladas 188
- chrysophanol 192
- emodina 15, 184, 192
- endocrocina 184
- filoquinona 186, 187
- frangulin 15
- juglona 187
- lapachol 15, 194
- lapachona, derivados de 191,
196
- lawsona 187
- naftoquinona 191
- naftoquinonas, mono y
dihidroxiladas 188, 191
- physcion 192
- plumbagina 191
- shikonina 187
- ubiquinona 186

Triterpenos

- ac. arjunólico 73
- ac. quinóvico 15, 95
- amirina 73, 87, 88, 91
- arborano 73
- damnarano 72
- escualeno 72
- eufol 72
- friedelano 73
- ginsenósido 14, 73
- glicirricina 14, 73
- hidroxihopanona 73
- lanosterol 72, 79
- lupeol 73, 91
- maytenfoliol 87

taraxasterol 15, 87, 91
tirucalol 72

Xantonas
gentiseína 180

mangiferina 180
psorospermin 183
swertianina 180
xantona 183

Indice de Plantas

Allium sativum L. 16
Aloe vera Tourn 12
Amaranthus caudatus var.
atropurpurea 19
Andira inermis Wright 136
Apium graveolens L. 16
Ariocarpus retusus 135
Artemisia annua 12
Atropa belladonna L. 12

Baccharis tucumanensis 68
Berberis lutea R. & P. 19
Berberis spp. 12
Beta vulgaris L. 19
Bixa orellana L. 19
Brunfelsia latifolia 243

Caesalpinia spinosa (Molina)
Kuntze 12
Cassia senna L. 12
Catharantus roseus (L.)
G. Don 12
Cephalis ipecacuana (Brot)
A. Rich. 12
Chondrodendron tomentosa 13
Chrysanthemum cinerariifolium 13
Cinchona calisaya Weddel 13
Cinnamomum zeylanicum Garc.
ex Bl. 16

Citrus limonniunum L. 16
Citrus sinensis Osbeck 16
Coleus forskohlii 66
Cominum cyminum L. 16
Coriandrum sativum L. 16
Croton cajucara 64
Croton lechleri M. Arg. 13
Curcuma longa L. 16, 19
Cymbopogon citratus (DC) Stapf 16
Cymbopogon winterianos Jowitt 16

Datura stramonium L. 13
Digitalis lanata Ehrh. 13
Digitalis purpurea L. 13
Dioscorea spp. 13, 80, 96

Eucalyptus globulus Labill 17
Eugenia caryophyllata Thunb. 17

Glycyrrhiza glabra L. 14
Gnidia lamprantha 64

Hamelia patens Jacq . 238

Jatropha gossypifolia 64

Krameria triandra R. & P. 14

- Lepidium meyenii* Walp 44
Lepidophyllum tola 160
Lonchocarpus nicou (Aubl.) DC 14
Lupinus mutabilis Swett 14

Marsdenia condurango Reich. 14
Matricaria chamomilla L. 17
Melissa officinalis L. 17
Mentha arvensis L. 17
Minthostachys mollis (Kunth)
 Griseb. 17
Myristica fragrans Houtt. 17

Neurolaena lobata (L.) R. Br. 59

Ocimum basilicum Linné 17
Opuntia soeherensii Bredt 19
Origanum vulgare Linné 17

Panax gingseng C.A. Meyer 14
Perezia coerulescens Wedd 91, 163
Petroselinum sativum Hofm. 18
Peumus boldus Molina 14
Pimpinella anisum Linné 18
Piper nigrum L. 18
Pseudocalymma alliaceum 196

Rauwolfia serpentine Benth 15
Rhamnus purshiane D.C. 15
Rheum officinalis Baillon 15
Rheum palmatum L. 15
Rosmarinus officinalis Linné 18

Salvia officinalis L. 18
Satureja spp. 18
Schinus molle L. 18
Schkuhria pinnata var. *pinnata* 63
Senecio spp. 240
Sickingia tinctoria (KBK)
 Schum 246
Smilax spp. 99
Stevia rebaudiana Bertoni 15, 64
Sylibum marianus Gaerth 15

Tabebuia spp. 15, 194
Tagetes erecta L. 19
Taraxacum officinale Wigger 15
Taxodium distichum 64
Taxus brevifolia Nutt 15, 64
Thymus vulgaris L. 18

Uncaria guianensis
 (Aubl.) Gmel 15, 95, 144, 241
Uncaria tomentosa (Willd.). DC. 15

Vernonia baccharoides 91

Werneria ciliolata A. Gray 71, 174
Werneria dactylophylla D.C. 70, 141

Zea mays L. 19
Zingiber officinalis Roscoe 18

Investigación Fitoquímica

Se terminó de imprimir en el mes de junio de 1994,
en los Talleres de Servicio Copias Gráficas S.A.
(RUC: 10069912), Jr. Jorge Chávez 1059, Telefax 249693,
Lima 5, Perú.

PUBLICACIONES RECIENTES

CARLOS AGUIRRE

Agentes de su Propia Libertad. 1993. 336 p.

QUINTIN ALDEA VAQUERO

El Indio Peruano y la Defensa de sus Derechos. 1993. 656 p.

ANITA G. COOK

Wari y Tiwanaku: entre el estilo y la imagen. 1994. 346 p.

MIGUEL GIUSTI - HORST NITSCHACK (Editores)

Encuentros y Desencuentros. 1993. 248 p.

GUILLELMO LOHMANN VILLENA

Amarilis Indiana. 1993. 398 p.

MERCEDES LOPEZ-BARALT

Guamán Poma: Autor y Artista. 1994. 214 p.

MANUEL DE LA PUENTE Y LAVALLE

El Contrato en General. 2da. parte, 3 tomos. Biblioteca para leer el Código Civil. Vol. XV. 1994. 1,648 p.

ALFONSO W. QUIROZ

Deudas Olvidadas. 1993. 236 p.

CARLOS AUGUSTO RAMOS

Toribio Pacheco. Jurista Peruano del Siglo XIX. 1993. 312 p.

JAVIER SOLOGUREN

El Rumor del Origen. 1993. 392 p.

FERNANDO DE TRAZEGNIES G.

EL País de las Colinas de Arena. Reflexiones sobre la Inmigración China en el Siglo XIX a partir del Derecho. 1994. Tomo I, 662 p. y Tomo II, 818 p.

DE PROXIMA APARICION

PEDRO DE CIEZA DE LEON

Crónica del Perú. Cuarta Parte. Las Guerras Civiles:

Vol. II. Guerra de Chupas

Vol. III. Guerra de Quito

OSWALDO HOLGUIN

Ricardo Palma, Infancia y Bohemia

SHIMADA IZUMI

Tecnología y Organización de Producción Cerámica Prehispánica.

RAUL LEON CAPARO

Racionalidad Andina en el uso del espacio.

MANUEL MARZAL

La Utopía Posible. Tomo II.

ROGER RODRIGUEZ ITURRI

Adolescencia, Matrimonio y Familia

FRANK TORRES

Termodinámica I: Teorías y Problemas Resueltos

FONDO EDITORIAL

Av. Universitaria cuadra 18,
San Miguel.

Apartado 1761. Lima 100 - Perú

Tlfs.: 622540, anexo 220 y 626390

