

T
547.72
E77a
1967
F. cc. QQ.

084148

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



RECIBIDO 8 AGO. 1968

*Alcaloides de las apocináceas.
Estudio de las bases aisladas de la
raíz de Urechites Karwinski (Loroco)*

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

Ana Gloria España de Aguirre

PREVIA OPCION AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA Y FARMACIA



JULIO DE 1967

SAN SALVADOR. REPUBLICA DE EL SALVADOR. C.A.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10123402

R E C T O R

DR. ANGEL GOCHEZ MARIN

SECRETARIO GENERAL

DR. GUSTAVO ADOLFO NOYOLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

D E C A N O

DR. RICARDO GAVIDIA CASTRO

SECRETARIO

DRA. RHINA LEMUS DE SALGADO

J U R A D O S

PRIMER EXAMEN PRIVADO

Dr. Mario Santos

Dr. Oscar Orlando Cuellar

Dr. Jim Knock

SEGUNDO EXAMEN PRIVADO

Dr. Julio César Morán Ramírez

Dra. Estela Monterrosa

Dr. Sarbelio Echeverría

T E S I S

Dr. Juan Borges del Castillo

Dr. Carlos Mata Gavidia

Dr. Francisco Flores González

A G R A D E C I M I E N T O

AL DR. JUAN BORGES DEL CASTILLO,

por la acertada dirección de este trabajo;

AL DR. CHARLES BROOK de la Universidad de Glasgow y

AL DR. ANTONIO GONZALEZ GONZALEZ de la Universidad
de La Laguna (Canarias),

por su invaluable colaboración;

Al Personal del Departamento de Bioquímica de la

Facultad de Medicina, en cuyos laboratorios
se llevó a cabo esta tesis,

por su desinteresada cooperación;

AL DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA,

quien facilitó la obtención de equipo y literatura
necesarios para la realización de nuestro
objetivo.

DEDICATORIA

A mi madre

ADELA CAMPOS SARMIENTO

A la memoria de mi padre

VIGILIO ESPAÑA

A mi esposo

JULIO AGUIRRE CESTONI

A mi hijo

A mis hermanos, compañeros y amigos.

| <u>C O N T E N I D O</u> | <u>PAGINA</u> |
|---|---------------|
| I.-INTRODUCCION | 1 |
| II.-DISCUSION TEORICA | 2 |
| III.-ESTUDIO ESPECTROGRAFICO DE LAS SUSTANCIAS X y Y | 13 |
| IV.-PRUEBAS FARMACOLOGICAS | 31 |
| V.-PARTE EXPERIMENTAL | 33 |
| VI.-CONCLUSIONES | 43 |
| VII.-BIBLIOGRAFIA | 45 |

ALCALOIDES DE LAS APOCINACEAS. ESTUDIO DE LAS BASES
AISLADAS DE LA RAIZ DE URECHITES KARWINSKI (LOROCO)

I.-INTRODUCCION

Un estudio preliminar sobre los alcaloides de la *Hamelia Patens*, familia Rubiácea de Alvarez y Borges (1), es un intento de ahondar en el estudio del aislamiento y composición química de productos naturales de la flora Centroamericana en general y la de El Salvador, en particular. Queriendo continuar en la misma línea de investigación el presente trabajo se ha dirigido al campo de las Apocináceas (5), conocidas como portadoras de alcaloides, de cuya familia se encuentran en nuestro país varias especies, entre ellas la *URECHITES KARWINSKI* (7), denominada vulgarmente *Loroco*, y cuya flor es muy apreciada por su uso, que podríamos llamar típico, en la cocina criolla.

De un estudio bibliográfico exhaustivo (el cual incluye una revisión completa del *Chemical Abstracts* Vol. 1 al

Vol. 66, *The Alkaloids* por Bentley Vol.1 (1957) y II - (1965) editado por Wiley y *The Alkaloids* de Manske, Academic Press) se llegó a la conclusión de que esta planta no ha sido previamente estudiada, y sólo hay descritos en la literatura dos trabajos referentes a las especies - *Urechites lutea* (11) y *Urechites suberecta* (10) relativos a los glucócidos presentes en ellas, pero no se ha encontrado nada publicado sobre estudio de alcaloides en estas especies.

II.-DISCUSION TEORICA

En reacciones preliminares pudimos determinar que ni tallos, ni hojas, ni flores contenían alcaloides al obtener reacción negativa con los reactivos específicos tales como: Dragendorff (4) Mayer (6), etc. . Sin embargo la raíz, que el pueblo le asigna propiedades venenosas, nos dió reacción fuertemente positiva con los reactivos anteriores. No se ha comprobado su actividad mortífera, pero sí alteradora de algunas funciones como veremos más adelante en la descripción de pruebas farmacológicas.

Siendo pues la raíz, la única parte que contenía - sustancias básicas nos dedicamos al estudio de sólo esta parte de la planta. El conseguir cantidad suficiente para su investigación fue causa de dificultades: lo. por la re-

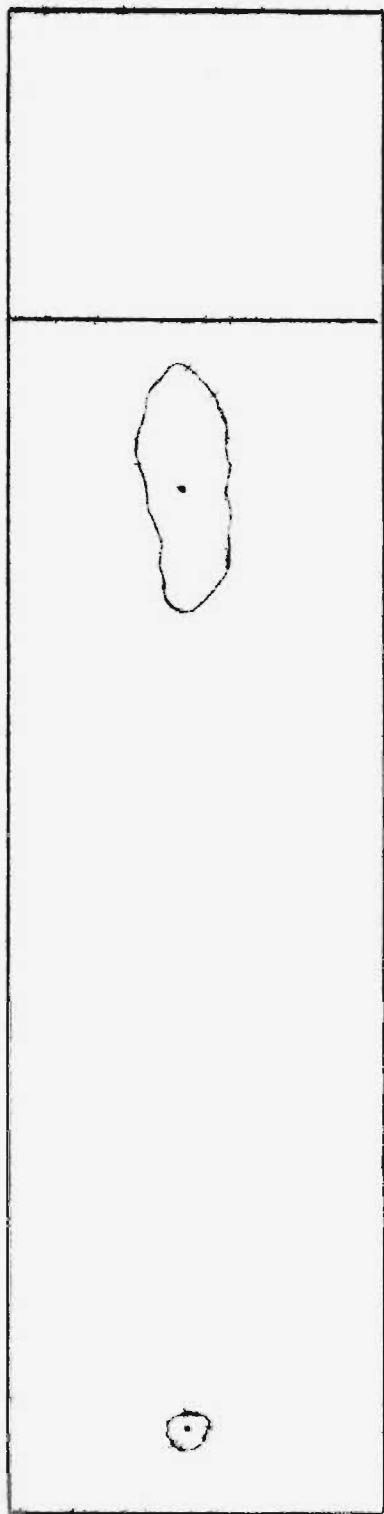
resultado positivo con este reactivo en las fracciones de la No. 116 a la 135 eluidas con los solventes: éter etílico 100%, éter etílico-metanol en cuya mezcla se varió la proporción de metanol de 16 a 80%.

Las fracciones de la No. 30 a la 60 con reacción positiva a Dragendorff, se reunieron en una sola y se les hizo cromatografía de papel utilizando diferentes solventes. En el sistema Butanol-ácido acético-agua (100:10:saturación) (4), desarrollado en unas 15 horas, tiempo en que el solvente recorrió 29.5 cm., se obtuvo una mancha, que al ser revelada con Dragendorff, corría casi con el frente, bastante alargada y con diferentes matices, pareciendo que había más de un alcaloide. $R_f=0.84$ (gráfica I).

A la fracción No. 125 también se le hizo cromatografía de papel en las mismas condiciones que la anterior observándose la presencia de dos manchas, una que corrió poco $R_f=0.09$ y otra con poca resolución cerca del frente. $R_f=0.94$.

Tratando de lograr la separación completa de lo que parecía ser más de un alcaloide se hizo una nueva cromatografía de columna con las fracciones de la No. 120 a la 130 de la columna anterior (que habían sido eluidas con éter etílico-metanol variando la proporción del --

CROMATOGRAFIA EN PAPEL



Fracción No. 30-60

Eluyente: Butanol-ácido acético-
 agua 100:10: saturación

Tiempo: 15 horas

$R_f = 0.84$

Escala $\frac{1}{2}$

Gráfica I

segundo del 32 al 64%), utilizando siempre Sílica gel de 100 "Mesh" y cambiando el gradiente de elución, al principio en forma rápida, variando las proporciones - de solvente en un 50% cada vez, pero 5 fracciones antes de llegar a la proporción de solvente en el cual habían aparecido las bases en la columna anterior, se redujo - la variación a un 5% con el objeto de lograr un cambio más gradual en el gradiente de elución y obtener mejor separación de las sustancias.

Las fracciones No. 19 y 37 que habían sido obtenidas con eluyentes de polaridad comprendida entre: benceno-éter de petróleo (80:20) y acetato de etilo-cloroformo, en cuya mezcla varió la proporción del 20. de un 10 a 100% daban reacción de alcaloides. Así mismo daban - reacción positiva las fracciones No. 90 a 118 que habían sido eluidas a partir de: éter etílico-metanol cuya proporción de metanol varió del 50 al 75%.

A las fracciones que resultaron positivas a Dragendorff se les hizo cromatografía de papel utilizando diferentes solventes como eluyentes, sin embargo seguimos obteniendo manchas sin resolución, lo que se debió a la falta de cámaras con temperatura regulada (8) produciendo, por lo tanto, durante el tiempo de corrimiento, que normalmente era entre las 5 p. m. de un día a las 8 a. m. del día siguiente, grandes cambios en el grado de sa-

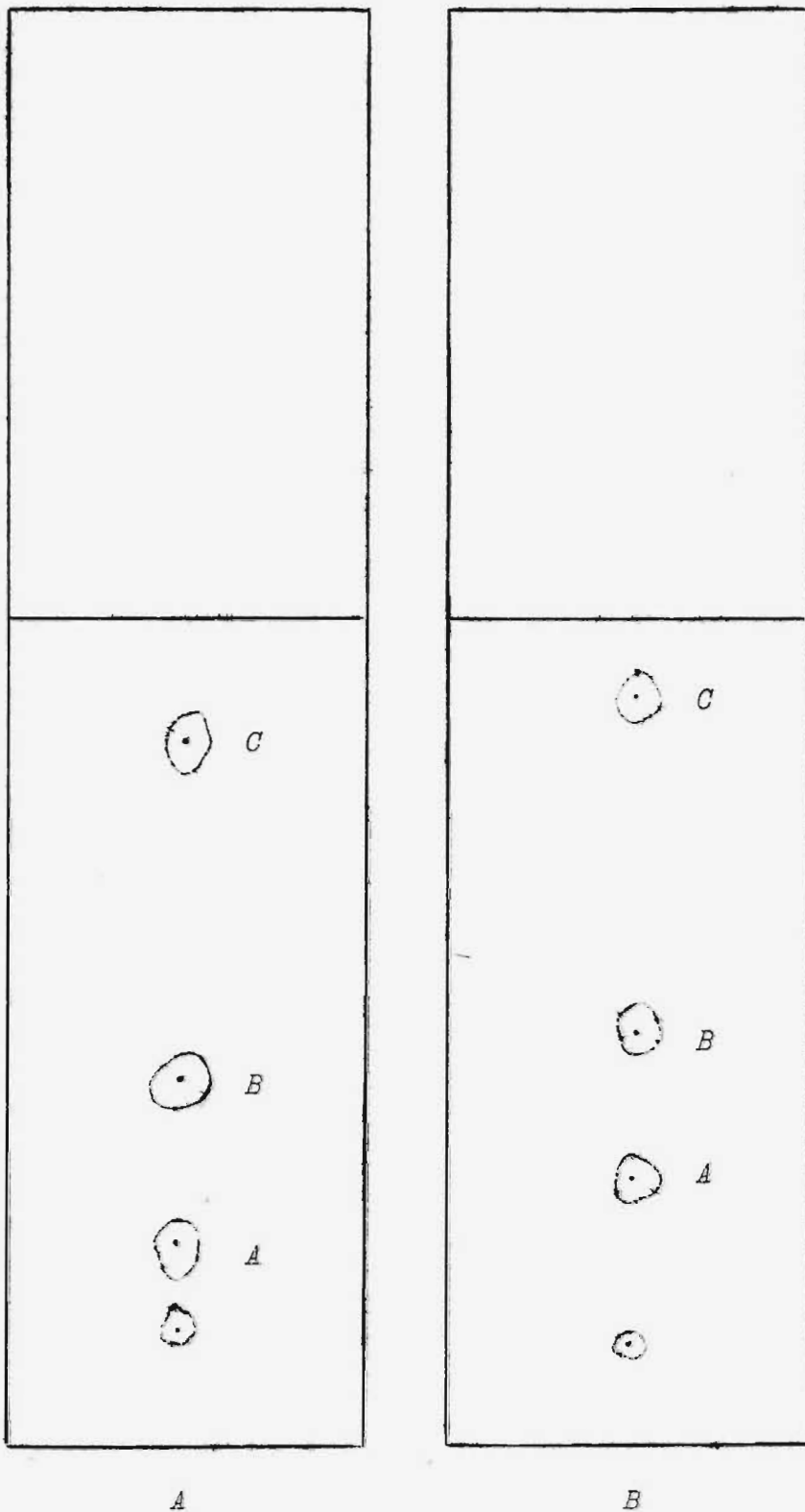
turación del tanque cromatográfico.

La introducción de la cromatografía en capa fina nos permitió, en este momento, confirmar la impresión que se tenía acerca de la cantidad de alcaloides presentes en las fracciones anteriores, ya que la cromatografía en capa fina, por desarrollarse en más corto tiempo, está menos expuesta a los cambios de temperatura, proporcionando, por otra parte, mayor resolución de las manchas debido a un mayor poder de adsorción. Así fue posible obtener en varios de los casos tres -- manchas bien definidas (gráfica II A) cuando en papel se obtenía una mancha sin resolución. (comparar con gráfica I).

Utilizando la fracción No 110 y probando una serie de eluyentes entre ellos los propuestos por Waldi (14) lo mismo que los reactivos reveladores de una variación del Dragendorff (3) y Yodo platinato (3). Se obtuvieron para el llamado solvente III por Waldi (ciclohexano-cloroformo-dietilamina 50:40:10) tres manchas, una cerca del frente (A), otra en el medio (B), y otra cerca del punto de referencia (C), cuyos Rf son $A=0.23$; $B=0.43$ y $C=0.93$. (gráfica II B).

Con objeto de obtener una cantidad de producto suficiente para hacer una investigación más profunda se --

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA



Cromatografía II-A

*Eluyente: Acetato
de Etilo-Benceno
75:25*

R_fs

A = 0.12

B = 0.23

C = 0.82

Cromatografía II-B

*Fracción No. 110
Eluyente: Ciclohexa
no-Cloroformo-dietil
amina 50:40:10*

R_f

A = 0.23

B = 0.43

C = 0.93

Gráfica II

obtuvo un nuevo extracto de sustancias básicas, por tratamiento del producto original que había sido extraído con alcohol, acidificado con HCl y alcalinizado con NH_4OH , con acetato de etilo en caliente. Por este método sólo extrajimos las bases que eran solubles en este disolvente, quedando en el residuo las bases solubles en otros.

Una nueva cromatografía en columna de los extractos anteriores, utilizando en esta ocasión Sílica gel de 0.08 mm. (Merck), dió fracciones con reacción débilmente positiva a Dragendorff a partir de la número 7 eluida con los solventes desde éter de petróleo-benceno 56%. Practicándose la cromatografía de capa fina con Silica gel G, a las fracciones No. 26 y No. 27 eluidas a partir de benceno-acetato de etilo en cuya mezcla la proporción del segundo variaba de 80%-100% y utilizando como eluyentes: acetato de etilo-benceno 70:30, se evidenciaban 3 manchas que como las obtenidas cuando se usó el solvente. Haciendo III por Waldi, denominamos compuestos A, B y C con valores de R_f A=0.40, B=0.70 y C=0.90.

Se trató además en estas mismas fracciones de identificar los alcaloides por el método propuesto por Waldi (14), utilizando como patrones Rodamina y los alcaloides Atropina y Quinina, corriéndolos en diferentes eluyentes propuestos por él, para poder comparar con los R_f dados en sus tablas para los diferentes alcaloides. Si se u-

utiliza el revelador de Yodo platinato se puede además identificar por coloración de la mancha. Debido a diferentes condiciones experimentales en la preparación de los platos, obtuvimos diferencias entre los R_f dados y los encontrados por nosotros.

El intento de obtener: picrato, acetato, benzoato, perclorato y nitroso derivados de las fracciones Nos. 26 y 27 no dió resultados positivos.

Las muestras Nos. 26, 27 y 28 se trataron de purificar en capa gruesa en un intento de separación de los productos A, B, y C que las componen, pero debido a que las cantidades que fueron aplicadas en el plato eran mayores de 80 mgr. por 25 gms. de Sílica, tampoco logramos la separación por este método. Los extractos de capa gruesa fueron reunidos en uno sólo y nuevamente cromatografiados en columna, utilizando Sílica gel de 0.08 mm. (Merck) y cambiando para algunos de los solventes el orden en que se habían usado los eluyentes en las columnas anteriores. Usamos ciclohexano entre éter de petróleo y benceno; y acetato de etilo después de cloroformo y éter etílico.

Dieron reacción positiva a Dragendorff las fracciones de la No. 22 a la No. 30 (éter de petróleo-ciclohexano 15:85, ciclohexano benceno del 10 al 30%) y de la No. 70 a la No. 86. (benceno-cloroformo del 70 al 100%, cloroformo-éter del

20 al 60%). En capa fina pudo verse que de la fracción No. 73 a la No. 83 se obtenían manchas más intensas y siempre había más de una en cada cromatograma.

En vista de la imposibilidad de separar los componentes del problema con los métodos anteriores se procedió a cambiar la Sílica gel usada para las columnas anteriores por Alúmina neutra de grado de actividad 11-111 y se usaron, cambiando la proporción en volúmen en un 10% cada vez, los solventes: éter de petróleo, tetracloruro de carbono, benceno, cloroformo, acetato de etilo, como eluyentes. Al efectuar reacciones de Dragendorff en las diferentes fracciones se obtuvo reacción positiva a partir de la fracción No 65 eluída con benceno-cloroformo (90:10). En cromatografía en capa fina daba mancha cercana al frente en las fracciones No. 65 a la No. 78 eluídas con la mezcla Benceno-cloroformo en la que se varió la proporción del segundo de 10 a 40%. A partir de la No. 79 (benceno-cloroformo al 40%) aparece un alcaloide en la parte media del plato, $R_f=0.42$ en solvente III (Waldi, loc. cit.) en algunas de las fracciones se ve además una mancha que corre poco del punto de aplicación, $R_f=0.11$. Los valores de R_f para algunas de las fracciones en solvente III pueden verse en la tabla I.

T A B L A I

| <u>Fracción No.</u> | <u>Rf.</u> | |
|---------------------|------------|------|
| 86 | 0.93 | |
| 96 | 0.29 | |
| 108 | 0.11 | 0.42 |
| 110 | 0.14 | 0.43 |

Valores de Rf. de diferentes fracciones en solvente III (ciclohexano-dietilamina-cloroformo 50:10:40).

En todas las fracciones que daban reacción positiva a Dragendorff quedaba una sustancia resinosa de color café rojizo cuando se evaporaba el solvente con el que había sido extraído de la columna, pero al cabo de algunos días encontramos que en las fracciones No. 98 a la No. 105 eluidas con benceno-cloroformo cuya proporción del segundo variaba del 70 al 100%, se habían formado unos cristales escamosos de color blanco, aunque coloreados por restos de sustancia resinosa. Se ensayaron varios solventes para tratar de recristalizar la sustancia, siendo el ciclohexano el mejor solvente de cristalización.

La sustancia que cristalizó corresponde a la que designamos B en cromatografía de capa fina y en vista de que se encontraba en mayor proporción en el extracto y -

que cristalizaba, más fácilmente, lo que nos permitiría realizar un estudio más profundo de la misma, concentramos nuestro estudio en este producto.

Haciendo cromatografía en capa fina a la sustancia recristalizada obtuvimos una mancha con $R_f=0.42$ en solvente III (Waldi).

El punto de fusión de este compuesto cristalizado de ciclohexano nos dió 77-78°. Sin embargo tomándole nuevo punto de fusión a una muestra que suponíamos de la misma sustancia y que cristalizamos en el mismo solvente nos encontramos con que éste era diferente dándonos un valor de 90-91°C. Esto nos hizo sospechar que la sustancia había sufrido alguna alteración o que había algo que la impurificaba.

Los resultados de los análisis espectrográficos nos dieron un motivo más para pensar que la sustancia llamada B, que en capa fina parecía ser una sola, estaba constituida por una mezcla de dos compuestos, X y Z, muy semejantes en su constitución química como veremos seguidamente.

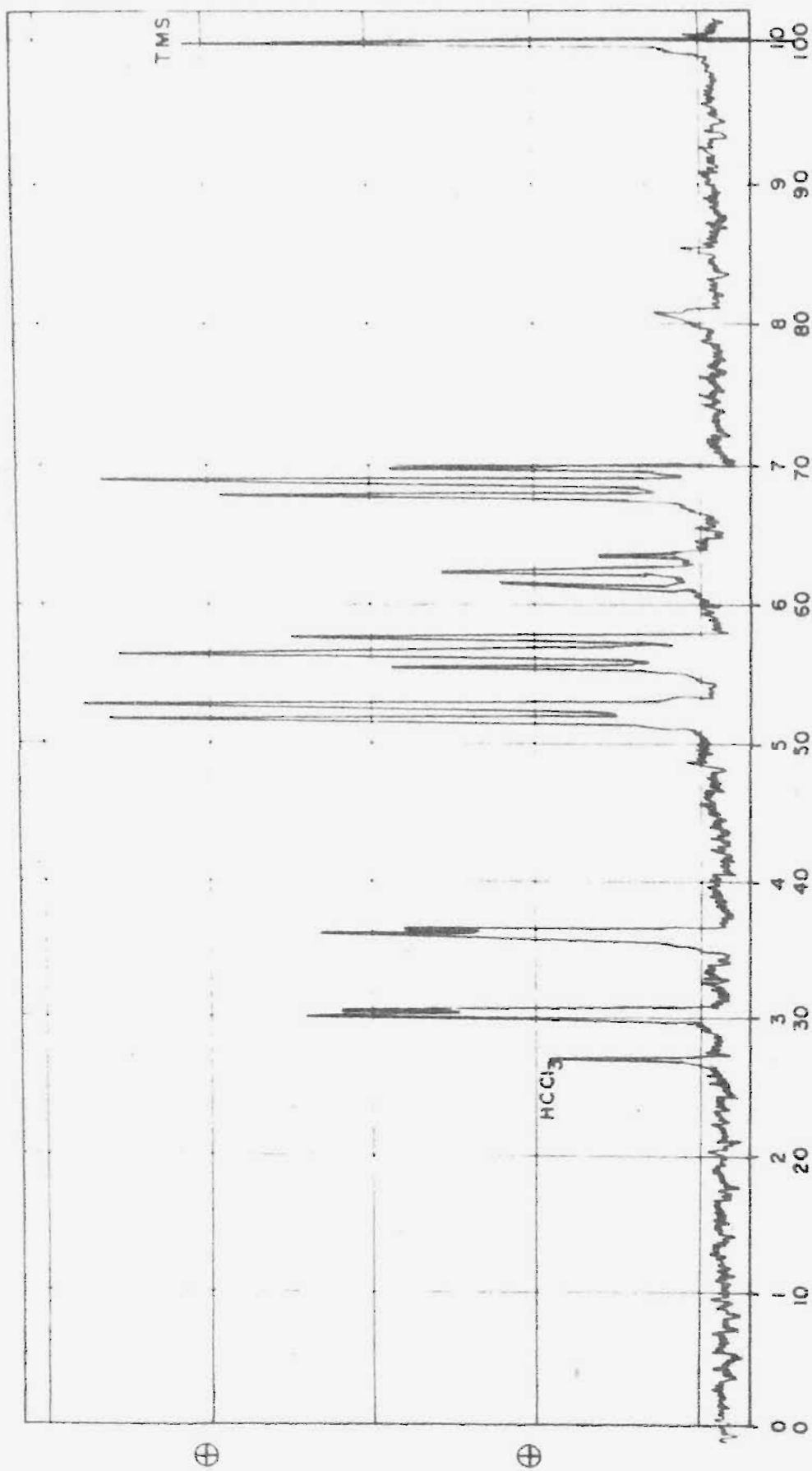
III.- ESTUDIO ESPECTROGRAFICO DE LAS SUSTANCIAS X y Z.

Diferentes medios espectrográficos se utilizaron con el objeto de determinar la estructura de estas sustancias. Así se utilizó Resonancia Magnética Nuclear (X y Z), Infrarrojo (X y Z), Ultravioleta (Z) y Espectrometría de Masa (X). Estudiando con detalle el análisis espectrográfico de cada uno de ellos

COMPUESTO X

Estudio del espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) graf. III. Se observan las siguientes absorciones: un pico pequeño para $\tau=2.75$ ppm, - correspondiente a cloroformo y el cual no volveremos a comentar por no tener influencia ninguna en la estructura del compuesto. Después nos aparecen dos dupletes para $\tau=3.03$ y 3.67 ppm, con un peso de un protón para cada uno siendo en ambos la constante de acoplamiento $J=1.8$ c/seg. lo que nos acusa la presencia de un $-CH=CH-$. Ya que al tener los dos dupletes la misma constante de acoplamiento nos demuestra que son dos protones vecinos que se interfieren entre si (13) y por su posición en el espectro acusa la presencia probable de un doble enlace. Nos encontramos después un duplete para $\tau=5.25$ y tres tripletes para $\tau=5.57$, 6.28 , 6.91 . Por comparación de este espectro con el del compuesto Z (gráfica IV) hemos deducido que el duplete a 5.25 se interfiere con el triplete a 6.28 - puesto que en el compuesto Z no están desdoblados presentándose en forma de singletes. Esta deducción que se ha hecho en base a la similitud que presentan las sustancias no sólo en estos aspectos sino también en su comportamiento cromatográfico, es la más adecuada para este conjunto de picos que presentan todos ellos la misma constante de acoplamiento de 6 cic/seg.. Entonces del acoplamiento del duplete a 5.25 con el -

Gráfica III
ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR
PARA COMPUESTO X





triplete a 6.28 con peso de 1 y 2 protones respectivamente se deduce la existencia de un $R-CH-CH_2-R'$, siendo probablemente uno de los R un grupo carbonilo. En cuanto a los tripletes a 5.57 y 6.91 con peso de 2 protones c/u que por comparación similar al del espectro Z vienen en ambos compuestos desdoblados hemos de deducir la presencia de un grupo $-CH_2 - CH_2 -$.

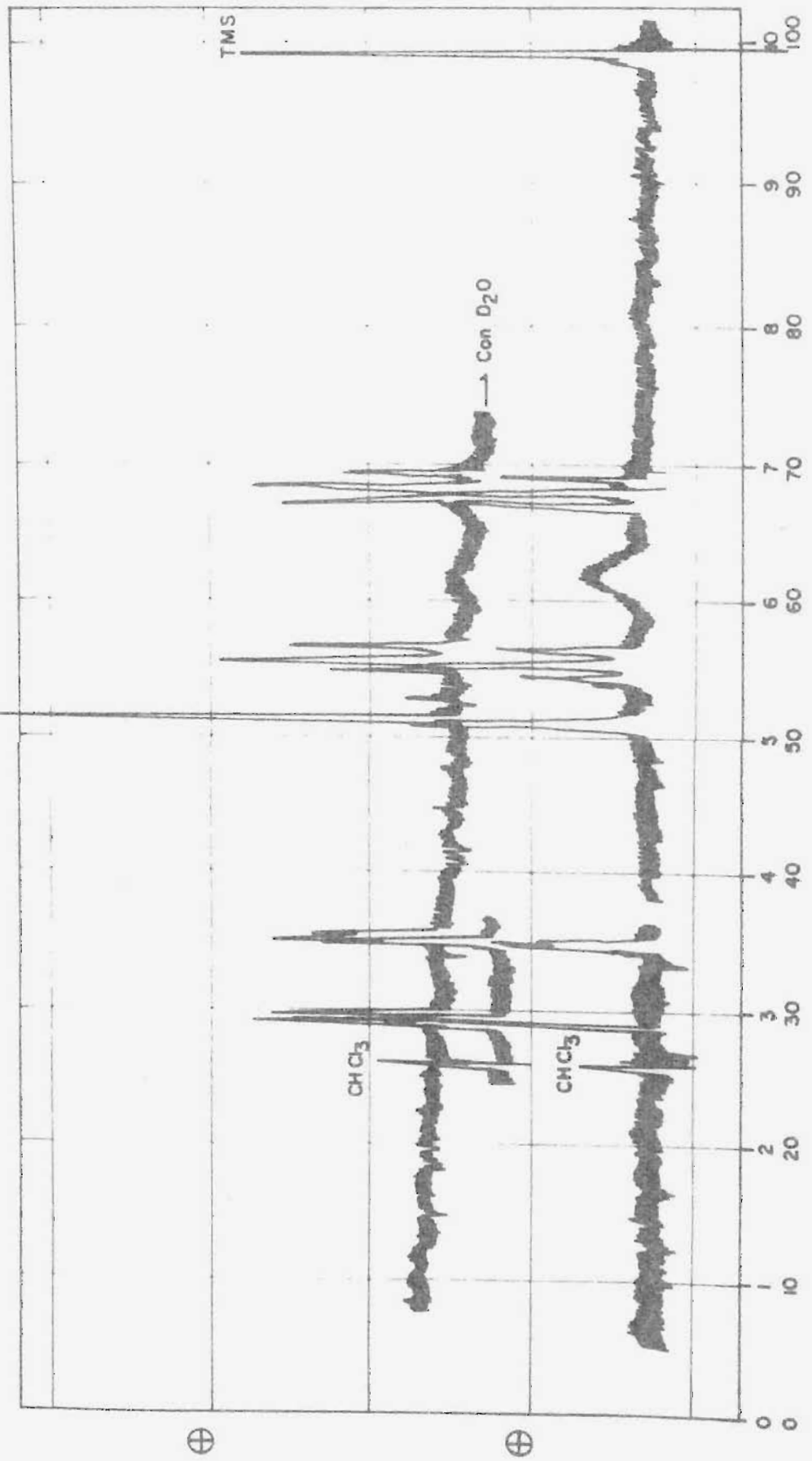
ESPECTRO INFRARROJO.- Este presenta similares características al del compuesto Z que comentamos ampliamente más adelante. Presentando solamente diferencias en la "huella digital" evidenciando así sus constituciones distintas y mayor intensidad en una serie de picos comunes con aquel (1560 cm^{-1} ; 1490 cm^{-1} , etc.).

ESPECTROMETRIA DE MASA.- Dadas las condiciones en que se verificó, se pudo solamente estudiar el peso molecular que fue de 151.

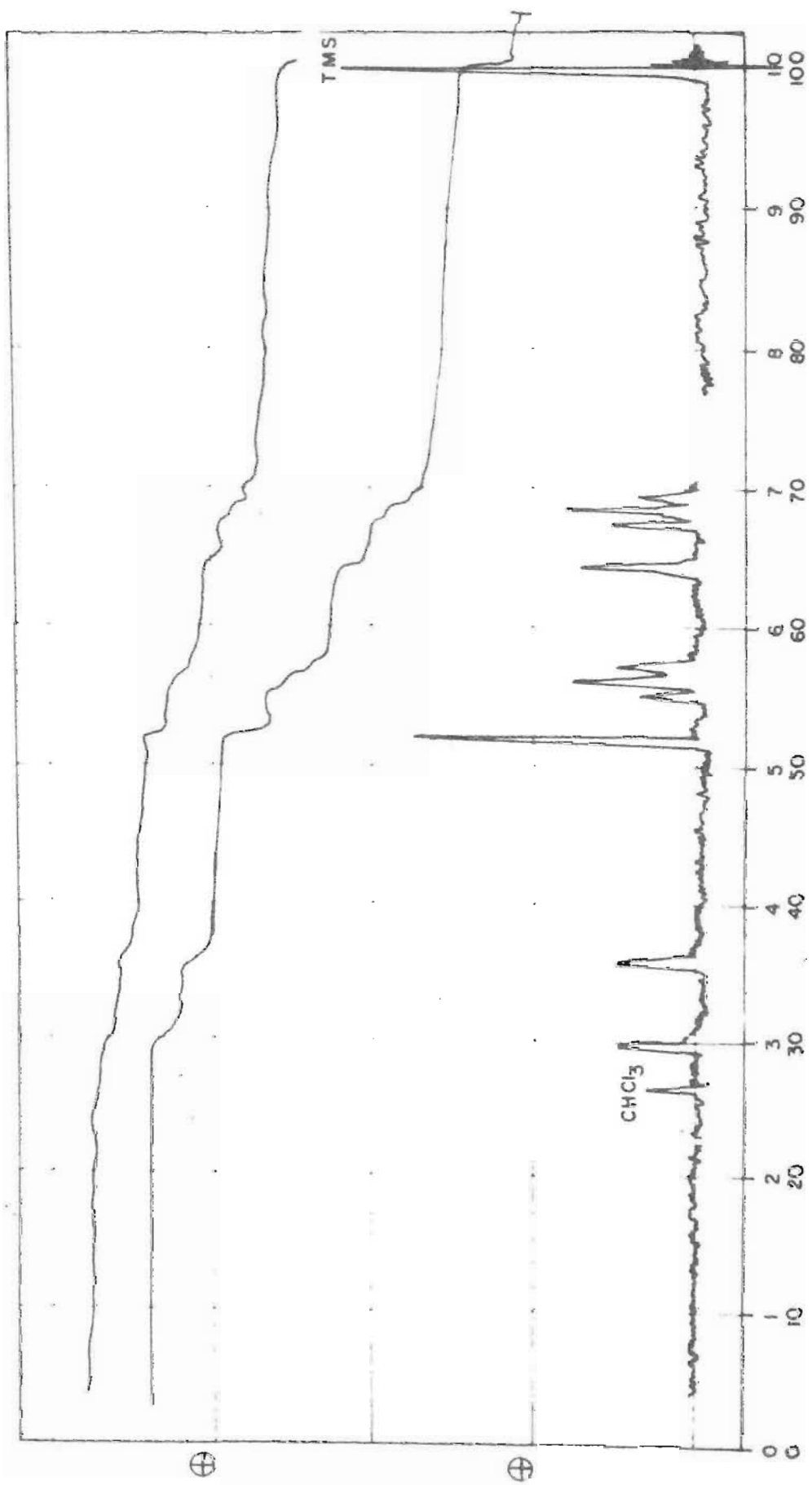
COMPUESTO Z

Estudio del espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (gráfica IV y V). Para $\tau = 2.97$ y 3.56 se observa la presencia de dos picos con tendencia a desdoblarse con constante de acoplamiento $J=1.8$ ciclos/seg. con un peso de un protón cada uno lo que nos indica la posible presencia de un grupo $R-CH = CH - R$ similar al

Gráfica IV
ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR
DEL COMPUESTO Z



Gráfica V
ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR
COMPUESTO Z

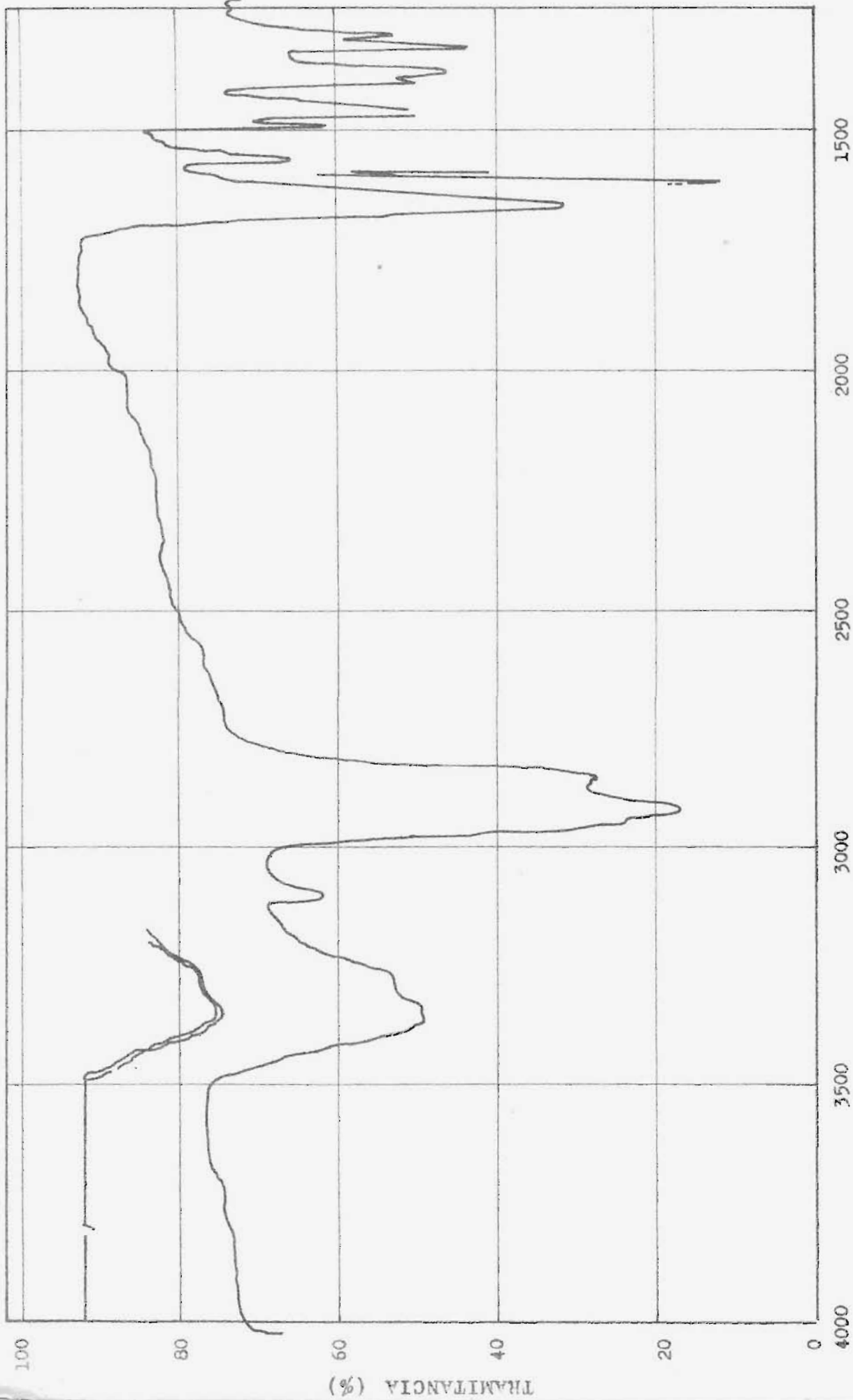


compuesto X pudiendo ser R igual a CO-NH- ó similar. El que J sea igual para los dos dupletes nos demuestra de forma definitiva que esos dos protones están en posiciones vecinas e interfieren uno al otro en la forma que habíamos primeramente interpretado para el compuesto X. Un tercer pico para $\tau = 5.23$ con peso de protones igual a dos de acuerdo con la integral, no presentan desdoblamiento lo que adscribimos a un CH_2 aislado o a un $=\text{CH}_2$.

Para $\tau = 5.64$ nos aparece un triplete con constante de acoplamiento $J=6$ cic/seg. y un peso de dos protones nos indica que está desdoblado por un CH_2 vecino, esto viene confirmado por el triplete a 6.89 peso también de dos protones y constante de acoplamiento J, también de 6 sic/seg., que nos confirma de forma definitiva la presencia de un grupo $\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}'$. Por último un pico a 6.48 que desaparece por tratamiento de la solución de deuterio-cloroformo con D_2O acusándonos la presencia de un grupo OH o NH (gráfica IV).

INFRARROJO DEL COMPUESTO Z. (Gráfica VI). Tabla II. En el estado sólido el espectro entre $4000 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ se observaron los siguientes picos no resueltos para bandas de 3370 y 3260 cm^{-1} indicándonos la presencia de grupos OH - ó NH en la molécula. Observamos también un pico a 3100 cm^{-1} que desaparece en solución (gráfica VIII) por lo cual se deduce que es debido a alguna interacción intermolecular.- Después observamos un pico grande y ancho -

Gráfica VI



ESPECTRO INFRARROJO SOLIDO (NUJOL) COMPUESTO Z

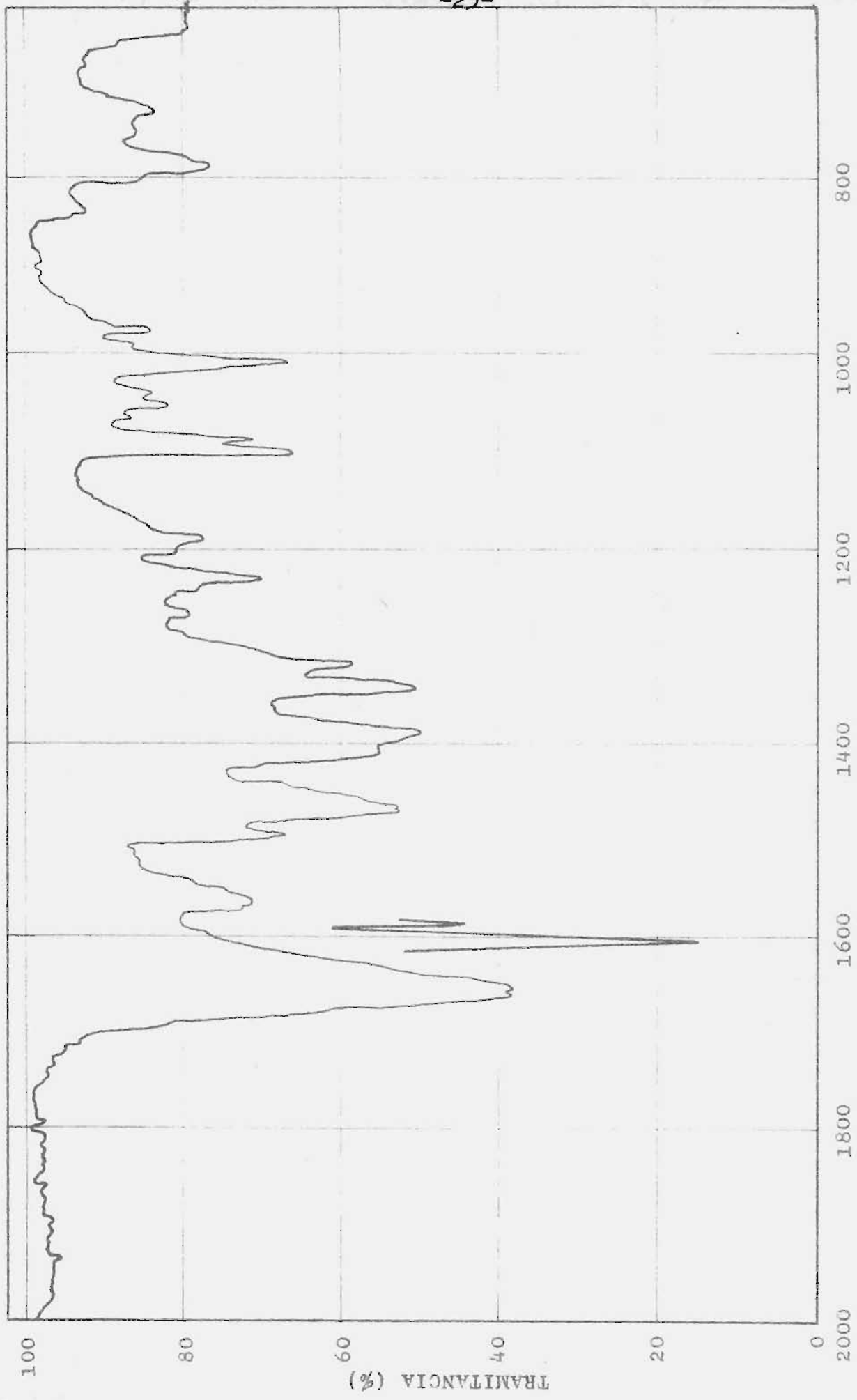
TABLA II

TABLA DE ABSORCION EN ESPECTROMETRIA INFRARROJA

| ESTADO | | ASIGNAMIENTO | REFERENCIA (12) |
|----------------------------|-----------------------------|---|-----------------|
| Sólido cm ⁻¹ | Líquido cm ⁻¹ | | |
| 3370 | 3600 3400 | Entre 3500 - 3300 cm ⁻¹ libre o asociado: NH ₂ , NH C=NH | Tabla 7-1, 7-2 |
| 3360 | | Entre 3400 - 3200 cm ⁻¹ OH - polimérico o en puente de H | Tabla 5 y 6 |
| 3100 | | C = C = H | |
| 1650 | 1680 1604 | 1690 a 1640 cm ⁻¹ C=N - ó C= NH grupos CO - | Tabla 7 y 9 |
| 1560 | 1565 | Entre 1640 - 1560 R-NH ₂ | Tabla 7 |
| 1380 | 1399 | | |
| 1330 | 1315 1338 | | |
| 1305 | 1305 | | |
| 1255 | | | |
| 1217 | | | |
| 1175 | | | |
| 1183 | | | |
| 1070 | 1078 1047 | | |
| 990 | | Puede ser un alifático NO | |
| 955 | | | |
| 828 | | C = CH ₂ | |
| 780 | | | |

a 2900 cm^{-1} no resuelto que es clásico para los espectros hechos en Nujol siendo el mismo adscrito a este último compuesto. Se observa después una serie de picos en la región comprendida entre 1700 y 1400 cm^{-1} que pueden ser vistos en forma más amplia en la gráfica siguiente. (gráfica VII). Esta, comprende la región del infrarrojo entre las bandas de 2000 a 600 cm^{-1} en ella observamos un pico con tendencia a desdoblarse a 1650 cm^{-1} que adscribimos a un grupo $-\text{CO}\cdot\text{C}=\text{C}-$ o un grupo lactama. Se observa después un pico a 1560 cm^{-1} debido probablemente a un overtone. Nos aparece inmediatamente la región llamada de la "huella digital" comprendida de $1500 - 1100\text{ cm}^{-1}$. Es esta región, muy difícil de interpretar, incluso para expertos, ya que depende enteramente de la estructura de la molécula siendo la misma una comprobación de la estructura final. Entre las longitudes de onda de 1000 y 600 cm^{-1} observamos un pico a 990 cm^{-1} que nos detecta la posible presencia de grupos $-\text{C}=\text{C}-$ o la de grupos $\text{R}-\text{NH}_2$ al igual que los otros picos a 850 y 790 cm^{-1} .

Comentaremos ahora el espectro en solución en cloroforno de la misma sustancia. Observamos (gráfica VIII y IX) que el pico que en estado sólido nos daba a 3370 cm^{-1} y 3260 cm^{-1} ahora nos aparece en forma de un solo pico ancho a 3400 y un pico pequeño a 3600 cm^{-1} indicándonos así la presencia de un H en forma de OH o NH, formando puente de hidrógeno con tendencia a liberarlo como nos indica este último pico que comentábamos de 3600 cm^{-1} -



ESPECTRO INFRARROJO SOLIDO (NUJOL) COMPUESTO Z

GRUPO 142

Aparecen después de 3120 cm^{-1} y a 2400 cm^{-1} unos picos que están dibujados por trazos discontinuos que son debidos a HCCl_3 y que por lo tanto no comentaremos.

En la gráfica del espectro hecho en solución para las bandas comprendidas entre 2000 y 600 cm^{-1} (gráfica IX). Observamos un pico a 1680 cm^{-1} ancho y de gran intensidad que adscribimos con el que aparecía en el espectro hecho en Nujol de 1650 cm^{-1} a la presencia de los grupos CO-C=C ó lactama. La anchura del pico nos permite sospechar la presencia de ambos grupos en la molécula. El desplazamiento de 1650 a 1680 cm^{-1} en la absorción es una variación lógica que se observa al pasar la molécula del estado sólido a un estado de solución donde la molécula más libre permite tener vibraciones de longitud de onda más corta.

El resto es la región de "huella digital" entre 1400 a 1000 cm^{-1} y desde este al final tampoco podemos obtener ninguna información debido a las absorciones correspondientes al cloroformo.

A partir de estos datos podemos concluir que esta sustancia presenta un anillo hexagonal, piperidínico, ya que si fuera del tipo pirrol o indólico aparecería a 3400 cm^{-1} una absorción fuerte y aguda que no es nuestro caso, por otra parte el pico a 1670 cm^{-1} que hemos ya comentado está de acuerdo totalmente con la absorción de una lacta-

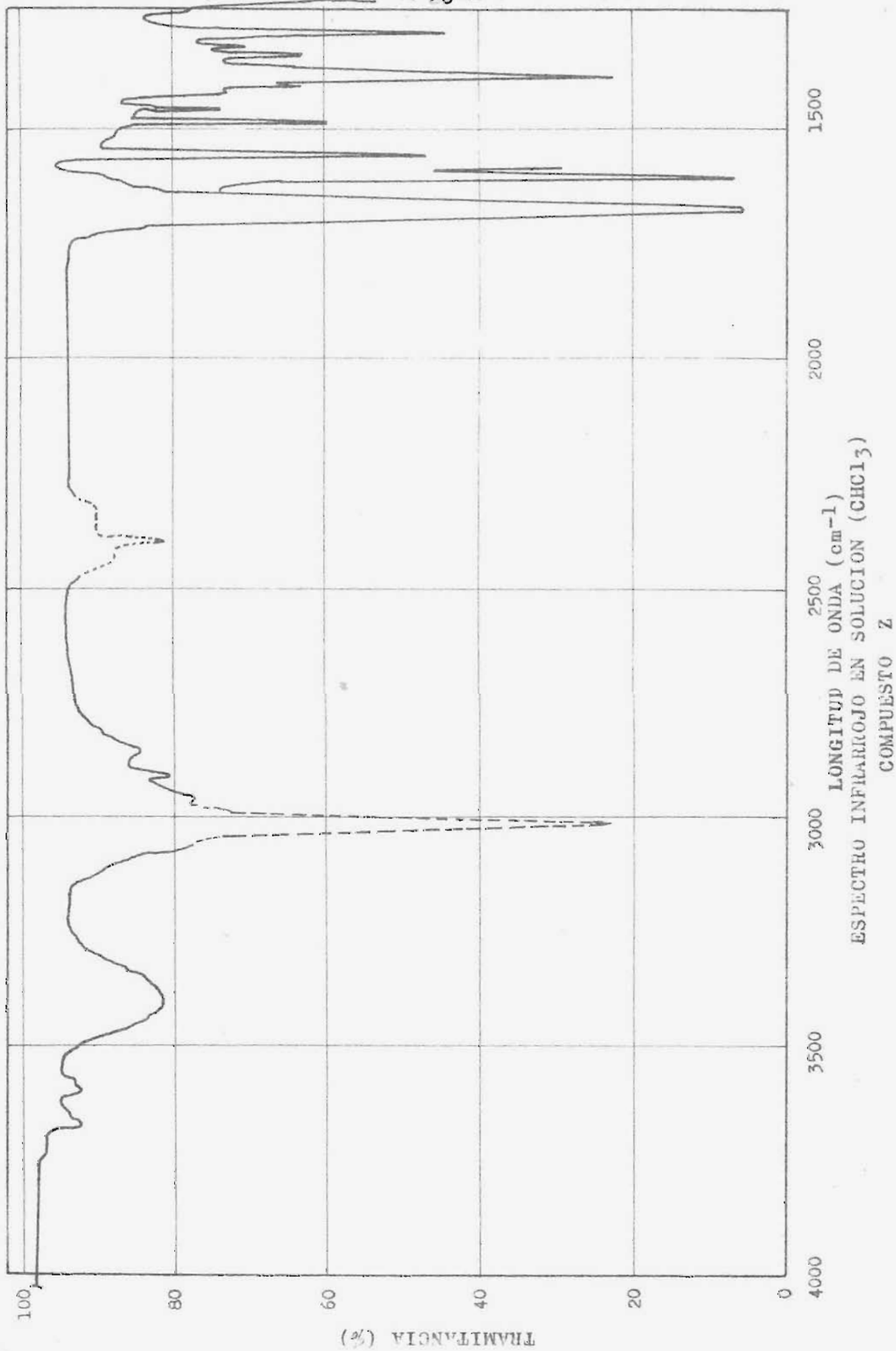
ma hexagonal α , β insaturada (2) y la presencia de un grupo NH, detectado en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear, viene aquí confirmada por las absorciones a 1580-1490 cm^{-1} .

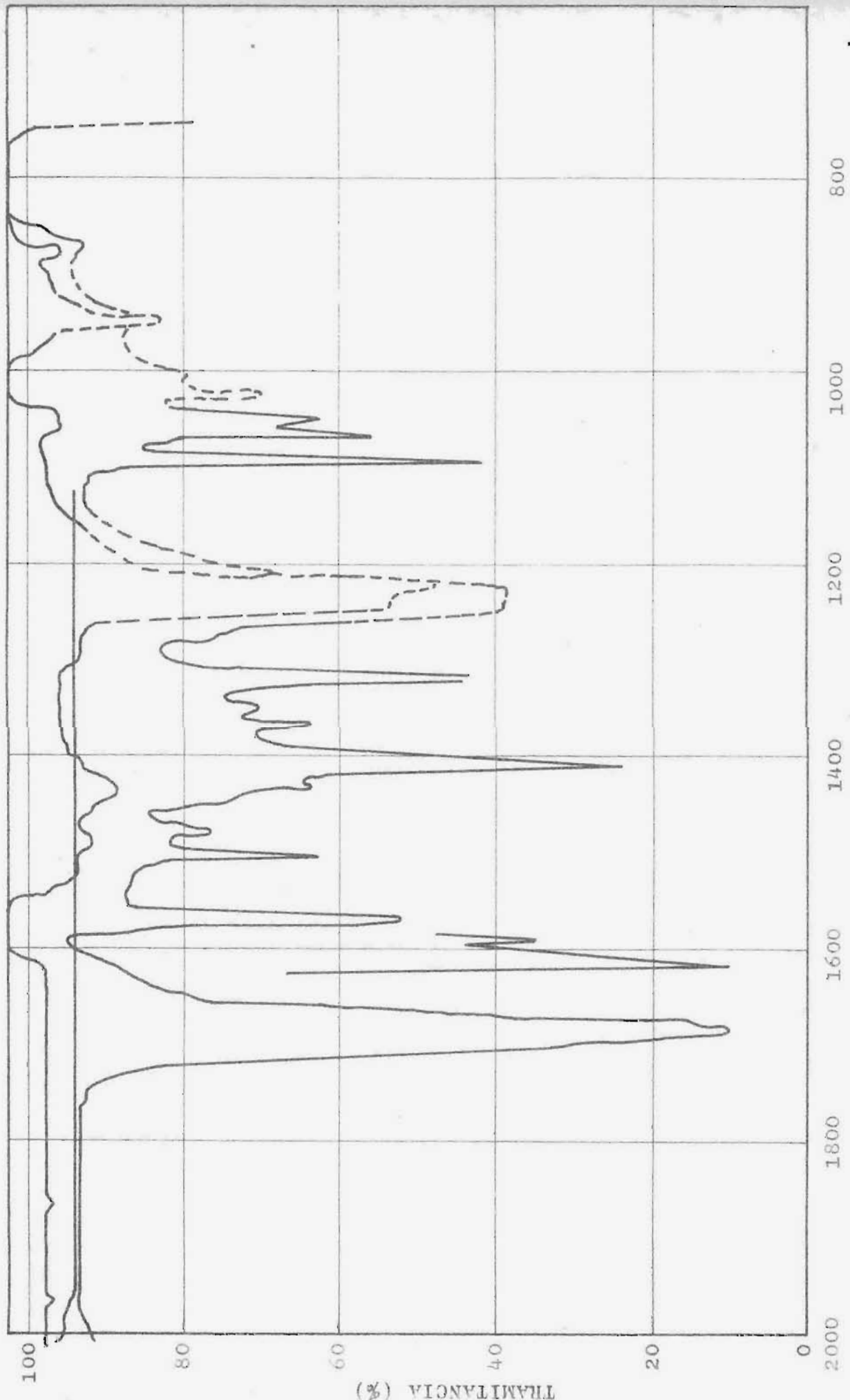
Ultravioleta hecho en etanol. $\lambda_{\text{max.}} 289 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 2250$)
(gráfica X)

De los anteriores estudios espectrográficos podemos deducir lo siguiente:

1o.-Que el compuesto X, que tiene un PM-151, revela en su molécula, la presencia de los grupos $-\text{CH}=\text{CH}-$ y un $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y un $\text{CH}-\text{CH}_2$ más un N. dándonos los grupos detectables un peso de 95. La diferencia 56 corresponde a los pesos de dos grupos C, O, lo que está de acuerdo con el valor de 151 encontrado, y a partir de estos hechos, de acuerdo con datos experimentales espectrográficos, proponemos para el compuesto X la siguiente fórmula empírica $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$, lo que se demostró por los análisis. Pendientes de un estudio por R.M.N. en D_2O el que podamos determinar su estructura final.

2o.-Que el compuesto Z tiene gran similitud con la sustancia X como se ha visto por su estudio. La única diferencia fundamental observable es en un no desdoblamiento de los grupos correspondientes a las absorciones $\tau = 5.23$ y 6.48 a-





ESPECTRO INFRARROJO EN SOLUCION (CHCl₃)
COMPUESTO Z

Gráfica X



LONGITUD DE ONDA
ESPECTRO ULTRAVIOLETA COMPUESTO Z

cusándonos la presencia de un CH_2 aislado o un $=\text{CH}_2$ aislado y posible NH u OH .

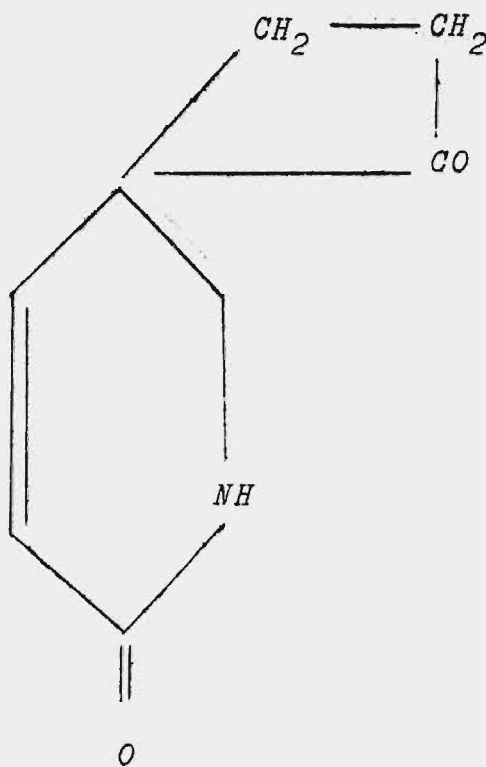
De todo esto podemos deducir la similitud de los compuestos X y Z , pero también su indiscutible diferencia. Se comprueba la presencia en ambas sustancias de una lactama cíclica con un anillo de no menos de seis miembros (16) la presencia de dobles enlaces detectados por infrarrojo y resonancia magnética nuclear y la presencia en ambas moléculas de los grupos $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}'$.

En el caso del compuesto X la presencia de nueve Hidrógenos detectada por el espectro de Resonancia Magnética Nuclear es confirmada por su análisis que concuerda con una fórmula $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$. Por lo que los grupos presentes en esta molécula son los siguientes: un grupo lactama α, β conjugada, el grupo $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$ ya mencionado; un grupo $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-$ y el grupo $\text{R}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{R}'$. Teniendo en cuenta lo anterior y no habiéndose encontrado en la literatura ningún producto similar al descrito proponemos para este compuesto X el nombre de LOROQUINA necesitando solamente una investigación por espectrometría de masa y R. M. N. en deuterio cloroformo para proponer definitivamente su fórmula estructural.

En el caso del compuesto Z que presenta los grupos anteriores con la diferencia de que el último es un $\text{R}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{R}'$,



tampoco ha sido descrito por lo que lo denominamos **LOROCINA** proponiéndole la fórmula 1 como fórmula estructural.



FORMULA 1

Necesitando ésta una posterior confirmación por degradación y síntesis.

IV.-PRUEBAS FARMACOLOGICAS

Las pruebas farmacológicas consistieron en probar acción sobre la presión arterial, primero con extracto original y luego con la sustancia purificada y cristalizada para ver si presentaban el mismo efecto.

Cuando se trabajó con gatos anestesiados con Nembutal (40 mg./Kg de peso) y se les hizo registros de presión arterial (carótida primitiva) en un quimógrafo, inyectándole por la yugular externa solución acuosa del extracto básico original, el resultado obtenido fue: caída de la presión arterial, que desaparecía al inyectar Atropina. Este comportamiento de producción de hipotensión - bloqueada por Atropina nos hizo sospechar la presencia de una sustancia que actuaba imitando la acción del parasimpático, por lo que podríamos considerarla parasimpaticomimética, ya que la Atropina bloquea las acciones muscarínicas del parasimpático (9)

Cuando se trató un gato en las mismas condiciones que las anteriores, pero inyectándole la sustancia purifi-

cada y cristalizada en vez del extracto original, no se observaron cambios en la presión arterial.

Tratando de conseguir más datos para obtener conclusiones, se hicieron pruebas con intestinos aislado de conejo, porción de duodeno, colocado en un reservorio de solución de Look^{*} a FH 7.4, 37°C. y haciéndole pasar aire, el intestino fue conectado a un traductor y éste a un polígrafo para registrar los movimientos peristálticos. Se hizo un registro control y cuando se añadieron al medio en que se encontraba el intestino diferentes fracciones con reacción positiva de alcaloides procedentes de la última cromatografía de columna, se observó una marcada relajación y al mismo tiempo disminución de las ondas peristálticas. Por el contrario cuando la sustancia agregada fue la que habíamos aislado y logrado cristalizar, no hubo cambios perceptibles.

Estos resultados no nos permiten sacar ninguna conclusión de tipo farmacológico. Demostrándonos únicamente que **no** son los compuestos X y Z aislados los que presentan las propiedades alteradoras.

*Solución de Look.

| | | | |
|--------------------------------------|-----|--------------------|------|
| NaCl | 25% | MgCl ₂ | 2.5% |
| KCl | 10% | NaHCO ₃ | 5% |
| | | Glucosa | 5% |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 5% | | |

V.-PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión están sin corregir. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron hechos en un Perkin Elmer A-60 en solución de Deuterio-Cloroformo utilizando tetrametilsilano como standard interno. Los espectros infrarrojos fueron hechos en un Perkin Elmer - mod. 237. Los análisis fueron realizados por el Sr. J. Camerón del Depto. de Química de la Universidad de Glasgow a quien le damos las gracias.

Extracción de sustancias básicas. 15.4 Kgs. de raíz seca y fragmentada fueron sometidos a maceración con alcohol, por 15 días, al cabo de este tiempo los extractos alcohólicos fueron concentrados a vacío, el residuo tratado con HCl 1 N y las sustancias no solubles filtradas. La solución ácida fue ligeramente alcalinizada con NH₄ OH 1 N. Dándonos un volumen total de 2 lts.

Las primeras extracciones de la base se hicieron, utili-

zando 200 ml. de la solución alcalina anterior, con diferentes solventes en frío: benceno, cloroformo, acetato de etilo, éter etílico. Encontrándose que cloroformo y acetato de etilo extraían en mayor proporción las bases, mientras que el benceno y éter lo hacían en cantidades insignificantes. Se emplearon en cada ocasión 25 ml. de la solución alcalina y 25 ml. de uno de los solventes mencionados hasta que la solución era agotada para este determinado solvente, lo que se comprobaba con el reactivo de Dragendorff. Cuando la extracción de las bases fue completa se reunieron todos los solventes que hicieron un volumen de 750 ml. y se evaporaron al vacío, obteniéndose una sustancia parda, de aspecto siruposo cuyo peso era de 2.5 gms.

CROMATOGRAFIA

Cromatografía en columna de los extractos originales. 2 gramos de este extracto fueron cromatografiados en columna, empleando 20 gr. de Sílica gel (Mallinckrodt), de 100 "Mesh". La columna fue preparada con éter de petróleo (60-80°), la elución se comenzó con 250 ml. de éter de petróleo y luego variando la proporción en volumen un 16% cada vez. Se usaron los solventes: éter de petróleo, benceno, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico y metanol.

Las fracciones de la No. 30 a la No. 60 de esta columna, eluidas con benceno-acetato de etilo variando la -

proporción del último desde un 16 a un 100%, dieron reacción positiva a Dragendorff. Así mismo se obtuvo reacción positiva a este reactivo en las fracciones No. 116 a No. 135 eulidas con : éter etílico 100% y la mezcla éter etílico-metanol del 16 al 80%. Las fracciones No. 30 a la No. 60 fueron reunidas en una sola y evaporadas, obteniéndose 0,2 gr. de sustancia.

Cromatografía en papel. A las bases resultantes se les hizo cromatografía en papel ascendente, utilizando en todos los casos papel Whatman No 1 en tiras de 35 X 4 cm. y como revelador reactivo de Dragendorff desarrollándolas durante 15 horas con temperaturas que oscilaban de 26°C a 24°C. Los eluyentes utilizados fueron formados por combinaciones diferentes de butanol, ácido acético y agua.

Cromatografía A.- Solvente: butanol-acético-agua 4:1:5. Se obtiene una mancha alargada con diferentes matices con un $R_f=0.82$.

Cromatografía B.- En idénticas condiciones que la anterior usando n-butanol-acético-agua (10:4:saturación). Mancha poco definida $R_f=0.75$.

Cromatografía C.- En esta cromatografía se varió el tamaño del papel, 40 cm. de largo por 10 de ancho y la pro-

porción del solvente butanol-acético-agua (100:10:saturación) $R_f=0.84$.

Para la fracción No. 125 se usó eluyente butanol-acético-agua (100:10:saturación), haciendo el recorrido en 15 hs. Las dimensiones del papel empleado fueron de 40 cm. de largo por 10 cm. de ancho. Se obtienen dos manchas, una se va con el frente y la otra con $R_f=0.09$.

Nuevo Fraccionamiento Cromatográfico.-Las fracciones de la No. 120 a la 130 de la columna anterior que habían sido eluidas con la mezcla éter etílico-metanol variando la proporción del segundo de 32 al 64%, fueron reunidas y evaporadas, dieron un peso de 0.6 gr., se les hizo nueva cromatografía de columna con 30 gr. de Sílica gel (Mallinckrodt) de 100 "Mesh". La columna se preparó con éter de petróleo (60°-80°) usando como eluyente 200 ml. de los siguientes solventes y combinaciones entre ellos: éter de petróleo, benceno, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, metanol, en proporciones de 50 ml. c/u y variando la proporción en volumen en un 50%, de éter de petróleo o cloroformo y a partir de éter etílico se varió la proporción en un 5% en volumen.

Al hacer pruebas de Dragendorff a las diferentes frac-

ciones se encontraron positivas de la No. 19 a la No. 37, eluidas a partir de benceno-éter de petróleo (80:20) y a acetato de etilo-cloroformo en el que la proporción del 2o. varió de un 10 a 100% y de la No. 90 a la No. 118 eluidas con éter etílico-metanol en el que la proporción de metanol varió de 50 a 75%.

Cromatografía en papel.- A la fracción No. 90 se le hizo cromatografía de papel en Whatman No. 1 de 35 cm. de largo por 4 cm. de ancho, el eluyente fue butanol-acético-agua (100:4:saturación), el revelador Dragendorff, tiempo de recorrido de 15 horas, resultando una mancha alargada sin resolución.

Cromatografía en capa fina.-Cromatografía de capa fina se hizo con la fracción No. 110 de la columna anterior, utilizando platos de vidrio de 20 cm. de largo por 5 cm. de ancho que se prepararon con Sílica gel G. (Merck) 30 gr. - para 60 gr. de agua, para cada 20 platos, dándoles un espesor 0.25 mm. y secándolas a la temperatura ambiente.

Se hicieron varias cromatografías y para todas se usó Dragendorff modificado como revelador. Se emplearon varios eluyentes encontrándose que con acetato de etilo-benceno - 75:25 aparecían tres manchas a diferentes niveles A, B y C cuyos Rf eran: A=0.12; B=0.35 y C=0.82. En otra cromatogra-

fla en la que se usó como eluyente el solvente III de Waldi (Ciclohexano-dietilamina-cloroformo 50:10:40), se revelaron con Dragendorff tres manchas de Rf A=0.23, B=0.43 y C=0.93 .

Nueva extracción de compuestos básicos.-De los restantes 1800 ml. de solución alcalina original se llevó a cabo, en un extractor líquido-líquido de 200 ml. de capacidad con acetato de etilo en caliente, una nueva extracción hasta que las sustancias básicas fueron agotadas. Se obtuvo un volumen de 600 ml. de acetato de etilo que fueron evaporados al vacío hasta un volumen de 100 ml. y luego con lámpara de rayos infrarrojos hasta tener una masa oscura de aspecto resinoso que dió un peso de 48.5 gr.

Cromatografía en columna de nueva extracción.- 5 gramos de este extracto fueron cromatografiados en columna con 130 gr. de Sílica gel (Merck) de 0.08 mm. Esta columna al igual que las anteriores se preparó con éter de petróleo (60-80°) usándose 2 fracciones de 200 ml. c/u de los solventes: éter de petróleo, benceno, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, metanol, cambiando las proporciones en volumen en un 10% c/vez

A partir de la fracción No. 7 eluída con éter de petróleo-benceno al 55% se comienza a obtener reacción débilmente positiva a Dragendorff, siendo más intensa a partir de la No. 22 a la No. 31, eluídas con mezcla de benceno-acetato de etilo, cu-

ya proporción de acetato variaba de 30 a 100% y con acetato de etilo-cloroformo (90:10) .

Las fracciones No. 26 y No.27 que habían sido eluidas con benceno-acetato de etilo al 80% y que pesaron al ser evaporadas respectivamente, 0.480 gr. y 0.421 gr. fueron reunidas en una sola.

Cromatografía en Capa Fina de la mezcla de fracciones Nos. 26 y 27. Parte de la mezcla de fracciones Nos. 26 y 27 fue cromatografiada en capa fina usando como eluyente acetato de etilo-benceno (70:30). Al ser revelada con Dragendorff - dió 3 manchas con los siguientes R_f : A=0.40, B=0.70 y C=0.90. Estas mismas fracciones en cromatografía de capa fina y usando los solventes propuestos por Waldi fueron comparados con Rodamina, Atropina y Quinina, pero los resultados no fueron satisfactorios.

Intento de purificación por Cromatografía en Capa Gruesa y Columna.- Lo que aún nos quedaba de la mezcla de las fracciones Nos. 26 y 27 se unieron a la No. 28 y se les hizo cromatografía de capa gruesa, tratando de lograr la separación de los compuestos A, B y C de los que parecían estar constituidas. 6 platos de vidrio de 20 por 20 cm. fueron cubiertos con una mezcla preparada con 25 gr. de Sílica gel G y 40 gramos de agua cada uno. La base disuelta en benceno fue colocada en el plato y eluida con acetato de etilo -

benceno (70:30). Al ser retirados de las cámaras y secados a la temperatura ambiente se observó que no había habido separación completa, se cortó la región de Sílica que contenía las bases, se lavó con acetato de etilo, se evaporó el solvente obteniéndose 0.47 gms. de sustancia que fueron cromatografiados en columna con 12.5 grms. de Sílica gel (Merck) de 0.08 mm. La columna fue preparada con éter de petróleo (60-80°) pasando mezclas de los solventes, en volúmenes de 50 ml. 3 veces cada uno: éter de petróleo, ciclohexano, benceno, cloroformo, éter etílico, acetato de etilo, metanol. Variando la proporción en un 10% cada vez. Dieron reacción positiva a Dragendorff a partir de la fracción No. 22 eluída con éter de petróleo-ciclohexano al 85%. A partir de la No. 73 eluída con benceno-cloroformo desde el 70% la reacción era más intensa. Pero al hacerle cromatografía de capa fina en las mismas condiciones que las anteriores siempre había más de una mancha en cada cromatograma.

Cromatografía sobre Alúmina.- Una nueva cromatografía de columna con 7 gr. de extracto de sustancias básicas, extraídas con acetato de etilo caliente, utilizando en esta ocasión 210 gr. de Alúmina neutra de grado de actividad II-III y los solventes: éter de petróleo, tetracloruro de carbono, benceno, cloroformo, acetato de etilo, fue hecha.

La columna se preparó con éter de petróleo (60-80°). Se usaron 250 ml. de solvente en fracciones de 50 ml. c/u -

variando la proporción en volumen en un 10% cada vez. Se obtuvo reacción positiva a Dragendorff a partir de la No. 65 - eluída con la mezcla benceno-cloroformo desde el 10%.

Se hicieron cromatografías de capa fina a varias de las fracciones. Utilizando en todos los casos solvente III (Ciclohexano, dietilamina, cloroformo) como eluyente y como revelador Dragendorff modificado.

Se obtuvieron para las distintas fracciones los siguientes Rf.

TABLA III

| <u>Fracción No.</u> | <u>Rf.</u> |
|---------------------|-------------|
| 74 | 0.92 |
| 103 | 0.42 |
| 110 | 0.43 - 0.14 |

Las fracciones No. 98 a la No. 105 que habían sido - eluídas con benceno-cloroformo del 70 al 100% y al ser evaporadas quedaban reducidas a una sustancia resinosa, igual que la mayoría de las otras fracciones, al cabo de 8 días habíanse formado cristales perfectos aún coloreados por restos de - resina.

Se intentó la recristalización de esta sustancia en varios solventes, lográndose en ciclohexano.

COMPUESTO X y Z

Compuesto X. Punto de fusión 77 - 78°C. (ciclohexano)

Análisis:

Hallado: C 63.30%; H 6.12%; N 9.15% .

Calculado para: $C_8H_9NO_2$: C 63.57%; H 5.99% N 9.27%.

P.M. = 151 (espectrometría de masa)

Compuesto Z. Punto de fusión 90-91°C. (Ciclohexano)

Espectro Infrarrojo. Entre 3500 y 3300 cm^{-1} libres o asociados: NH_2 ; NH; C=NH .

I. R. 3400 y 3200 cm^{-1} (OH polimérico o en puente de H) 3100 cm^{-1} (C=C-H) . 1690 a 1640 cm^{-1} (C=N - ó C=NH, grupos CO-).

Ultravioleta hecho en etanol $\lambda_{m\acute{a}xima} = 289 m\mu$ ($\epsilon = 2250$).

C O N C L U S I O N E S

1o.- Por primera vez se estudia químicamente la raíz de *URECHITES KARWINSKI* de la que se obtiene por el método de maceración en alcohol, evaporación y luego extracción con HCl y neutralización con NH_4OH , un extracto básico en el cual se ensayan varias técnicas con objeto de separar los alcaloides que contiene. Se logra la mejor extracción con acetato de etilo caliente.

2o.- Por diferentes métodos cromatográficos se logra el aislamiento de dos sustancias básicas de gran similitud que denominamos inicialmente X y Z.

3o.- Por su comportamiento espectrográfico se deduce la presencia en sus moléculas de los siguientes grupos: una lactama cíclica con un anillo de no menos de 6 miembros, un doble enlace y $R-CH_2CH_2-R'$.

4o.- La base denominada X a la que le corresponde la fórmula $C_8H_9O_2N$, consta además de los grupos: lactama conjugada, el grupo $R-CH_2-CH_2-R'$, un $R-CH=CH-$, y el grupo $R-CH-CH_2-R'$.

Se le hizo un estudio espectrográfico detallado no encontrándose ninguna sustancia de propiedades idénticas descritas en la literatura por lo que se le denomina *LOROQUINA*.

5o.- La base Z, a la que se le hace también un estudio espectrográfico tampoco se le encuentra descrita en la literatura; se le denomina *LOROCINA* y se le propone una fórmula estructural.

6o.- De las pruebas farmacológicas se concluye que el extracto básico original contiene principios activos - que actúan sobre la presión arterial.

Que las fracciones con reacción de alcaloides positiva, que ensayamos sobre intestino de conejo, actuaban de forma diferente al extracto básico produciendo relajación y disminución en las ondas peristálticas.

7o.- Que los compuestos X y Z aislados no presentan este tipo de propiedades alteradoras.

B I B L I O G R A F I A

1. ALVAREZ Y BORGES: Estudio químico y farmacológico de la raíz de *Hamelia patens*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de El Salvador. 1966. Tesis doctoral. 24 pág.
2. BELLAMY, L. J.: *The infrared spectra of complex molecules*. Methuren & Co. Ltd. 1958. 423 pág.
3. BOLLINGER, H. R. et al: *Thin-layer chromatography a laboratory handbook*. Berlín, Springer-Verlag. 1965. 554 pág.
4. BLOCK, R. J. Durrum, E. L. and Zwein, G.: *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. 2a. Ed. New York, Academic Press. 1958. 361 pág.
5. CALDERON, S. y STANLEY, C.: *Lista preliminar de las plantas de El Salvador*. Ediciones culturales de la Universidad de El Salvador. 302 pág.
6. DOMINGUEZ, X. A.: *Análisis fitoquímico*. Escuela de Ciencias. Instituto Tecnológico de Monterrey. N. L. México (copia mimeografiada).
7. GODMAN, F. DUCANE AND SALVIN, OSBERT, eds.: *Biología Centrali Americana or Contributions to the knowledge of the fauna and flora of México and Central América*, by Botting, H. W. London. Botany Section, Vol. I-II. 1879-1889.
8. GONZALEZ, GONZALEZ, A.: *San Salvador, 1966* (Comunicación personal)
9. GUYTON, ARTHUR C.: *Tratado de Fisiología médica*. 2a. Ed. - México. Editorial Interamericana, S.A. 1964. 1078 pág.
10. HASSALL, C. H.: *Cardiac glycosides of Urechites suberecta*. C. A. 46:9112^b
11. HUNGER, A.: *Glycosides and agluconas. Glycosides from the leaves of Urechites lutea*. *Helv. Chem. Acta.* 34:898-906. 1961.
12. NAKANISHI, K.: *Infrared absorption spectroscopy*, San Francisco, Holden-Day Inc.
13. ROBERTS, I.: *Nuclear magnetic resonance. Applications to organic chemistry*. New York. Mc Graw-hill. 1959. 118 pág.
14. WALDI, D.: *Organic basis. Alkaloids*. En: Bollinger, H. R. et al: *Thin-layer chromatography a laboratory handbook*. Berlín, Springer-Verlag. 1965. 554 pág.