

Química de Productos Naturales



Alejandro Martínez M.



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Facultad de Ciencias Farmacéuticas
y Alimentarias

Química de Productos Naturales

Alejandro Martínez M.

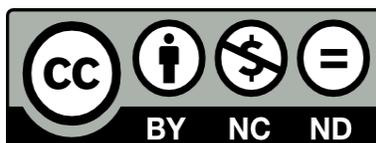
alejandro.martinez@udea.edu.co

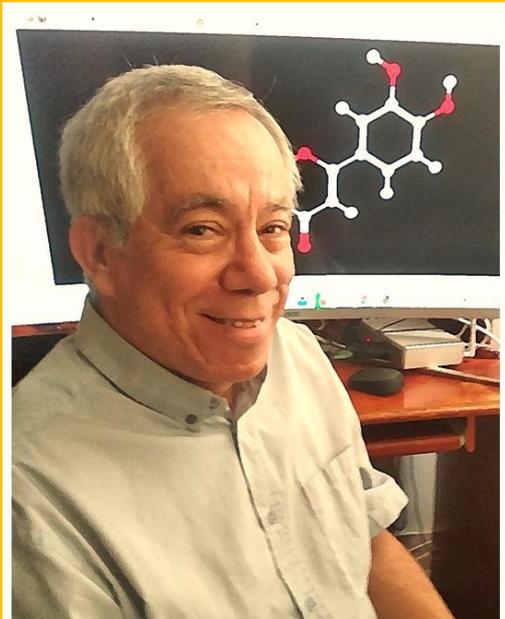
Fotografías de interior

<https://pxhere.com/>

Medellín, Colombia

2020





Alejandro Martínez M.

Químico, con maestría y doctorado en química, egresado de La Universidad Nacional de Colombia.

Profesor e investigador del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, vinculado a La Universidad de Antioquia desde 1985.

Fundador del Grupo de Investigación *Productos Naturales Marinos*.

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-7409-7990>



Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a los estudiantes y colegas que durante este tiempo han tenido la paciencia de leerme y escucharme. También a personas que por internet me han sugerido algunas modificaciones. A todos ellos muchas gracias, y mi reconocimiento personal.

A La Universidad de Antioquia y a La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, por acogerme en sus aulas, laboratorios, oficinas, y tantos sitios tan hermosos y personas amables, que pudieron soportarme durante estos años, a mis profesores, a mis compañeros de oficina, de la Facultad y a los miles de estudiantes con quienes traté de aprender acerca de los productos naturales. Siempre los llevaré en mi corazón con mucha humildad y eterno agradecimiento.

A la profesora Carmenza Duque Beltrán, profesora emérita y distinguida de la Universidad Nacional de Colombia. Por su paciencia, por todo su apoyo y su ejemplo de trabajo dedicado a la docencia en química y a la investigación de la química de los productos naturales marinos, que me han servido de modelo para el desarrollo no solo como investigador sino como docente y como persona.

A los profesores y estudiantes del grupo de investigación Productos Naturales Marinos, de la Universidad de Antioquia.

A mi familia, por todo el apoyo que me han dado no solo para este proyecto, sino para todos los trabajos realizados en medio de diferentes dificultades.

Al SDBS, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan; por permitir el uso de los datos espectrales referenciados dentro del texto.

Al sitio web NMRdb.org, por poner a libre disposición herramientas tan útiles para que más personas puedan acceder a este campo inmenso de conocimiento como es el de la química de los productos naturales, y la química orgánica en general.

A todas aquellas personas y entidades, que de alguna forma me animaron a desarrollar y contribuyeron a cristalizar este proyecto.

Alejandro Martínez M.

Medellín, Colombia

2020

Presentación

Este texto es una recopilación actualizada de las notas y documentos que, durante más de 30 años, el autor ha desarrollado como profesor en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de La Universidad de Antioquia.

El texto está dirigido, especialmente, a los estudiantes del pregrado de química farmacéutica quienes han cursado previamente las asignaturas: química orgánica, bioquímica y análisis instrumental, y pretende que tengan un acercamiento al extenso campo que es la química de los productos naturales, además trata de cubrir en parte la poca existencia de textos en español sobre el tema. No pretende ser un tratado completo sobre los diferentes temas presentados, pues queda limitado a las posibilidades y experiencia del autor, y está dirigido a los estudiantes de las asignaturas Farmacognosia II y Fitoquímica.

El énfasis es dado a los aspectos químicos de los productos naturales pero también se mencionan el potencial farmacéutico y el uso aprobado de algunas sustancias, drogas vegetales o plantas; pero solo a manera de referencia para mostrar las posibilidades de los productos naturales desde lo académico y lo relacionado a la investigación científica, nunca para su uso o aprovechamiento comercial ni para suplir información ante los entes regulatorios oficiales ni para engañar al ciudadano común en los diferentes medios de comunicación, aspectos estos que están por fuera del interés y el alcance de este texto.

A manera de aproximación, y desde la experiencia del autor, se relaciona la presencia en las sustancias estudiadas, de grupos funcionales como los hidroxilos fenólicos relacionándolos con su potencial actividad antioxidante, y de grupos como los anillos lactónicos, los cuales están presentes en muchas sustancias naturales bioactivas, como los cardiotónicos y las sesquiterpénlactonas. A lo largo de los diferentes capítulos se referencia, preferiblemente mediante publicaciones indexadas recientes, el uso potencial de los diferentes metabolitos contra diferentes enfermedades, citando en muchos casos los nombres comunes y binomiales de diferentes plantas y organismos, en los cuales se han encontrado y se investigan estas sustancias.

Debido a que esta área del conocimiento es muy extensa y en continuo desarrollo por nuevos hallazgos, en este texto los capítulos tienen alcances diferentes. Los capítulos 1 al 4, en particular, incluyen temas generales sobre la fitoquímica de los metabolitos secundarios y tienen un desarrollo más completo sobre aspectos y metodología

experimentales. Los demás capítulos cubren especialmente tópicos especiales sobre algunos temas en los que el autor ha tenido experiencia docente e investigativa como los productos naturales marinos, y otros temas que están emergiendo cada vez más como fuentes de nuevas sustancias bioactivas como son los hongos. De estos tópicos algunos tienen un desarrollo más extenso en cuanto a aspectos fitoquímicos, como son los capítulos 5 y 7. Los demás capítulos resumen solo algunos aspectos generales que, a juicio del autor, pueden motivar a los estudiantes y lectores a trabajar en esas áreas de investigación.

En la introducción se realiza un ejercicio (o taller), en el cual se asignan a los estudiantes diferentes tipos de estructuras químicas de metabolitos secundarios de estructura relativamente simple. Con este ejercicio se pretende que el estudiante a partir de los conocimientos previos de otras asignaturas, relacione lo allí aprendido con el caso de los metabolitos secundarios que comienza a conocer. Además, se reafirman algunos conceptos básicos de química orgánica, que son necesarios para el estudio y comprensión de la química de los productos naturales.

El capítulo primero, trata de los métodos generales de extracción, aislamiento y caracterización, y menciona tanto los métodos clásicos, y la evolución hacia el uso por ejemplo con métodos de extracción más modernos, más eficientes y especialmente más amigables con el medio ambiente y la salud. Incluso se propone el remplazo en las técnicas de extracción e identificación, de solventes tóxicos como cloroformo, diclorometano y metanol, por unos menos dañosos para la salud y el medio ambiente como son el acetato de etilo, y el etanol, y otros innovadores como son los solventes eutécticos viscosos. En las técnicas de caracterización química se hace énfasis especial en la resonancia magnética nuclear, para que el estudiante la aplique en la identificación y caracterización de metabolitos secundarios.

El capítulo segundo trata sobre una gran clase de productos naturales como son los compuestos fenólicos o aromáticos en general, y se enfatiza en dos grupos de sustancias como son las antraquinonas y los flavonoides. Las primeras debido a su presencia en muchas drogas vegetales aceptadas por diferentes farmacopeas, como laxantes; y las segundas como antiinflamatorias de uso externo. Pero se menciona que más allá de su uso aceptado, presentan grandes posibilidades para el desarrollo de nuevas terapias contra diferentes enfermedades. Es de esperar que el estudiante con los diferentes aspectos químicos y de actividad biológica mencionados para estas dos grandes clases de compuestos fenólicos naturales, tenga herramientas para acercarse al conocimiento sobre los compuestos fenólicos naturales en general. Se incluyen algunos ejercicios, con el fin de que el estudiante sea capaz de resolver problemas de asignación de la estructura química de algunos metabolitos con anillos aromáticos, haciendo uso especial de los datos de

resonancia magnética nuclear, y predecir en algunos casos el origen biogénico y la potencial actividad antioxidante, entre otras.

El capítulo tercero, está relacionado con otra gran cantidad de sustancias, que generalmente no contienen en su estructura química el anillo aromático. El grupo más representativo de estos son los terpenoides. Se profundiza en algunos aspectos de compuestos tales como los esteroides, las saponinas y los cardiotónicos. Los esteroides y saponinas son materias primas importantes en la industria farmacéutica para la producción de una gran cantidad y diversidad de medicamentos esteroides. Los cardiotónicos, son drogas aceptadas en diferentes farmacopeas y legislaciones porque estimulan la función cardíaca. Además, recientemente se les han reportado otras actividades biológicas interesantes. Se plantean algunos ejercicios sobre la determinación estructural de algunos esteroides, a partir de datos de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, para que el estudiante afiance su conocimiento sobre la química de estas sustancias.

El capítulo cuarto, trata acerca de los compuestos nitrogenados como son los alcaloides. Estos constituyen una gran cantidad de compuestos naturales nitrogenados, que presentan diferentes actividades biológicas, particularmente sobre el sistema nervioso. Se dan algunos aspectos químicos generales de esta clase de compuestos.

El capítulo cinco, cubre algunos aspectos generales sobre los aceites esenciales, los cuales además de su uso como aromatizantes, presentan diferentes propiedades biológicas como antimicrobianos y antioxidantes, inclusive con uso potencial en enfermedades cardiovasculares. Por tratarse en muchos casos de mezclas de compuestos con anillos aromáticos y otros no aromáticos como terpenoides, no se incluye este tema en los capítulos precedentes.

El capítulo seis es una breve revisión sobre los productos naturales marinos, mostrando especialmente la gran variedad estructural y la complejidad química de estas sustancias, con algunos ejemplos representativos recientes.

El capítulo siete trata brevemente varios aspectos químicos y de actividad biológica de las sesquiterpénlactonas, las cuales son sustancias interesantes farmacéuticamente por sus propiedades sobre las células. Otra vez es bueno precisar, que estos compuestos no se incluyen en el capítulo 3, debido a que el anillo lactónico está relacionado con actividades biológicas relativamente específicas como la citotoxicidad, lo cual no es una característica general de los compuestos o metabolitos mencionados en dicho capítulo 3, ni con los aceites esenciales.

El capítulo ocho, menciona algunos tópicos básicos relacionados con otros derivados de la acetilcoenzima-A, como son las prostaglandinas, las cadenas policetídicas y su papel como precursores de antibióticos como las tetraciclinas, y otros compuestos aromáticos.

Los capítulos 9 y 10, tratan algunos aspectos básicos generales de metabolitos interesantes de hongos y los glicósidos cianogénicos.

El capítulo 11, trata algunos aspectos generales de los compuestos azufrados naturales, especialmente sobre los que se han reportado estudios químicos y actividad biológica, y haciendo énfasis especial en los glucosinolatos, por sus estudios básicos reportados sobre su potencial para la prevención de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, y en general sobre el sistema inmune.

La bibliografía se escogió considerando especialmente la más reciente y que está disponible en las bases de datos de La Universidad de Antioquia, en La Biblioteca Central y en las del formato de acceso abierto (open Access), esto con el objetivo que los estudiantes y demás interesados, puedan tener acceso a los documentos, con los menores costos económicos. También es importante la disponibilidad actual de herramientas de software en línea como nmrdb.org, que permiten al estudiante avanzar en las técnicas de elucidación estructural de los productos naturales.

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1. Técnicas generales de aislamiento, separación, caracterización y cuantificación de metabolitos secundarios.....	18
Técnicas generales de extracción de metabolitos secundarios	21
Compuestos solubles en agua y solventes polares	21
Compuestos solubles en solventes orgánicos de mediana y baja polaridad	22
Compuestos solubles en soluciones acuosas alcalinas	23
Compuestos solubles en soluciones acuosas ácidas	24
Extracción con solventes eutécticos viscosos (DES) y líquidos iónicos (IL)	24
Extracción en fase sólida	28
Extracción Soxhlet	29
Extracción asistida con ultrasonido	30
Extracción con fluidos supercríticos y subcríticos	30
Extracción asistida con microondas	31
Cromatografía en Capa Fina y en Columna (CCF y CC)	32
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (sigla inglesa HPLC)	33
Técnicas generales de caracterización de metabolitos secundarios	34
Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-vis)	35
Espectroscopia infrarroja (IR)	37
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	38
Espectrometría de masas.....	47
Técnicas generales de cuantificación de metabolitos secundarios	50
Análisis fitoquímico preliminar	52
Ensayos de reconocimiento de alcaloides	52
Ensayos de reconocimiento para compuestos fenólicos	53
Ensayo de reconocimiento de flavonoides	53
Ensayos de reconocimiento para terpenoides	54
Referencias bibliográficas	58
Capítulo 2. Metabolitos secundarios aromáticos.....	66
Compuestos fenólicos derivados del ácido shikímico	67
Biogénesis de fenilalanina y tirosina	72
Biogénesis de compuestos C ₆	76
Biogénesis de compuestos C ₆ C ₁	77
Biogénesis de compuestos C ₆ C ₂	79
Biogénesis de compuestos C ₆ C ₃ (Fenilpropanoides)	79
Biogénesis de compuestos (C ₆ C ₃) ₂ (Lignanós) y (C ₆ C ₃) _n Lignanós	80
Biogénesis de cumarinas.....	85
Antraquinonas y compuestos relacionados	87
Nomenclatura	89
Clasificación	90
Biogénesis	91
Biogénesis vía MalonilCoA	91
Biogénesis vía ácido shikímico + ácido mevalónico.....	93
Distribución y estado natural.....	94
Hechos estructurales	95

Métodos de extracción y aislamiento	95
Valoración de antraquinonas y compuestos relacionados	97
Ensayo de Bornträger.....	98
Ensayo con Acetato de Magnesio alcohólico.....	98
Ensayo de reducción moderada	98
Espectroscopia Ultravioleta	98
Espectroscopia Infrarrojo.....	99
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	100
Espectrometría de masas.....	101
Actividad biológica	102
Algunas drogas vegetales que contienen antraquinonas y compuestos relacionados	102
Naftoquinonas	106
Problemas	108
Flavonoides	116
Aspectos químicos y de actividad biológica de las diferentes clases de flavonoides	116
Distribución y estado natural.....	129
Propiedades físicas	129
Biogénesis	130
Extracción y aislamiento	131
Cuantificación de flavonoides totales	133
Ensayo de Shinoda	133
Reconocimiento de antocianinas	133
Espectroscopia ultravioleta-visible.....	134
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	136
Espectrometría de masas.....	140
Hidrólisis ácida y alcalina	147
Relaciones Estructura-Actividad Biológica.....	147
Metabolismo.....	149
Drogas aceptadas en Colombia y otras plantas que contienen flavonoides	149
Fuentes de antocianinas	151
Problemas	152
Cannabis.....	155
Referencias bibliográficas	158
Capítulo 3. Metabolitos secundarios no aromáticos.....	170
Esteroles.....	172
Distribución y estado natural.....	172
Nomenclatura.....	173
Propiedades físicas	175
Biogénesis	176
Hechos estructurales	176
Extracción y aislamiento	179
Ensayo de Liebermann-Burchard	181
Espectroscopia infrarroja	181
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	181
Espectrometría de masas.....	185
Espectroscopia ultravioleta-visible.....	191
Correlaciones estructura y rotación específica	191
Utilidad farmacéutica.....	192
Síntesis	194
Ejercicio.....	194
Saponinas y saponinas esteroides	201
Biogénesis	202
Hidrólisis	204

Nomenclatura.....	204
Ensayos de reconocimiento.....	205
Ensayo de la espuma.....	205
Ensayo de hemólisis.....	205
Ensayo de Liebermann-Burchard.....	206
Extracción y aislamiento.....	206
Espectroscopia infrarrojo.....	207
Espectrometría de masas.....	207
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.....	209
Regla de Klyne.....	211
Método de Hakomori.....	211
Distribución natural.....	214
Importancia farmacéutica.....	214
Glicósidos cardiotónicos.....	218
Biogénesis.....	219
Distribución natural.....	219
Ensayos de reconocimiento.....	219
Hidrólisis.....	220
Hechos estructurales.....	220
Extracción y aislamiento.....	222
Espectroscopia infrarrojo.....	223
Espectroscopia ultravioleta.....	223
Espectrometría de masas.....	223
Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.....	225
Utilidad farmacéutica.....	225
Algunas drogas vegetales que contienen cardiotónicos.....	226
Carotenoides.....	228
Clasificación.....	230
Biogénesis.....	230
Distribución y estado natural.....	230
Nomenclatura.....	231
Extracción y aislamiento.....	232
Ensayos de reconocimiento.....	234
Características espectrales.....	234
Actividad biológica.....	237
Alcaloides esteroideos.....	237
Referencias bibliográficas.....	240
Capítulo 4. Alcaloides.....	246
Definición.....	247
Función biológica.....	253
Clasificación.....	254
Distribución y estado natural.....	256
Ensayos de reconocimiento.....	256
Extracción.....	257
Técnicas de separación e identificación.....	259
Biogénesis.....	261
Interés farmacéutico de los alcaloides.....	265
Referencias bibliográficas.....	270
Capítulo 5. Aceites esenciales.....	274
Definición.....	275
Clasificación.....	275
Distribución y estado natural.....	276
Monoterpenos y sesquiterpenos.....	277

Biogénesis de terpenos	278
Biogénesis del ácido mevalónico	279
Biogénesis de IPP y DMAPP	280
Condensación cabeza-cola de IPP y DMAPP	280
Biogénesis de monoterpenos en <i>Mentha piperita</i>	281
Fenilpropanos	286
Biogénesis de fenilpropanos	288
Extracción y aislamiento de componentes de aceites esenciales	288
Métodos de separación y análisis	289
Ensayos de reconocimiento	291
Espectroscopia infrarrojo	291
Espectroscopia ultravioleta	291
Resonancia Magnética Nuclear	292
Espectrometría de Masas	295
Ejemplos de drogas vegetales que contienen aceites esenciales	296
Referencias bibliográficas	301
Capítulo 6. Productos naturales marinos	308
Referencias bibliográficas	315
Capítulo 7. Sesquiterpénlactonas	317
Definición	318
Nomenclatura	319
Clasificación	320
Biogénesis	320
Distribución y estado natural	320
Extracción	321
Separación y análisis cromatográfico	322
Espectrometría de Masas	325
Resonancia Magnética Nuclear	327
Espectroscopia ultravioleta	330
Espectroscopia infrarroja	330
Ensayos de reconocimiento	330
Actividad biológica	331
Referencias bibliográficas	334
Capítulo 8. Otros derivados de AcetilCoenzima-A	337
Ácidos grasos	338
Prostaglandinas y tromboxanos	343
Poliacetilenos	344
Tetraciclinas y anfotericinas	349
Compuestos aromáticos derivados de cadenas policetídicas	351
Referencias bibliográficas	354
Capítulo 9. Metabolitos de hongos	356
Ciclosporinas	359
Metabolitos con potencial anti-cáncer	360
Pigmentos	367
Hongos marinos	368
Técnicas de separación e identificación	369
Referencias bibliográficas	369
Capítulo 10. Glicósidos cianogénicos	373
Biogénesis	376
Función biológica	378
Hidrólisis enzimática	378
Ensayo de reconocimiento (Ensayo de Guignard)	379
Distribución natural	379

Técnicas de aislamiento e identificación	379
Síntesis	381
Referencias bibliográficas	381
Capítulo 11. Compuestos azufrados	383
Glucosinolatos	387
Técnicas de análisis e identificación	388
Síntesis de glucosinolatos	390
Referencias bibliográficas	390

Introducción

El conocimiento químico de los metabolitos secundarios permite determinar el uso potencial de estas sustancias para diferentes fines farmacéuticos, así como determinar los tipos de análisis a los que se pueden someter estas sustancias. Por eso es importante conocer y aplicar algunos conceptos básicos adquiridos en otras asignaturas previas como química orgánica, bioquímica y al análisis químico instrumental, especialmente.

En este capítulo se pretende que el estudiante a partir de la estructura química de tres metabolitos secundarios dados, mediante un ejercicio o taller escrito, prediga de manera precisa o aproximada según corresponda, aspectos como son las propiedades físicas como estado, color, aroma; las propiedades químicas como su solubilidad en determinados solventes, en ácidos y bases. Otros aspectos como su estabilidad térmica, su actividad óptica, las técnicas analíticas que se pueden utilizar para su separación (HPLC, Cromatografía de Gases), para su caracterización (Espectroscopia infrarrojo, ultravioleta, Espectrometría de masas clásica y con la técnica electrospray, etc.). Además, se hace el ejercicio de inferir posibles actividades biológicas como antioxidante y citotóxica, y determinar la ruta biogénica que lo pudo originar en determinada planta u organismo. En la segunda parte del ejercicio, el estudiante debe predecir estas propiedades y además comparar con las propiedades determinadas experimentalmente, y que están reportadas en artículos de revistas especializadas.

El manejo de estos conceptos básicos le servirán no solo para propósitos analíticos como el control de calidad de preparados fitoterapéuticos y relacionados, sino también para inferir posibles efectos citotóxicos y antioxidantes, además le servirán para la comprensión de los temas a tratar en los capítulos posteriores.

El taller a desarrollar se presenta a continuación.

Taller 1

Parte 1 (Predecir con base en la estructura molecular)

Para la sustancia X, dibujar su estructura molecular 2D y 3D con un editor molecular, además escoja la mejor opción y complete si es necesario:

1. Es un sólido?
Sí _____ No _____
2. Es coloreada?
Sí _____ No _____ Color aprox.: _____
3. Posiblemente es soluble en agua abundante?
Sí _____ No _____
4. Es térmicamente estable?
Sí _____ No _____
5. Se puede determinar su espectro de masas ESI?
Sí _____ No _____ Ion pseudomolecular (ó cuasimolecular):

6. Se puede determinar su espectro de masas IE?
Sí _____ No _____ Ion molecular: _____
7. Se puede analizar por Cromatografía de Gases?
Sí _____ No _____
8. Se puede analizar por HPLC?
Sí _____ No _____
9. Se puede determinar su precursor biogénico?
Sí _____ No _____ Cuál es? _____
10. En su espectro infrarrojo se esperan bandas de absorción debidas a los siguientes enlaces:
C=C _____ C-H _____ =C-H _____ O-H _____ C-O _____
C=O _____ C-N _____ N-H _____ N-O _____ C=N _____ S-O _____
11. Al analizarlo por cromatografía en capa fina y bajo la luz de una lámpara UV 254 nm se puede observar? Sí _____ No _____
12. Es posiblemente antioxidante?
Sí _____ No _____

13. Es posiblemente citotóxico?

Sí_____ No_____

14. Esta sustancia es de tipo (marque las que correspondan):

Glicósido___ Aglicona ___ Aromático ___ No aromático ___ Nitrogenado ___
Ópticamente activo ___ Sal___

15. El número de carbonos de esta sustancia es _____, el número de hidrógenos es _____.

Para la sustancia Y, dibujar su estructura molecular 2D y 3D con un editor molecular, además escoja la mejor opción y complete si es necesario.

1. Es un sólido?

Sí_____ No_____

2. Es coloreada?

Sí_____ No_____ Color aprox.: _____

3. Posiblemente es soluble en etanol abundante?

Sí_____ No_____

4. Es térmicamente estable?

Sí_____ No_____

5. Se puede determinar su espectro de masas ESI?

Sí_____ No_____ Ion pseudomolecular: _____

6. Se puede determinar su espectro de masas IE?

Sí_____ No_____ Ion molecular: _____

7. Se puede analizar por Cromatografía de Gases?

Sí_____ No_____

8. Se puede analizar por HPLC?

Sí_____ No_____

9. Se puede determinar su precursor biogenético?

Sí_____ No_____ Cuál es? _____

10. En su espectro infrarrojo se esperan bandas de absorción debidas a los siguientes enlaces:

C=C _____ C-H _____ =C-H _____ O-H _____ C-O _____

C=O _____ C-N _____ N-H _____ N-O _____

11. Aroma probable:

Agradable_____ Desagradable_____

Característico_____

12. Es posiblemente antioxidante?

Sí_____ No_____

13. Es posiblemente citotóxica?

Sí_____ No_____

14. Esta sustancia es de tipo (marque las que correspondan):

Glicósido___ Aglicona ___ Aromático ___ No aromático ___ Nitrogenado ___
Ópticamente activo___

Parte 2 (Predecir con la estructura y comparar con lo reportado en el artículo asignado para el acompañamiento, justificar cada respuesta, no basta con decir Sí o No)

Para la sustancia Z dibujar sus estructuras 2D y 3D con el editor molecular y escoja la mejor opción y/o complete:

1. Es un sólido? Sí_____ No_____

¿Corresponde con lo experimental?

2. Posiblemente es soluble en: Agua_____ Ácidos_____ Bases_____
Acetato de etilo_____ Etanol caliente_____

¿Corresponde con lo experimental?

3. Es térmicamente estable? Sí_____ No_____

¿Corresponde con lo experimental?

4. Se puede determinar su espectro de masas ESI?

Sí_____ No_____ Ion pseudomolecular: _____

¿Corresponde con lo experimental?

5. Se puede determinar su espectro de masas IE?

Sí _____ No _____ Ion molecular: _____

¿Corresponde con lo experimental?

6. Se puede analizar por Cromatografía de Gases? Sí _____ No _____

¿Corresponde con lo experimental?

7. Se puede analizar por HPLC? Sí _____ No _____

¿Corresponde con lo experimental?

8. Su precursor biogénico es (marque uno o varios según aplique):

Ácido shikímico _____ Acetilcoenzima-A _____ Acido pirúvico _____ Acido
mevalónico _____ Mixto _____ Aminoácido aromático _____
Aminoácido no aromático _____ Escualeno _____ MalonilCoenzima-A _____
Otro _____

9. En su espectro infrarrojo se esperan bandas de absorción debidas a los siguientes enlaces:

C-C _____ C=C _____ C-H _____ =C-H _____ O-H _____ C-O _____
C=O _____ C-N _____ N-H _____ N-O _____

¿Corresponde con lo experimental?

10. Es posiblemente antioxidante? Sí_____ No_____

11. Es posiblemente citotóxica? Sí_____ No_____

¿Corresponde con lo experimental?

11. Es de algún carácter: Acido____ Alcalino____ Neutro____

¿Corresponde con lo experimental?

12. El uso popular para la especie estudiada es:

13. La(s) actividad(es) biológica(s) ensayada(s) es(fueron):

Referencia bibliográfica del artículo asignado:

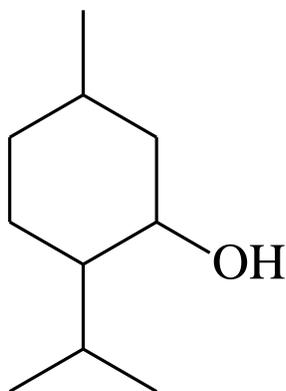
Grupos ácidos: O-H fenólico, COOH

Grupos alcalinos: N-H, N-R (R diferente a C=O, N=O, S=O, etc.)

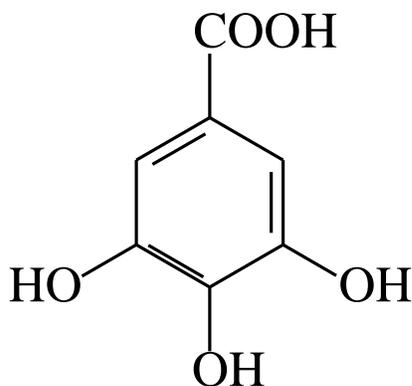
Grupos neutros: O-H alcohólico, amidas, lactonas, ésteres, aldehídos, cetonas, etc.

Para el desarrollo del taller, se asigna a cada estudiante un artículo de una revista especializada (p. ej. Fitoterapia), y se le indican cuáles corresponden a sus compuestos X, Y y Z.

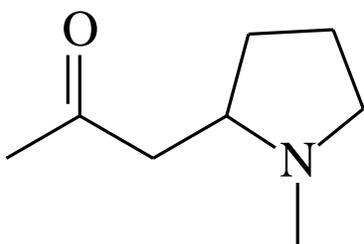
A manera de ejemplo consideremos los compuestos mostrados a continuación:



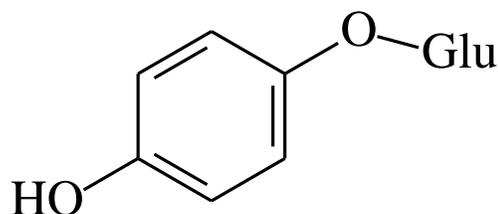
Mentol



Ácido gálico



Higrina



Arbutina

Estos cuatro compuestos, son representativos de diferentes tipos de sustancias naturales. El mentol, es un monoterpeno presente en el aceite esencial de especies de plantas del género *Mentha* como la yerbabuena. A condiciones normales de temperatura y presión atmosférica es un aceite incoloro de aroma agradable. El ácido gálico por su parte es un sólido amarillo que está presente en muchos vegetales y es un ejemplo de compuestos C_6C_1 . La higrina es un alcaloide no aromático de aroma desagradable. La arbutina es un glicósido aromático presente en especies vegetales del género *Salix*.

Vamos a responder las preguntas del taller para cada una de estas sustancias. Aquí se debe considerar que el taller está dirigido a estudiantes de pregrado en un primer curso de química de productos naturales.

Pregunta 1. ¿Es un sólido?

Los estudiantes conocen que las sustancias orgánicas de bajo peso molecular de las diferentes clases son gases o líquidos, por ejemplo, los alcanos, los alquenos, los alcoholes, los éteres, etc. Entonces pueden relacionar el bajo peso molecular con el estado líquido de muchas sustancias orgánicas. Pero también conocen que hay sustancias orgánicas de bajo peso molecular que son sólidos, como la glucosa. Aquí se les recuerda que, aunque solo tiene

6 carbonos, la molécula de glucosa contiene 5 grupos hidroxilo, y que junto con los grupos amina, son de los grupos funcionales más polares presentes en compuestos naturales orgánicos, y además que debido a esos grupos pueden formar fácilmente puentes de hidrógeno, que de alguna manera favorecen su estado sólido.

Como una aproximación a lo que se puede considerar bajo peso molecular en los productos naturales, pueden considerarse las sustancias con 25 carbonos o menos. Estas incluyen por ejemplo los terpenoides, que muchos son aceites ó líquidos viscosos. Por otro lado, las sustancias que contienen carbohidratos ligados, así sean de bajo peso molecular tienden a ser sólidos. Esto permite clasificar muchas sustancias naturales en dos grandes grupos: los glicósidos y las agliconas o formas libres. Los glicósidos son sustancias naturales que contienen en su estructura una o más unidades de carbohidratos, por ejemplo, la arbutina. Los otros tres compuestos al no tener carbohidratos en su estructura pueden considerarse como formas libres o agliconas.

Entonces con las consideraciones anteriores, el estudiante puede considerar que el mentol es un compuesto de bajo peso molecular, pero con un solo grupo polar como es el grupo hidroxilo y 10 átomos de carbono, lo que lo hace mucho menos polar que por ejemplo la glucosa. Además, es una aglicona, por lo cual se puede predecir que es un líquido a condiciones normales.

La arbutina, al ser un glicósido debe ser un sólido. El ácido gálico por su parte, aunque tiene bajo peso molecular tiene 4 grupos polares, y probablemente es un sólido. El alcaloide higrina es una forma libre o aglicona, no tiene grupos polares (ni amino ni hidroxilo), y por su bajo peso molecular y poca polaridad debe ser un líquido.

Pregunta 2. ¿Es coloreada?

Lo que determina el color de muchas sustancias naturales es la presencia en su estructura de grupos cromóforos tales como los anillos aromáticos y los enlaces dobles $C=C$ y $C=O$ conjugados. Aunque no existe una regla para determinar el color de una sustancia natural, como aproximación se propone que si no tiene enlaces dobles conjugados es una sustancia incolora. Según esto el mentol y la higrina son incoloros, pues no contienen ni anillos aromáticos ni enlaces dobles conjugados. Cuando presentan un anillo aromático o un sistema dieno conjugado (dos o tres enlaces dobles conjugados), muchas sustancias naturales son amarillentas, pero si además cuentan con enlaces dobles que extienden la conjugación, se tornan amarillos propiamente dichos. Según esto la arbutina debe ser amarillenta, y el ácido gálico de color amarillo, debido al carbonilo. Otras sustancias naturales con más de 4 enlaces dobles conjugados tendrán colores que van del naranja al rojo, como se verá en capítulos posteriores relacionados con sustancias como ciertos flavonoides, las quinonas y los carotenoides, entre otros.

Pregunta 3. ¿Posiblemente es soluble en agua abundante?

La solubilidad en agua y en solventes orgánicos comunes depende de la polaridad, la cual depende a su vez del número de grupos polares presentes en la sustancia. Aunque la solubilidad es relativa y depende de factores como el volumen de solvente y la temperatura, a manera de aproximación se puede inferir que sustancias polares como los glicósidos tienden a ser más solubles en solventes polares como agua y alcohol, mientras que las agliconas con pocos grupos polares son más solubles en solventes orgánicos de mediana o baja polaridad como el cloroformo, el acetato de etilo y el hexano.

De acuerdo con lo anterior, de los cuatro compuestos aquí considerados, la arbutina, por ser un glicósido es más soluble en agua o alcohol, y los otros tres compuestos son más solubles en cloroformo y acetato de etilo.

Otro concepto básico es el carácter ácido o alcalino de las sustancias. Los grupos funcionales ácidos presentes en muchas sustancias naturales son el grupo hidroxilo fenólico y el grupo carboxilo. Los grupos funcionales alcalinos son grupos amino. De acuerdo con esto el mentol es una sustancia de carácter neutro, pues su hidroxilo no es fenólico, sino alcohólico. El ácido gálico es una sustancia de carácter ácido por sus tres grupos hidroxilos fenólicos además de su grupo carboxilo. Entonces, a pesar de que el ácido gálico no es soluble en agua, es soluble en soluciones acuosas alcalinas, por su capacidad de formar sales solubles con las bases fuertes. Por otro lado, la higrina es una sustancia de carácter básico, y aunque no es soluble en agua solamente, es soluble en soluciones acuosas de ácidos fuertes, por su capacidad de formar sales solubles.

Pregunta 4. ¿Es térmicamente estable?

La estabilidad térmica de las sustancias naturales es importante para su análisis, por ejemplo, con los métodos instrumentales. Los glicósidos debido a los carbohidratos ligados se pueden calentar a temperaturas relativamente altas, pero generalmente no presentan un punto de fusión, sino que se descomponen. Esto es debido a la inestabilidad térmica de los carbohidratos. Esto determina que estas sustancias no se pueden analizar por métodos que utilicen temperaturas muy altas como por ejemplo la cromatografía de gases, ni la espectrometría de masas clásica (de impacto electrónico). En cambio, muchas de las agliconas naturales son térmicamente estables y ebulen o se funden al calentarlas, pero sin descomponerse, es decir son térmicamente estables.

De acuerdo con lo anterior, el mentol, el ácido gálico y la higrina son térmicamente estables, mientras la arbutina es una sustancia térmicamente inestable.

Preguntas 5 y 6. Se puede determinar su espectro de masas ESI? ¿Se puede determinar su espectro de masas IE?

Para responder estas preguntas es necesario recabar en los estudiantes, que básicamente existen dos técnicas generales para analizar por espectrometría de masas. La primera es la primera desarrollada que es la espectrometría de masas clásica. En esta técnica las sustancias vaporizadas son sometidas al disparo continuo de electrones con alta energía (impacto electrónico). Para ser vaporizadas deben ser térmicamente estables. La segunda técnica es de desarrollo más reciente y la más usada es la espectrometría de masas electrospray (sigla inglesa ESI), en la cual la sustancia es sometida a la acción de campos eléctricos y magnéticos para su rompimiento y detección, y se utiliza tanto para sustancias térmicamente estables como para sustancias térmicamente inestables.

Por lo anterior, el mentol, la higrina y el ácido gálico se pueden analizar por espectrometría de masas clásica, pero la arbutina no por su inestabilidad térmica. En cambio, cuando se utiliza la técnica ESI, todos los compuestos se pueden analizar.

A la pregunta sobre el ión pseudomolecular o cuasimolecular, los espectros de masas de impacto electrónico permiten en general obtener el ión de mayor relación m/z que corresponde al ión molecular, el cual a su vez corresponde al peso molecular de la sustancia. Por otro lado, mediante la técnica ESI, generalmente se observan los iones de mayor relación m/z corresponden al peso molecular de la sustancia, pero con un átomo adicional que puede ser H^+ , Na^+ o K^+ .

Según esto, para el mentol su ión molecular es m/z 156, pero su ión cuasimolecular puede ser m/z 157 ($M+H^+$), 179 ($M+Na^+$) ó 187 ($M+K^+$).

La arbutina no presentará ión molecular por su inestabilidad térmica, pero en cambio presentará su ión cuasimolecular, el cual puede ser m/z 273 ($M+H^+$), 295 ($M+Na^+$) ó 303 ($M+K^+$).

Preguntas 7 y 8. Se puede analizar por Cromatografía de Gases? ¿Se puede analizar por HPLC?

Para responder estas preguntas, nuevamente se debe considerar la estabilidad térmica de las sustancias. Ya que las sustancias térmicamente estables en general pueden analizarse por cromatografía de gases, porque se pueden vaporizar. Pero en cambio las sustancias térmicamente inestables no se pueden analizar por cromatografía de gases, porque no se pueden vaporizar o se descomponen al calentarlas. Por otro lado, la cromatografía líquida HPLC permite analizar todo tipo de sustancias naturales, pues generalmente no requiere del uso de altas temperaturas, y es una técnica de separación cromatográfica universal. No obstante, lo anterior, más adelante se mencionará la utilidad de la cromatografía de gases en el análisis de compuestos apolares como sustancias de tipo lipídico y en sustancias presentes en aceites esenciales.

De acuerdo con lo anterior, las cuatro sustancias (mentol, ácido gálico, higrina y arbutina), se pueden analizar por HPLC, pero por cromatografía de gases solamente el mentol, el ácido gálico y la higrina.

Pregunta 9. ¿Se puede determinar su precursor biogénico?

Para responder esta pregunta es necesario recabar en los estudiantes sobre lo aprendido en el curso previo de bioquímica, en especial sobre los procesos de biosíntesis que ocurren en las células y que son mediados por diferentes sistemas enzimáticos. Los estudiantes deben comprender que los metabolitos secundarios, derivan de algunas sustancias provenientes del metabolismo primario como son el ácido shikímico, el ácido pirúvico, la acetilcoenzima-A, el ácido fosfoenolpirúvico, la eritrosa-4-fosfato y el metileritritol.

El esquema presentado a continuación es un resumen de las rutas biogénicas, mediante las cuales estas sustancias, dan origen a diferentes metabolitos secundarios de interés farmacéutico.

De acuerdo con este esquema biogénico, los compuestos con anillos aromáticos *orto*-dioxigenados, muchos compuestos C_6C_3 y los alcaloides aromáticos, se originan a partir del ácido shikímico, el cual a su vez se origina a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P).

Por otro lado, los compuestos aromáticos *meta*-dioxigenados se originan a partir de la acetilcoenzima-A, por la vía de la malonilcoenzima-A.

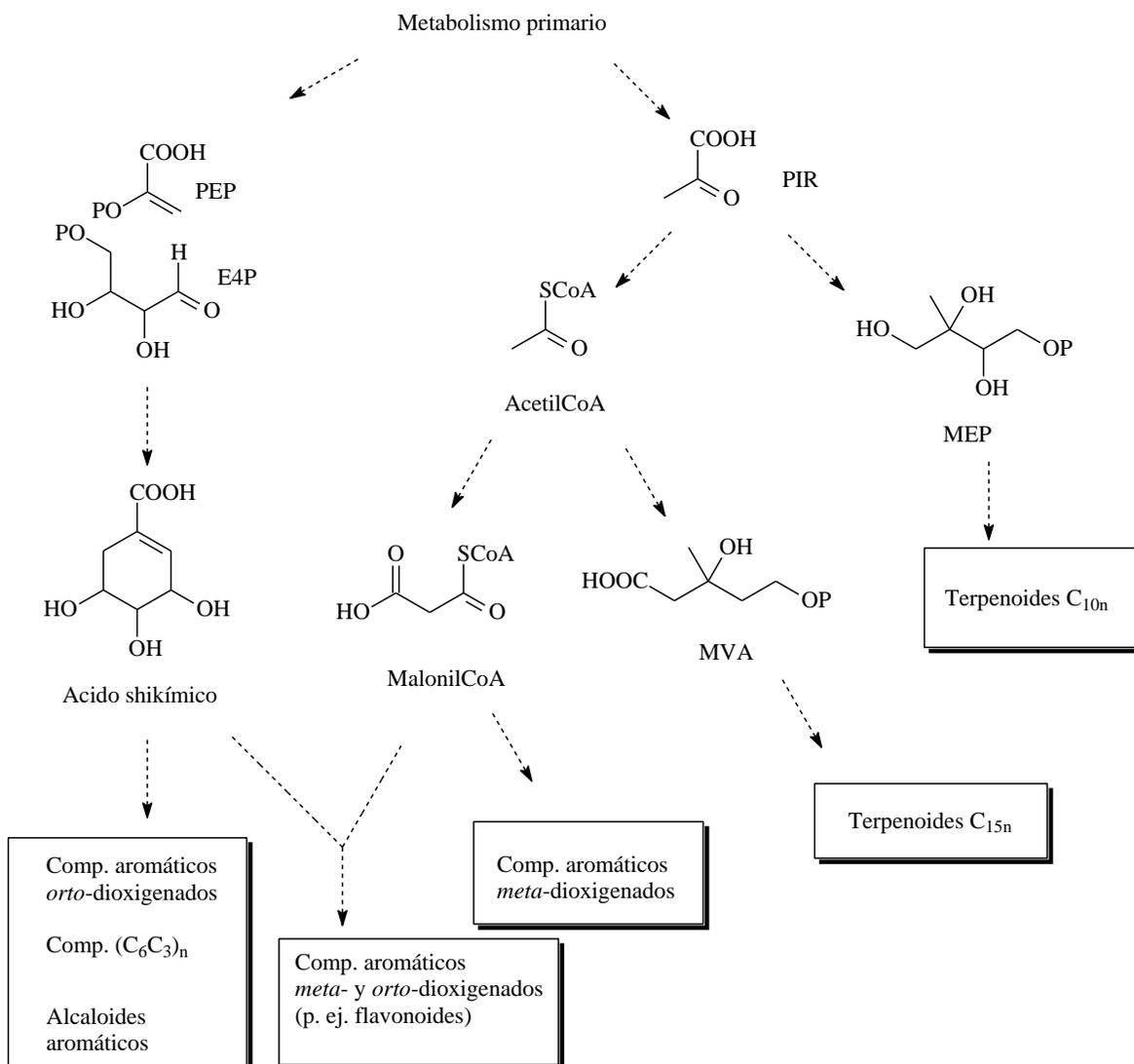


Figura 1. Cuadro general parcial del metabolismo secundario. PEP corresponde a fosfoenolpiruvato, E4P es eritrosa-4-fosfato, PIR es ácido pirúvico, AcetilCoA corresponde a acetilcoenzima-A, MEP corresponde a metileritritol-fosfato, MVA es ácido mevalónico, MalonilCoA es malonilcoenzima-A.

Los compuestos que contienen anillos aromáticos tanto *orto*- como *meta*-dioxigenados, se originan por una ruta biogénica mixta derivada del ácido shikímico y de la acetilcoenzima-A via malonilcoenzima-A. Un ejemplo de esto son los flavonoides.

Para el caso de muchos compuestos sin anillos aromáticos (compuestos no aromáticos), se dan dos rutas probables a partir de ácido pirúvico. Una de estas es la ruta via acetilcoenzima-A y ácido mevalónico, la cual explica el origen biogénico de muchos terpenoides C_{15n} . La otra ruta es la del metileritritol que explica el origen de muchos terpenoides C_{10n} .

De acuerdo con lo anterior, el mentol es derivado biogénicamente de la ruta del metileritritol. El ácido gálico a su vez es derivado biogénicamente del ácido shikímico.

Para el caso de los alcaloides, algunos de ellos derivan del ácido shikímico y aminoácidos aromáticos, otros sin anillos aromáticos derivan de aminoácidos no-aromáticos. Por lo cual, la higrina debe originarse a partir de un aminoácido no aromático.

En el caso de la arbutina, aunque posee un anillo aromático, al no tener sino un sustituyente oxigenado no es posible inferir su origen biogenético a partir de su estructura química.

Pregunta 10. En su espectro infrarrojo se esperan bandas de absorción debidas a los siguientes enlaces:

C=C _____ C-H _____ =C-H _____ O-H _____ C-O _____ C=O _____ C-N _____
 N-H _____ N-O _____ S=O _____ S-H _____ S-S _____

Este punto se dedica a recabar en el estudiante, el uso cualitativo de los espectros infrarrojo para el reconocimiento de grupos funcionales y otros, a partir de la estructura química de cada sustancia natural orgánica. Los grupos incluyen los enlaces entre elementos más comúnmente encontrados en las sustancias de estudio en este texto. Por ejemplo, para el mentol, el estudiante debe marcar con una equis, los grupos C-H, O-H, C-O. Para el ácido gálico se deben marcar los enlaces C=C, =C-H, O-H, C-O y C=O. Para el alcaloide higrina se deben marcar C-H, C=O, C-N. Finalmente para la arbutina se deben marcar los enlaces C=C, C-H, =C-H, O-H y C-O.

Pregunta 11. Aroma probable (si es líquido):

Agradable _____ Amoniacal _____ Azufrado _____
 Característico _____

Para responder esta pregunta, se debe tener en cuenta que muchos compuestos líquidos de bajo peso molecular y que solo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en su estructura, generalmente son de aroma agradable. Son ejemplos los monoterpenos, los sesquiterpenos, los ésteres de bajo peso molecular, y otros componentes de los aceites esenciales.

Las sustancias nitrogenadas tienden a un aroma amoniacal relativamente desagradable, por ejemplo, ciertos alcaloides. Las sustancias azufradas también presentan un aroma azufrado relativamente desagradable que se puede ejemplificar con el ajo y la cebolla. Finalmente, el aroma característico se constituye en un comodín, cuando no es posible predecir algún aroma probable.

De acuerdo con esto, se puede predecir que el mentol si es un líquido es de aroma agradable, la higrina si es un líquido es de aroma amoniacal. El ácido gálico y la arbutina son sólidos.

Preguntas 12 y 13. Es posiblemente antioxidante? ¿Es posiblemente citotóxica?

Para responder a estas preguntas se tiene como referencia que muchos compuestos naturales fenólicos presentan actividad antioxidante, así mismo muchos compuestos alifáticos que contienen un número apreciable de enlaces dobles C=C conjugados, como los carotenoides, tienen la capacidad de captar especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, muchas sustancias naturales que contienen en su estructura un anillo lactónico, presentan alguna actividad citotóxica, son ejemplo de estas las terpenlactonas. Aquí es importante tener en cuenta que es generalmente aceptado que para que una sustancia sea biológicamente activa, debe serlo a muy bajas concentraciones.

De acuerdo con lo anterior, para el mentol no se espera que a muy bajas concentraciones sea ni antioxidante ni citotóxico. El ácido gálico debe ser antioxidante pero no citotóxico. La higrina no sea ni antioxidante ni citotóxica. Finalmente, la arbutina puede ser antioxidante debido a su grupo hidroxilo fenólico.

Pregunta 14. Esta sustancia es de tipo (marque las que correspondan):

Glicósido___ Aglicona ___ Aromático ___ No aromático ___ Nitrogenado ___ Ópticamente activo___

Esta pregunta tiene como fin que el estudiante se apropie de algunos términos como glicósido y aglicona. Los términos aromático para las sustancias naturales con el anillo bencénico, y no-aromático para las sustancias naturales sin anillos bencénicos. Y finalmente afianzar el concepto de actividad óptica para que aplique conocimientos previos de la química orgánica como es reconocer en cualquier metabolito secundario, los carbonos quirales y su relación directa con la actividad óptica.

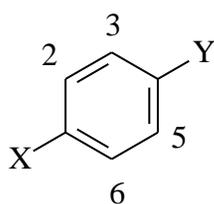
De acuerdo con lo anterior el mentol es una aglicona, no aromática y ópticamente activo. El ácido gálico es una aglicona aromática, ópticamente inactivo. La higrina es una aglicona no aromática, ópticamente activa. La arbutina es un glicósido aromático y es ópticamente activo debido a que contiene un carbohidrato ligado, y los carbohidratos naturales presentan actividad óptica debido a los carbonos quirales que contienen.

En la segunda parte del ejercicio, se pretende que el estudiante con la estructura química de un metabolito asignado por el profesor, no solamente prediga algunas de sus propiedades, sino que confronte sus predicciones con lo reportado en trabajos experimentales para el mismo metabolito.

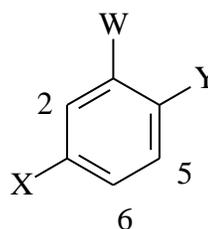
Protones aromáticos y su multiplicidad

Adicionalmente, es importante que el estudiante con los elementos básicos aprendidos en cursos previos relacionados con el análisis químico instrumental de sustancias orgánicas, realice la predicción de las multiplicidades de las señales de los protones aromáticos. Esto con el fin de afianzar los conocimientos previos y aplicarlo ahora a sustancias naturales, de estructura más compleja.

Para esto se toman dos de los sistemas de protones aromáticos más comunes en metabolitos secundarios, como son los sistemas I y II mostrados a continuación:



Sistema I



Sistema II

En los anillos aromáticos los protones muestran señales entre 6 y 8 δ , y pueden presentar acoplamiento con los protones vecinos en posición *orto*, en *meta* y en *para*. La constante de acoplamiento *orto* es aprox. 8-9 Hz, la constante de acoplamiento *meta* es aprox. 2-3 Hz, y la constante de acoplamiento *para* aprox. 0.5 Hz.

De acuerdo con esto, en el sistema I, el protón 2 acopla en *orto* con el protón 3, en *meta* con el protón 6 y en *para* con el protón 5. Teóricamente su señal debe ser un doble-doble-doble (ddd), con constantes de acoplamiento *orto*, *meta* y *para*. Sin embargo, a nivel práctico el acoplamiento *para*, por ser tan pequeña la constante, muchas veces no se observa, y la señal se reduce a un doble-doble (dd) con constantes de acoplamiento *orto* y *meta*. En algunos casos se verá que muchos autores tampoco reportan el dd para el protón 2, sino solamente un doblete (d ancho) con constante de acoplamiento *orto*. Esto debido a que en la práctica muchos experimentos de RMN no permiten observar el acoplamiento *meta*.

En el caso de los protones 3, 5 y 6; si se realiza el mismo análisis anterior, y asumiendo que X y Y son sustituyentes diferentes, a nivel práctico se observarán dobletes-*orto* (d_o) anchos para todos estos protones, aunque teóricamente deben ser ddd.

Para el caso del sistema II, el protón 2 teóricamente es un doble-doblete *meta-para*, pero nuevamente en la práctica no se observa en muchos casos el acoplamiento *para*, por lo cual se debe observar solo como un doblete-*meta* (d_m). A su vez, el protón 5, acopla con el protón 6, para generar un doblete-*orto* y otro doblete-*para* por su acoplamiento con el protón 2. En

resumen, se espera un *dd-orto-para*, pero experimentalmente se observa generalmente un *doblete-orto* (d_o). Finalmente el protón 6, se acopla en *orto* con el protón 5, y en *meta* con el protón 2, lo que genera un *dd-orto,meta* ($dd_{o,m}$). A manera de ejemplo, la figura 2 muestra la región de protones aromáticos del espectro RMN- ^1H predicho para el compuesto orgánico 2,4-dihidroximetoxibenceno, que muestra el patrón de protones aromáticos del sistema II, con una señal *doblete-meta* en δ 6.53 correspondiente al protón 6. La señal del protón 5 se observa como un *doble-doblete orto-meta*, en δ 6.58. Finalmente, la señal del protón 2 se observa como un *doblete-orto*, centrada en δ 6.73.

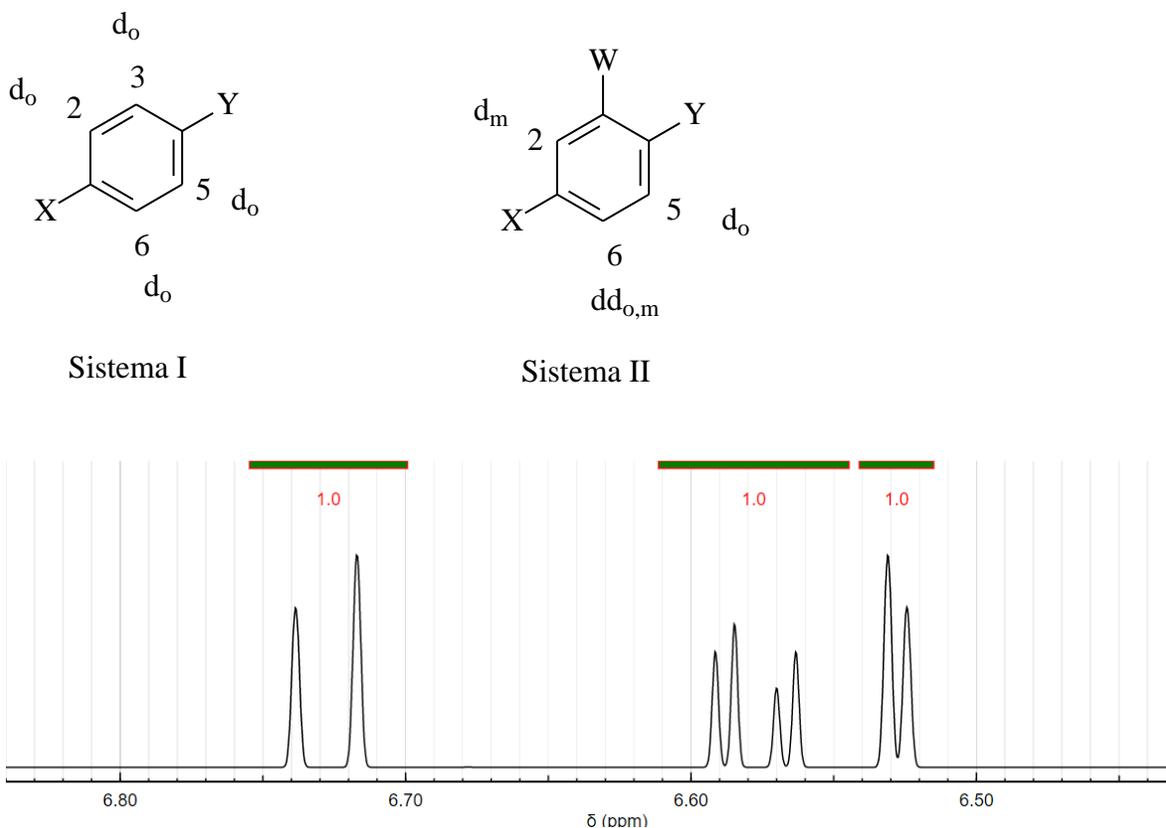


Figura 2. Región de protones aromáticos del espectro RMN- ^1H , predicho para el 2,4-dihidroximetoxibenceno con el software en-línea disponible en nmrdb.org

Para el caso de experimentos de RMN en dos dimensiones (RMN-2D), y nuevamente para el caso de protones aromáticos, al obtener el espectro COSY H-H para el compuesto 2,4-dihidroximetoxibenceno, se observa la vecindad de los protones 5 y 6, en forma de manchas de correlación que forman un cuadrado. A su vez, la señal del protón 2, no muestra correlación con ninguno de los protones 5 y 6, debido a que no son vecinales al protón 2. Para ilustrar esto, la figura 3 muestra el espectro COSY H-H predicho para el 2,4-dihidroximetoxibenceno. En la región de protones aromáticos, se aprecia un pequeño cuadrado con tres puntos azules y uno gris, y la señal de protones del metoxilo en δ 3.80 que no correlaciona con ningún otro protón de la sustancia.

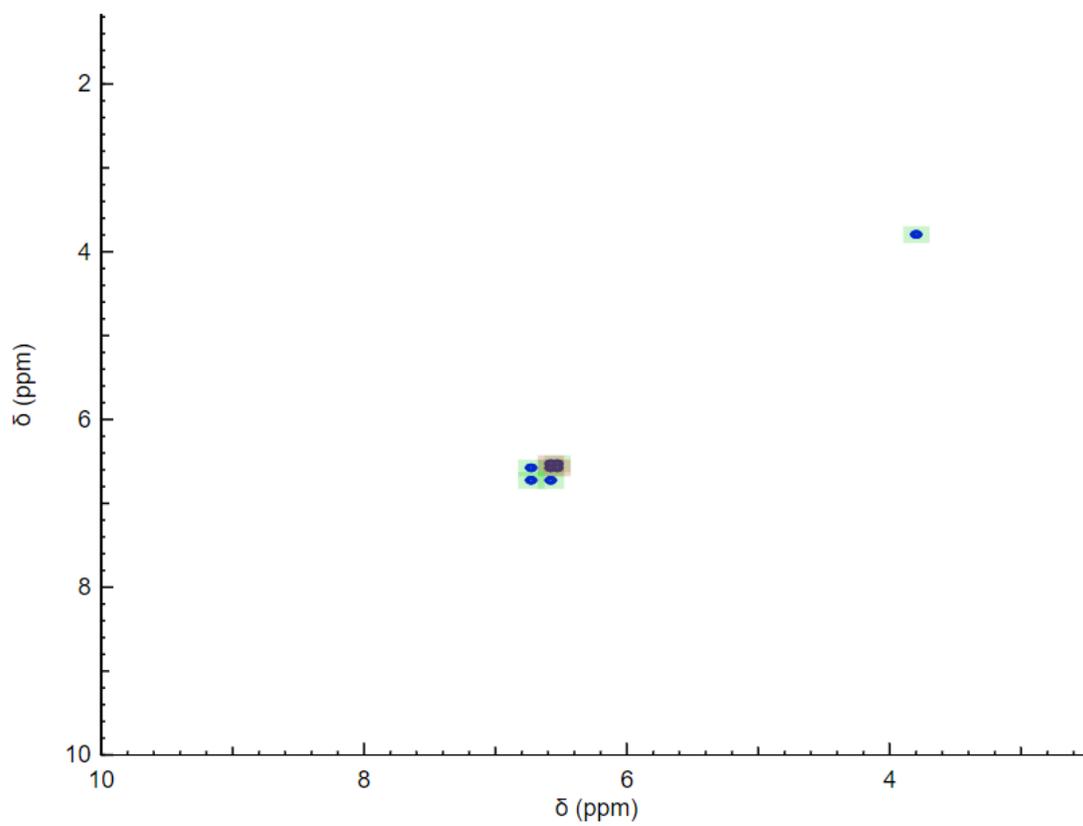


Figura 3. Espectro COSY H-H predicho con el software en línea nmrd.org, para el 2,4-dihidroximetoxibenceno.

Con estos elementos, se les plantea a los estudiantes, hacer la predicción de las señales teóricas y experimentales para metabolitos con anillos aromáticos como la quercetina, la podofilotoxina, la arbutina y el ácido gálico; y comparar dichas predicciones con un simulador RMN.

Capítulo 1

Técnicas generales de aislamiento,
separación, caracterización y cuantificación
de metabolitos secundarios

Introducción

Los procesos experimentales necesarios para la identificación, la cuantificación, el aislamiento, y la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en diversos organismos vivos se han desarrollado y mejorado de una manera vertiginosa en los últimos años. A finales del siglo XX, muchos de estos procesos requerían que se partiera de grandes cantidades de muestras biológicas (del orden de varios kilogramos), con procesos largos de fraccionamiento, purificación y caracterización. Estos procesos duraban inclusive años y se requería de varias personas trabajando de manera colaborativa en diferentes universidades o institutos de investigación. En cambio, actualmente, y gracias al avance de las técnicas de análisis instrumentales, es posible realizar todos estos procesos con muestras más pequeñas (del orden de los gramos), con separaciones más rápidas y eficientes, y hacer la identificación y caracterización química mediante técnicas como la cromatografía líquida y la resonancia magnética nuclear en dos dimensiones, y en tiempos comparativamente más cortos que antes.

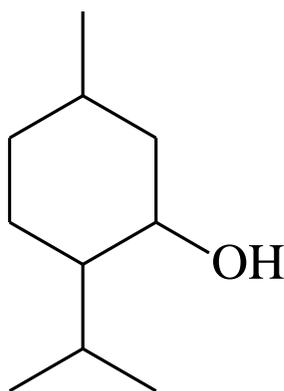
En algunos casos, y particularmente para los procesos de control de calidad de drogas, es posible que se requiera de días u horas, es decir que se logran realizar análisis más rápidos, y con el desarrollo de las técnicas acopladas de separación cromatográfica y análisis espectral, como por ejemplo la cromatografía líquida de alta eficiencia (sigla inglesa HPLC), acoplada a espectrometría de masas tándem, es posible realizar estudios de metabolómica y estandarizar procesos de análisis de control de calidad de muestras complejas como son las drogas naturales aceptadas en diferentes farmacopeas.

En este capítulo, se presentan en secuencia los procesos de extracción, separación, identificación, caracterización y cuantificación. Para la caracterización química se utilizan a manera de ejemplo las estructuras químicas de moléculas relativamente poco complejas estructuralmente, esto con el fin de hacerlo de una forma didáctica y comprensible para el lector. Se hace énfasis especial en el uso de la Resonancia Magnética Nuclear para la caracterización de las sustancias, pues es la técnica analítica que da la información estructural más fina de dichas sustancias.

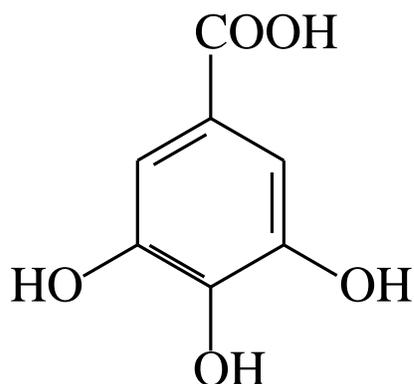
Para una mejor comprensión, es importante considerar que los metabolitos secundarios, se encuentran en los materiales biológicos, básicamente en dos formas: Una forma en la cual una molécula no se encuentra ligada a carbohidratos, la cual se denomina aglicona o forma libre; y la otra forma es en la que se encuentra una molécula ligada a una o varias unidades de carbohidratos, denominada glicósido. Estas formas de aglicona y de glicósidos confieren cada una a las sustancias naturales propiedades muy importantes en su estudio sistemático. A manera de ejemplo mientras la gran mayoría de las formas libres (agliconas) son estables al calentamiento moderado, a la hidrólisis ácida y son solubles en solventes o mezclas de solventes de baja o media polaridad; las formas de glicósidos por el contrario, en su mayoría

son inestables al calentamiento, a la hidrólisis ácida y son insolubles en solventes de poca polaridad, pero en cambio solubles en solventes o mezclas de solventes de mayor polaridad.

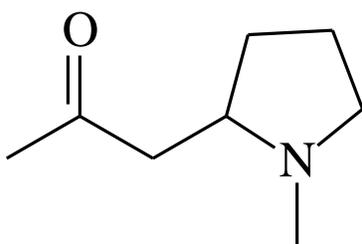
La Figura 1.1. muestra ejemplos simples del mentol (una aglicona monoterpenoide), el ácido gálico (una aglicona fenólica), la higrina (un alcaloide no aromático) y de la arbutina (un glicósido aromático).



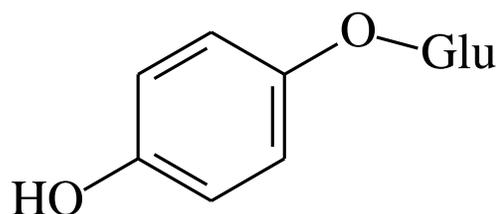
Mentol



Acido gálico



Higrina



Arbutina

Figura 1.1. Estructuras de algunas sustancias naturales. La abreviatura Glu corresponde a la glucosa.

Aquí es importante resaltar que, dependiendo de lo que se pretenda analizar en una matriz o muestra biológica, bien sea agliconas o glicósidos, cada caso determina la metodología y las técnicas de análisis a utilizar. Por ejemplo, en condiciones normales, los glicósidos en general son sólidos polares, solubles en etanol y agua, son térmicamente inestables (se descomponen al tratar de fundirlos), todos son ópticamente activos (debido a la presencia de carbohidratos). Los glicósidos se pueden analizar por cromatografía líquida, por espectrometría de masas de ionización suave, en cambio las agliconas se pueden analizar directamente por cromatografía de gases; y por otras técnicas que no sirven para los glicósidos por su inestabilidad térmica, como la espectrometría de masas de ionización fuerte (impacto electrónico). Es importante precisar, sin embargo, que los compuestos

térmicamente inestables pueden ser derivatizados químicamente, para obtener compuestos que son térmicamente estables y se pueden analizar por las técnicas como cromatografía de gases y la espectrometría de masas de impacto electrónico. En la práctica la derivatización es una técnica muy útil con glicósidos de bajo peso molecular, pero no con los de alto peso molecular como por ejemplo las saponinas terpenoides.

A continuación, se describen de manera general, las técnicas experimentales más utilizadas para los procesos de extracción, separación, identificación, caracterización y cuantificación de metabolitos secundarios.

Técnicas generales de extracción de metabolitos secundarios

A condiciones normales de presión y temperatura, los metabolitos secundarios de interés farmacéutico se encuentran en las muestras naturales generalmente en formas libres (agliconas o geninas), en forma de glicósidos, y en menor proporción en forma de sales (generalmente como sulfatos). La solubilidad de las sustancias naturales en agua, en solventes orgánicos, en medio ácido o alcalino, nos permite afirmar que la mayoría de metabolitos secundarios, pertenecen a alguna de las siguientes grandes clases de sustancias:

- Compuestos solubles en agua y solventes polares
- Compuestos solubles en solventes orgánicos de mediana y baja polaridad
- Compuestos solubles en soluciones acuosas alcalinas
- Compuestos solubles en soluciones acuosas ácidas

Compuestos solubles en agua y solventes polares

En los organismos vivos, se encuentran una gran cantidad y variedad de sustancias que por su polaridad son más solubles en agua y en solventes polares, y en mezclas de agua y solventes como el etanol. Estos compuestos incluyen los denominados glicósidos y las sales (por ejemplo, saponinas, glicósidos terpenoides, flavonoides sulfatados, etc.). La afinidad por el agua la determina la presencia de una o varias unidades de carbohidratos ligados y la presencia de grupos con cargas positivas o negativas. Los glicósidos en general, además de su polaridad y solubilidad presentan propiedades como la inestabilidad térmica, es decir su fragilidad al calentamiento, que lleva a su descomposición. Además, desde el punto de vista químico, sustancias como los glicósidos que tienen carbohidratos ligados a través de oxígeno (O-glicósidos), se hidrolizan fácilmente con ácidos diluidos y con enzimas. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de su extracción, pues la presencia de sustancias ácidas puede favorecer la hidrólisis y liberar las agliconas y carbohidratos correspondientes.

En general, los glicósidos se extraen a partir de material biológico fresco, debido a que durante el proceso de secado se pueden hidrolizar por la acción enzimática, pero en algunas ocasiones también se han reportado extracciones desde el material seco. Por lo anterior, el

método de secado de la muestra biológica siempre recomendable es la liofilización, ya que al eliminar el agua a muy bajas temperaturas, se evitan los procesos enzimáticos que producen cambios químicos en las sustancias originales. Una vez seco el material se muele y el producto puede almacenarse en recipientes adecuados o se puede someter al proceso de extracción.

Una vez se cuente con el material seco y molido, es recomendable que este se someta a un proceso previo de eliminación del material lipídico (desengrase), el cual puede realizarse en un sistema Soxhlet. Se utilizan solventes como hexano para eliminar o separar los compuestos lipídicos que de otra manera interferirían en la extracción de los glicósidos. Una vez se haya eliminado el material lipídico, se procede a la extracción con agua o agua mezclada con alcohol.

En este punto se utilizan actualmente varias metodologías que incluyen principalmente el uso de agitadores mecánicos, magnéticos, ultrasonido y con microondas. Las técnicas con microondas y ultrasonido disminuyen el tiempo de extracción, la cantidad de energía usada, la cantidad de solventes utilizados, y por tanto las emisiones de dióxido de carbono al ambiente. Estas técnicas amigables con el medio ambiente son cada vez más utilizadas por los analistas e investigadores, para los diferentes tipos de metabolitos. Por ejemplo, en el caso de las antocianinas, que son metabolitos solubles en agua y las cuales están presentes en los pétalos coloreados de muchas flores, se han reportado métodos de extracción con rendimientos altos al utilizar las microondas.

En el caso de metabolitos tales como los carbohidratos, en especial los polisacáridos, los cuales son de interés por las diferentes actividades biológicas que han mostrado, las cuales a su vez incluyen la actividad antioxidante, inmuno moduladora, antidiabética, antibiótica, antiinflamatoria, entre otras; y debido a su complejidad, se requiere del uso de varias técnicas combinadas para su extracción. El proceso de extracción generalmente inicia con agitación a baja temperatura utilizando como solvente extractor el agua. Luego la solución acuosa es combinada con diferentes volúmenes de alcohol, lo que produce la precipitación de los compuestos. Estos carbohidratos se pueden recuperar por procesos de centrifugación.

Compuestos solubles en solventes orgánicos de mediana y baja polaridad

A diferencia de los compuestos de mayor polaridad como los glicósidos, muchos metabolitos secundarios que se conocen como formas libres, agliconas o geninas; son insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos de baja o mediana polaridad como el cloroformo. Este solvente en particular es de amplio uso en los laboratorios, pero además de costoso es tóxico y contamina el medio ambiente, por lo cual se sugiere remplazarlo en los procesos de extracción, por solventes menos tóxicos como el acetato de etilo.

Dentro de estos compuestos se incluyen los terpenoides, alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, en forma libre o esterificada con ácidos orgánicos.

Para la extracción, el material biológico se puede secar por liofilización o por calentamiento a temperaturas no mayores de 60°C, para evitar los cambios químicos de las sustancias de interés. Una vez seco, el material se muele y se somete a extracción con un solvente orgánico de mediana o baja polaridad, dependiendo de la polaridad de las sustancias a analizar.

Como en el caso de los compuestos polares, los métodos de agitación mecánica, magnética, ultrasonido y microondas son también útiles para este tipo de compuestos, y nuevamente se resaltan las ventajas económicas, de tiempo, y ambientales de la extracción con microondas. También se han reportado sistemas de extracción más eficientes como el denominado Sistema de Extracción Continuo con Solventes Presurizados (sigla inglesa CPSE). Este utiliza un solvente como el etanol, el cual se hace pasar con ayuda de una bomba de HPLC a través de una columna empacada con arena de Ottawa y la muestra biológica a extraer. Al sistema se le puede incorporar un sistema de calentamiento para mejorar el proceso de extracción. Este sistema ha mostrado una mayor eficiencia de extracción para compuestos como carotenoides y ácidos grasos.

Compuestos solubles en soluciones acuosas alcalinas

Una buena cantidad de compuestos naturales, que clasifican dentro de las dos categorías anteriores, presentan en su estructura grupos ácidos como el carboxilo y el hidroxilo fenólico. Estos compuestos tienden a formar sales solubles en agua, cuando se neutralizan con bases fuertes. Para el caso de los compuestos de bajo peso molecular, puede entonces utilizarse la extracción con una solución acuosa alcalina, pero en general no se utiliza mucho la extracción con bases fuertes, debido a que muchos compuestos son inestables y se descomponen, como es el caso de muchos flavonoides poli hidroxilados y otros compuestos fenólicos. Al revisar la literatura científica no se encuentran muchos ejemplos de la utilización de la extracción con bases, con excepción de algunas técnicas de extracción y análisis de compuestos fenólicos simples con soluciones de bases como el bicarbonato de sodio y para la extracción de alcaloides. Para estos últimos, las muestras biológicas se muelen y se humedecen con una solución alcalina (generalmente amoniaco acuoso diluido), para liberarlos de su forma de sales, a su forma básica alcalina. Sin embargo, el uso de tiempos largos de interacción entre los alcaloides y las bases puede llevar a procesos indeseables como su isomerización.

Para el caso de los compuestos fenólicos en general, se recomienda la extracción a partir de material fresco con alcohol en ebullición, pero hay que considerar que no todos los compuestos fenólicos presentan la misma complejidad estructural, la cual es importante de tener en cuenta si se desea establecer unas condiciones óptimas para su extracción. Aquí es

importante anotar que, en los procesos de extracción, se utiliza en muchos trabajos el metanol, pero al considerar los riesgos para la salud y el ambiente de este alcohol, es recomendable que se utilice en su remplazo el etanol.

Compuestos solubles en soluciones acuosas ácidas

Dentro de esta categoría están los compuestos nitrogenados, específicamente los alcaloides con nitrógeno amínico. El par electrónico libre del átomo de nitrógeno, determina que estas sustancias, generalmente insolubles en agua, son bases débiles y por tanto pueden formar sales solubles en agua, al tratar la muestra biológica con soluciones de ácidos fuertes diluidos como el ácido clorhídrico. Este comportamiento ácido-base de los alcaloides amínicos, es el fundamento para su extracción por métodos clásicos como la maceración y partición líquido-líquido. Sin embargo, más recientemente se han incorporado métodos más rápidos, más económicos y más amigables con el medio ambiente como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción con solventes presurizados (SPE). Es de esperar en el futuro que se disponga comercialmente de equipos para su uso rutinario, pero aún todavía los métodos de extracción líquido-líquido resultan útiles para muchos propósitos.

En general se encuentra al revisar la literatura científica, que la extracción de metabolitos se realiza fundamentalmente con solventes como el agua, el alcohol y cloroformo; dependiendo de la polaridad de los compuestos a analizar. También se observa la tendencia cada vez mayor de reducir las emisiones contaminantes al medio ambiente. Aquí vale la pena revisar sobre el uso de solventes menos contaminantes, y remplazar el uso de solventes como el cloroformo y el diclorometano, por ejemplo, por otros de polaridad similar como el acetato de etilo. En el caso del alcohol, lo más recomendable es utilizar preferiblemente etanol, en lugar de metanol; por los efectos tóxicos de este último, nuevamente teniendo en cuenta que tienen una polaridad similar.

Extracción con solventes eutécticos viscosos (DES) y líquidos iónicos (IL)

Aunque para muchos propósitos analíticos, la simple extracción con etanol a bajas temperaturas (menos de 50°C) proporciona extractos enriquecidos en metabolitos secundarios, en los últimos años se ha incrementado el interés en minimizar los efectos negativos en el medio ambiente, de todas las actividades humanas, y esto incluye el uso en grandes volúmenes de productos químicos, como los solventes orgánicos. Para esto se han buscado nuevas alternativas al uso de estos materiales los cuales son usados desde hace muchas décadas en todos los laboratorios y empresas que los requieren para sus productos y procesos.

Una primera aproximación ha sido el reducir el uso de grandes cantidades de los solventes orgánicos, por ejemplo, en los procesos de extracción y separación. Esto en gran parte debido al avance y desarrollo de las técnicas analíticas instrumentales, los cuales permiten

trabajar con cantidades más pequeñas de muestras y por tanto reducir el consumo de estos solventes. Además, se han desarrollado técnicas de extracción como las denominadas técnicas de micro extracción en fase líquida (sigla inglesa LPME).

Más recientemente se han comenzado a utilizar los denominados solventes eutécticos viscosos (sigla inglesa DES) y los líquidos iónicos (IL). Por definición, los líquidos iónicos se obtienen al combinar cationes orgánicos con aniones orgánicos e inorgánicos, mientras los solventes DES se obtienen al combinar dos o más compuestos orgánicos sólidos que no necesariamente son todos sales, como por ejemplo combinar una sal de amonio cuaternaria como el cloruro de colina con sacarosa. La mezcla resultante presenta un punto de fusión más bajo que el de cada una de las dos sustancias aisladas, de ahí el nombre de líquidos eutécticos. Los líquidos o solventes DES, se preparan al mezclar por ejemplo una sal de amonio cuaternaria con otra sustancia donora de enlaces de hidrógeno HBD como son los ácidos, las amidas, los alcoholes, las aminas, etc. La figura 2.2, esquematiza la formación de un solvente DES entre una molécula de prolina (HBA, aceptor de H) y una molécula de ácido málico (HBD, donador de H). La formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares y las interacciones de Van der Waals entre otros, son los factores que llevan a la disminución del punto de fusión de la mezcla DES. Es importante mencionar que algunos autores denominan NADES a los solventes eutécticos preparados para la extracción de productos naturales.

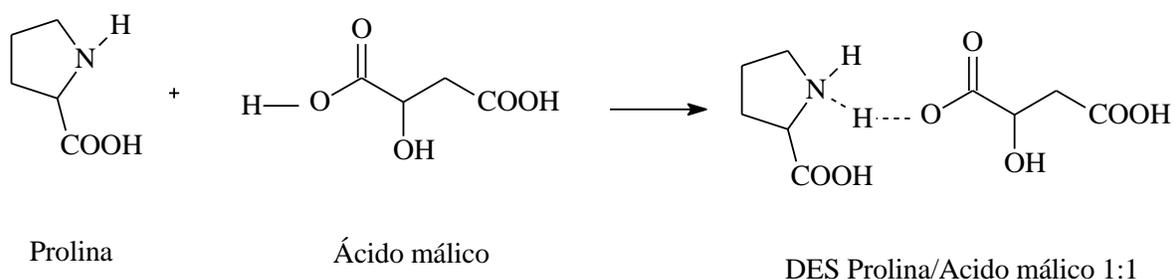


Figura 2.2. Formación de un solvente DES a partir de prolina y ácido málico.

La tabla 1.1, muestra algunas de los solventes DES más utilizados, junto con algunas de sus características físico-químicas más importantes como son la temperatura de congelación, la densidad y la viscosidad. Además, se les vienen determinando otras propiedades como el índice de refracción, la tensión superficial, la capacidad calorífica, la conductividad eléctrica, etc. La sal rotulada como ChCl corresponde al cloruro de colina y es el aceptor de enlaces de hidrógeno más utilizado. Algunos autores asignan nombres a las mezclas DES como por ejemplo la mezcla de ChCl con urea la denominan relina, la mezcla ChCl con etilenglicol la denominan etalina, la mezcla de ChCl y ácido málico la denominan malicina, y la mezcla ChCl con glicerina, la denominan glicelina.

La viscosidad de los solventes DES se puede disminuir agregándoles agua y aumentando la temperatura. En cuanto a la cantidad de agua, se reportan valores hasta del 30-50% máximo,

debido a que el exceso de agua disminuye la estabilidad del líquido DES por el rompimiento de los enlaces de hidrógeno intermoleculares.

Como se anotó anteriormente, los solventes DES se producen fácilmente en el laboratorio mediante la combinación adecuada de una sal de amonio cuaternaria como el cloruro de colina, reconocida con la sigla inglesa ChCl; y otro componente, que puede ser un ácido orgánico como el malónico, un carbohidrato, un ácido graso como el ácido decanoico, un terpeno como el mentol, etc.

Tabla 1.1. Lista de algunos solventes DES y de algunas de sus propiedades físico-químicas.

HBA	HBD	Proporción molar Sal/HBD	Temperatura congelación (°C)	Densidad (g/ml, 25°C)	Viscosidad η /mPa s
ChCl	Urea	1:2	12	1.25	750 (25°C)
ChCl	Glicerina	1:2	40	1.18	259 (25°C)
ChCl	Glicerina	1:3	-	1.20	450 (20°C)
ChCl	Etilénglicol	1:2	66	1.12	37 (25°C)
ChCl	Ácido malónico	1:2	-	1.25	1124 (25°C)
EtNH ₃ Cl	CF ₃ CONH ₂	1:1.5	-	1.273	256 (40°C)
EtNH ₃ Cl	Acetamida	1:1.5	-	1.041	64 (40°C)
EtNH ₃ Cl	Urea	1:1.5	29	1.140	128 (40°C)
ZnCl ₂	Urea	1:3.5	-	1.63	11340 (25°C)
ZnCl ₂	Acetamida	1:4	303.15	1.36	-

Al revisar la literatura científica existente, se encuentran varios procedimientos para la preparación de solventes DES, entre los cuales están el método con evaporación y el método con calentamiento. En el método evaporativo los dos sólidos se disuelven en agua y se evaporan a 50°C en un rotavapor. El líquido resultante se pone en un desecador con sílica gel hasta que alcance un peso constante. En el método con calentamiento los dos sólidos, y la cantidad calculada de agua se ponen en un recipiente con una barra de agitación magnética y se calienta con agua a temperaturas menores de 50°C. Se agita hasta cuando se obtiene un líquido claro (generalmente entre 30 y 90 min).

Otras variantes de estos métodos reportadas incluyen las siguientes:

1. La mezcla se calienta a 50-100°C o se liofiliza, y el resultado es un líquido a condiciones normales.
2. Al moler en un mortero los dos sólidos, a temperatura ambiente, se logra al final obtener un líquido DES.

3. Mezclando los dos sólidos con calentamiento a 50 o 100°C.
4. Se prepara la mezcla de HA y HB con el agua en un recipiente de vidrio, por ejemplo, en proporción 1:1:10. Se mezclan con ayuda de un agitador vortex durante 1 min. Después se pone en un baño ultrasonido durante 30 min. Se vuelve a homogenizar con ayuda del vortex y nuevamente se somete al ultrasonido durante 15 min. El líquido obtenido se guarda en un desecador a temperatura ambiente.

El uso de diferentes compuestos mezclados con el cloruro de colina, produce líquidos eutécticos espesos de diferentes polaridades y diferentes propiedades, con los cuales es posible realizar la extracción de los diferentes metabolitos presentes en fuentes naturales. La combinación del cloruro de colina con varios productos naturales como ácido láctico, glicerina, glucosa, sacarosa, prolina, etc., produce los solventes eutécticos viscosos naturales, denominados con la sigla inglesa NADES. Además del cloruro de colina, se utilizan otros compuestos como betaína, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, prolina, serina, ácido glutámico, glucosa y alanina. La viscosidad de estos solventes se disminuye al agregarles agua, y se utilizan cada vez más para la extracción de un amplio rango de metabolitos, inclusive macromoléculas como el ADN, proteínas, polisacáridos, etc., con la ventaja de que no son tóxicos ni dañinos al medio ambiente y son relativamente económicos. Para el caso de la extracción de metabolitos apolares se utilizan mezclas de mentol (un terpenoide) con ácido acético (1:1), ácido pirúvico (1:2), ácido láctico (1:2) y ácido laúrico (2:1).

Los estudios *in silico* de las propiedades fisicoquímicas de las sales de amonio más comúnmente utilizadas como son el cloruro de colina, la betaina y cloruro de tetrametilamonio, con varios donores de hidrógeno (HBD) muestran que la combinación de betaina con cafeína es la más promisoría de acuerdo con los valores calculados de densidad, coeficiente de actividad, reactividad y energías de interacción.

Dentro de la gran cantidad de metabolitos secundarios, en el grupo de los compuestos fenólicos en particular, los más reportados son los flavonoides con la extracción DES, lo que muestra que es una técnica útil, incluyendo tanto las agliconas como los glicósidos por ejemplo con DES de cloruro de colina con ácido láctico, cloruro de colina con ácido cítrico, y cloruro de colina con 1,4-butanodiol, entre otros, sin embargo se encuentran trabajos reportados para la extracción de otras clases de metabolitos como ácidos grasos, terpenos, carbohidratos, etc. La Tabla 1.2, presenta algunos ejemplos de solventes DES reportados y sus aplicaciones en diferentes clases de metabolitos secundarios.

Para la aplicación a escala industrial de estos solventes DES es necesario conocer sus propiedades físicas y su estabilidad térmica.

Finalmente, es importante mencionar que algunos investigadores están evaluando mezclas ternarias, que denomina TGES (sigla inglesa de Ternary Green Extraction Solvents), que a

diferencia de los solventes DES, no se preparan con dos compuestos, sino con tres, y se logra cambiar propiedades físicas como la viscosidad.

Tabla 1.2. Algunos ejemplos de solventes DES y su utilidad en la extracción de diferentes metabolitos.

DES (HBA/HBD)	Aplicaciones/Metabolitos
ChCl: Acido málico	Extracción de antocianinas
ChCl: Acido láctico	Microencapsulación de antocianinas, extracción de compuestos fenólicos, agliconas y glicósidos flavonoides
ChCl: Acido decanoico	Extracción de ácidos grasos
ChCl: Acido cítrico	Extracción de compuestos fenólicos
ChCl: Acido butírico y ChCl: Acido fenilpropiónico	Extracción de compuestos fenólicos
ChCl: ácido oxálico	Extracción de compuestos fenólicos
ChCl: 1,4-butanodiol y ChCl: 1,2-propanodiol	Extracción de flavonoides
Betaína/Etilénglicol (1:4)	Flavonoides
Cloruro de tetrabutilamonio: Acido decanoico 1:3	Quercetina
Betaína: Glicerina: Glucosa 4:20:1	Rutina, catequina, extractos de té verde, cosméticos
Acido láctico: Glucosa 5:1	Comp. fenólicos
Mentol: Acido acético 1:1	Cannabinoides
Varios	Extracción de compuestos fenólicos, aceites esenciales, terpenoides, astaxantina, etc.
Varios	Extracción de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y fosfolípidos

Extracción en fase sólida

Para muchos procesos de análisis, se han desarrollado dispositivos y materiales que permiten el análisis más rápido de metabolitos presentes en matrices biológicas, los cuales son muy útiles en actividades como el control de calidad de materias primas vegetales. El ejemplo más claro de esto son los cartuchos de extracción, que son dispositivos cilíndricos empacados con diferentes fases estacionarias que interactúan con soluciones de muestras o extractos vegetales, que al pasar a través de ellos separan las sustancias presentes por interacciones lipofílicas, por ejemplo, con fases estacionarias de cadenas hidrocarbonadas C-8 ó C-18, o

por interacciones polares con fases estacionarias polares. Estas clases de cartuchos de extracción de fase reversa son las más utilizadas, se las conoce por la sigla inglesa SPE (Solid Phase Extraction), aunque existen en el mercado cartuchos con otras fases estacionarias modificadas químicamente, de acuerdo al tipo de metabolitos para los que se vayan a usar.

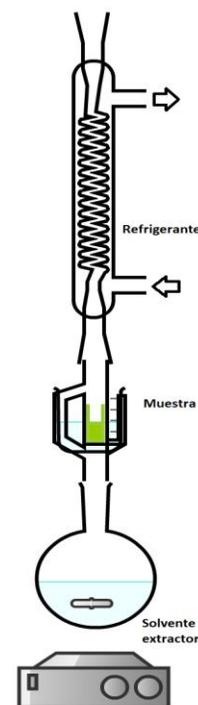
Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet utiliza un sistema de evaporación y condensación continua sobre una muestra generalmente seca y molida previamente. Se utilizan solventes orgánicos de mediana o baja polaridad como hexano, diclorometano, entre otros. Es muy utilizada para la extracción de sustancias de mediana y baja polaridad, particularmente lípidos tales como triglicéridos, terpenoides, etc. Presenta como ventaja que al ser un proceso continuo se pueden realizar extracciones exhaustivas de las sustancias de interés, a las temperaturas de ebullición de los solventes usados.

La extracción Soxhlet permite el trabajo con muestras de 10 a 30 g, no requiere de filtración después de la extracción, y no requiere generalmente que esté presente el analista todo el tiempo durante el proceso de extracción. Las desventajas incluyen los tiempos largos de extracción (dependiendo del tamaño de la muestra hasta 24-48 horas), los volúmenes grandes de solventes orgánicos necesarios, y la necesidad de concentrar (evaporar) grandes volúmenes de solventes.

La figura 2.2 muestra un esquema simplificado de un sistema de extracción Soxhlet.

Figura 2.2. Esquema simplificado de un dispositivo de extracción Soxhlet. En la parte superior hay un sistema de refrigeración a través de la circulación de un líquido enfriador, el cual condensa los vapores del solvente utilizado para extraer y el líquido condensado cae nuevamente sobre la muestra. El recipiente del medio contiene un compartimento en el cual se coloca la muestra seca y molida dentro de un dedal poroso, evitando que las partículas de esta muestra se caigan en el matraz de extracción que contiene el solvente extractor. En la parte de abajo un sistema de calentamiento y agitación magnética.



Extracción asistida con ultrasonido

Aunque para muchos propósitos de extracción se utilizan ampliamente métodos como la maceración con solventes orgánicos, generalmente acompañada de procesos de agitación mecánica o magnética; o procesos como la extracción Soxhlet, especialmente para obtener los componentes liposolubles; más recientemente se han incorporado las técnicas que involucran el ultrasonido y las microondas para facilitar el proceso de extracción de los metabolitos.

En el caso de los métodos asistidos con ultrasonido, se disminuyen los tiempos de extracción, además que presentan beneficios ambientales y de seguridad, al no requerir de cantidades altas de solventes orgánicos, por ejemplo, como los organoclorados, y de solventes inflamables como el acetato de etilo, entre otros. Una revisión reciente, muestra como para muchas matrices vegetales como son los extractos antioxidantes del fruto de la granada; los carotenoides del tomate, los componentes del aroma del ajo, los extractos antioxidantes de uvas, los aceites de semillas de papaya, de almendras, de soya, de pistachos; los extractos de romero, de mejorana, etc.; se utilizan solventes como agua, etanol, hexano, que producen menos emisiones de dióxido de carbono y menos vapores tóxicos. En la actualidad ya se consiguen extractores a nivel industrial que utilizan el ultrasonido.

La extracción con ayuda de ultrasonido es comparativamente más rápida que la extracción Soxhlet, ya que, para muestras de menos de 30 g, se requieren tiempos de extracción de menos de una hora. Además, permite la extracción de muestras relativamente grandes con menores costos, pero como la extracción Soxhlet, requiere de mayores tiempos y operaciones en la filtración y la evaporación.

Extracción con fluidos supercríticos y subcríticos

Debido a que muchos de los procesos de extracción usados tradicionalmente para obtener sustancias naturales incluyen el uso de solventes orgánicos, especialmente los halogenados como el cloroformo y el diclorometano, como ya se mencionó anteriormente; se han diseñado técnicas de extracción menos dañinas para la salud y el medio ambiente. Este es el caso de la extracción con fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico podemos definirlo simplemente como una sustancia que, en condiciones normales de presión atmosférica y temperatura, es un gas, pero que al comprimirlo se convierte en un líquido. Este estado líquido se mantiene en recipientes de acero inoxidable resistentes a altas presiones y bajas temperaturas. Este líquido al hacerlo pasar a través de una muestra biológica, puede utilizarse como cualquier solvente orgánico para extraer los metabolitos de las muestras biológicas. La sustancia más utilizada para este propósito es el dióxido de carbono, cual es una sustancia abundante en la naturaleza, es relativamente poco costoso, y se puede comprimir adecuadamente a altas presiones (73 atm) y bajas temperaturas (31°C). El

proceso de extracción con CO₂ supercrítico, requiere de un montaje que incluye un cilindro con CO₂ gaseoso, conectado a un compresor de alta potencia y con control de la temperatura. Una vez sometido el material vegetal al contacto con el fluido supercrítico, se solubilizan las sustancias, se transportan a una interfase con una matriz sólida sobre la cual se absorben las sustancias extraídas, y se libera la presión para eliminar el CO₂ en forma gaseosa. Esta técnica de extracción ya está disponible comercialmente no solo para fines de investigación sino también para fines de producción a nivel comercial no solo de extractos sino también para extraer los diferentes metabolitos de interés farmacéutico o alimentario como esencias, fragancias, colorantes, antioxidantes, drogas vegetales, pesticidas, descafeinado, desengrase de productos alimenticios, extracción de lúpulo, etc.

El dióxido de carbono no es tóxico, no es inflamable y relativamente amigable con el medio ambiente. Además, permite el uso de sustancias modificadoras que se añaden y que pueden controlarse variando la presión y temperatura del sistema.

En los últimos años se han venido desarrollando nuevos dispositivos para la extracción, utilizando fluidos subcríticos. En este caso se utilizan solventes como agua o etanol, que se calientan y comprimen a temperaturas y presiones por debajo del punto crítico. Nuevamente, se considera un método no solo novedoso sino menos contaminante. Un ejemplo de estos trabajos es la extracción con etanol subcrítico de los flavonoides de *Moringa oleifera*, en la cual se obtienen además extracciones más rápidas, con menor gasto de energía.

Extracción asistida con microondas

La búsqueda constante para lograr métodos de extracción más rápidos, eficientes, económicos y amigables del medio ambiente ha llevado a considerar también el uso de las radiaciones de microondas como un medio físico para facilitar los procesos de extracción de los metabolitos de las diferentes matrices biológicas, facilitando su disolución en un solvente.

Los métodos de extracción asistidos por microondas (sigla inglesa MAE), utilizan microondas que pueden penetrar fácilmente a través de los poros de las muestras, haciendo que el solvente quede atrapado en dichos poros permitiendo que el solvente se caliente más rápidamente al absorber las microondas. Esta técnica de extracción es rápida (por ejemplo en 20-30 min se pueden procesar unas 12 muestras, además se utilizan menores cantidades de solventes comparada con el uso de ultrasonido y la extracción Soxhlet, además permite el control total de los parámetros de extracción tales como el tiempo, la energía y la temperatura. Además, permite utilizar temperaturas relativamente altas, permite la agitación y no requiere de agentes de secado porque el agua absorbe microondas muy rápido y permite así ayudar en el calentamiento de la muestra.

Las desventajas de la extracción asistida con microondas incluyen que los extractos deben ser filtrados después de la extracción, se requieren solventes polares y el equipo necesario es costoso.

El efecto de las microondas en el proceso de extracción muestra resultados positivos por ejemplo en el caso de metabolitos tales como los flavonoides. Otro ejemplo es el análisis de la marrubiina, un diterpenoide furánico presente en el marrubio blanco *Marrubium vulgare*, aceptado en las farmacopeas europeas y con reportes de efectos antihipertensivo, antioxidante, antiinflamatorio, antidiabético, efectos en el sistema respiratorio, estimulante digestivo, antiasmático, hipolipidémico, antibacteriano y anti hongos.

En general, la tendencia actual es a la utilización de solventes menos contaminantes, en menores volúmenes, y al uso de una o varias de las técnicas de extracción asistida con microondas, ultrasonido y fluidos supercríticos.

Cromatografía en Capa Fina y en Columna (CCF y CC)

Desde que se descubrió el uso de las técnicas de CCF y CC en los inicios del siglo 20, para la separación y análisis de metabolitos secundarios vegetales; ambas técnicas se constituyeron en herramientas fundamentales para el trabajo experimental de aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios.

Estas técnicas han sido mejoradas a través de los años, con el desarrollo de nuevos materiales para utilizar como fase estacionaria; sin embargo, la sílica gel, en sus diferentes presentaciones y especificaciones, y su derivado de fase inversa el octadecilsilano; ambos se utilizan ampliamente en los laboratorios de docencia, investigación, control de calidad y plantas de producción.

La CCF con sílica gel, es una técnica muy útil para la separación de mezclas de compuestos de mediana y baja polaridad, es decir sustancias tipo aglicona. La separación se da por las interacciones entre los grupos polares de los compuestos y los grupos hidroxilos ligados a átomos de silicio, presentes en la sílica gel. Esta cromatografía conocida también como Cromatografía Normal, donde la fase estacionaria es polar. En contraparte, y especialmente para el caso de los glicósidos, se utiliza más la cromatografía en fase inversa con octadecilsilano. En esta técnica, los grupos hidroxilos de la sílica, se modifican químicamente reemplazando el hidrógeno del hidroxilo, por cadenas hidrocarbonadas, de 8, 18 y más átomos de carbono, o por otros grupos funcionales químicos. Cuando se tienen estas sílicas modificadas con cadenas hidrocarbonadas, se habla de Cromatografía en Fase Reversa, ó Fase Inversa. En este caso, la separación se da por las interacciones lipofílicas entre las porciones apolares de los compuestos de la mezcla, y las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria.

Una referencia importante para el caso del análisis por cromatografía en capa fina de drogas vegetales es el libro clásico Análisis de Drogas Vegetales de Bladt y col.

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (sigla inglesa HPLC)

Sin duda la técnica de separación cada vez más utilizada es la cromatografía líquida de Alta Eficiencia, comúnmente nombrada con la sigla inglesa HPLC. Esta técnica instrumental supera ampliamente en cuanto a la capacidad de separación de los componentes de una mezcla, a la CCF. Además, al ser automatizada y controlada por procesadores computarizados, facilita los procesos de no solo de separación, conservación digital de los resultados, sino también de cuantificar los componentes de una muestra biológica.

La cromatografía HPLC desde su desarrollo inicial, ha venido siendo mejorada no solo en cuanto a las especificaciones básicas de las columnas, sino especialmente en cuanto a su acoplamiento con diferentes detectores. El tamaño de partícula de la fase estacionaria generalmente es de 2 a 5 μm , pero más recientemente se han incorporado tamaños de partícula menores a 2 μm , lo que se traduce en una separación más eficiente, pero se requiere de bombas de presión de mayor capacidad (más de 6.000 psi), por lo que a ésta se la denomina UPLC, ó UHPLC, hablándose de ultra-HPLC. Aparte del detector UV-visible, ampliamente utilizado para muchos propósitos analíticos; los detectores universales como el ELSD también permiten el análisis de sustancias naturales que no son observables con los detectores UV-visible. Además de estos detectores, se cuenta con detectores como los de arreglo de diodos, conocidos por la sigla inglesa DAD, los cuales permiten a la vez que ocurre la separación cromatográfica, la obtención de los correspondientes espectros UV-visible.

Pero indudablemente la técnica más utilizada actualmente para propósitos analíticos y de investigación es la cromatografía HPLC acoplada a detectores de masas. Mediante esta técnica además de obtener las mejores separaciones de mezclas de metabolitos, y a la vez se obtienen los correspondientes espectros de masas. Comercialmente se dispone de sistemas que integran ultra-HPLC, con detectores de masas electrospray, que permiten determinar espectros de masas que se pueden analizar y comparar con los disponibles en las bases de datos, permitiendo analizar e identificar muchas sustancias naturales. Además, con los detectores de masas disponibles, se pueden obtener no solo los espectros de masas de primer orden, sino de segundo, tercero y más ordenes (espectrometría de masas tándem), lo que permite identificar con mayor precisión cada sustancia.

Más recientemente se han venido desarrollando equipos de HPLC acoplados a espectrómetros de RMN, con lo cual se pueden caracterizar químicamente muchos compuestos naturales. Estos sistemas que incorporan no solo nuevos desarrollos tecnológicos sino bioinformáticos, además de servir como técnicas de control de calidad avanzado, son útiles en tareas como la quimio taxonomía y la metabolómica de los productos

naturales. Un ejemplo de la utilidad de estas técnicas combinadas es el análisis de inyectables XueBiJing®. Este producto de base herbaria está aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos China para el tratamiento de sepsis y varios síndromes disfuncionales orgánicos. Este fitoterapéutico se obtiene de cinco plantas chinas: flores de *Carthami*, raíces de *Paeoniae rubra*, rizomas de *Chuanxiong*, raíces de *Salviae miltiorrhizae* y raíces de *Angelicae sinensis*. Mediante la combinación de UHPLC y espectrometría de masas, se pueden determinar rápidamente hasta 30 componentes. También se cuenta ya con sistemas integrados por el cromatógrafo HPLC, con el detector de arreglo de diodos y el espectrómetro de masas, con los cuales la identificación de muchos compuestos naturales como los carotenoides en diferentes muestras, es más eficiente, más rápida y confiable.

Otra técnica actualmente usada es la cromatografía de contracorriente CCC, en la que se utilizan dos líquidos inmiscibles a manera de fase móvil y fase estacionaria, lo que evita los procesos de degradación química del compuesto de interés, la adsorción irreversible en la fase móvil, y la pérdida de muestra durante el proceso de aislamiento. En esta técnica, la fase estacionaria es retenida en la columna de separación por la fuerza centrífuga, mientras la fase móvil es bombeada a través de la fase estacionaria a una velocidad de flujo determinada. La muestra sufre partición de manera repetida a lo largo de la columna, entre ambas fases. Los compuestos presentes en la muestra eluyen a diferentes tiempos, dependiendo de sus coeficientes de partición, lo que determina su separación al final.

Actualmente las variantes más utilizadas incluyen la HSCCC (Cromatografía de Contracorriente de Alta Velocidad), y la CPC (Cromatografía Centrífuga de partición). La HSCCC cuenta con instrumentos que retienen más grandes cantidades de fase estacionaria contra mayores velocidades de flujo de la fase móvil (utiliza mayores niveles de fuerza G) bajo condiciones de alta velocidad rotacional, lo que acelera el proceso de separación frente a la CCC convencional.

Técnicas generales de caracterización de metabolitos secundarios

Las técnicas instrumentales se han venido desarrollando y avanzando paulatinamente, y permiten de una manera rápida y confiable el trabajo de caracterización de muchas sustancias naturales, inclusive las que están en muy baja concentración en las fuentes naturales. Estas técnicas además presentan muchas ventajas sobre los métodos de caracterización e identificación usados por los químicos de productos naturales del siglo pasado, como por ejemplo las pruebas o ensayos químicos, los cuales requieren de cantidades de muestras mucho más grandes que las que requieren las técnicas instrumentales. Además, muchas pruebas o ensayos químicos requieren el uso extensivo de reactivos y materiales tóxicos y adicionalmente muy contaminantes para el medio ambiente, como es el caso de muchos solventes orgánicos (cloroformo, diclorometano, benceno, etc.).

Un ejemplo de estos son los ensayos de reconocimiento de alcaloides, los cuales requieren el uso de sales de metales pesados. Estas limitaciones y dificultades justifican ampliamente el uso preferente de las técnicas instrumentales, sobre otras técnicas de identificación; aunque en muchas ocasiones pueden resultar aún muy útiles los ensayos químicos, con las debidas precauciones del manejo de los reactivos y sus desechos.

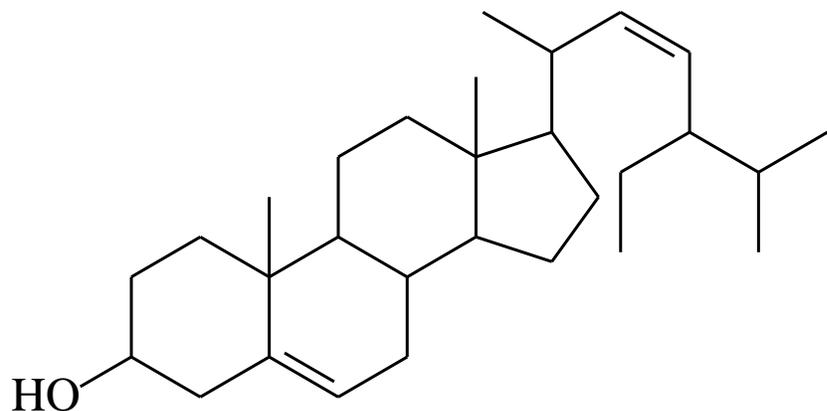
A continuación, se presentan algunos aspectos más relacionados con el uso de las técnicas instrumentales para fines de dilucidación estructural, como son las técnicas espectroscópicas ultravioleta-visible (UV-vis), infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), todas enfocadas a la identificación o caracterización de productos naturales, particularmente los denominados metabolitos secundarios.

Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-vis)

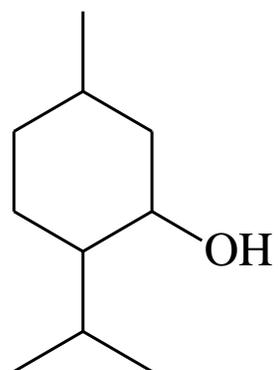
Entre las decenas de miles de metabolitos secundarios que actualmente se conocen, se encuentran fundamentalmente dos tipos de sustancias. Las primeras son sustancias que no absorben luz ultravioleta en el rango de trabajo normal de 195 a 380 nm, ni tampoco en la región visible. Se trata de sustancias como una gran cantidad de terpenoides que no contienen en su estructura grupos cromóforos. Son ejemplos de estas (figura 1.2), los esteroides como el estigmasterol, triterpenoides como la amirina, monoterpenos como el mentol, muchos ácidos grasos, etc. Estas sustancias son transparentes en la región ultravioleta de trabajo, y su análisis por esta técnica es muy limitado.

Las otras sustancias, incluyen muchas sustancias con grupos que absorben en la región ultravioleta de trabajo, como son las que poseen en su estructura a los anillos aromáticos. Además, también muchas sustancias que, aunque no tienen anillos aromáticos, poseen enlaces dobles carbono-carbono conjugados (denominados grupos dieno conjugados), o enlaces dobles carbono-carbono conjugados a grupos carbonilos (denominados grupos enona conjugados). Estas incluyen a los compuestos fenólicos, y a algunos terpenoides. Son ejemplo de estas sustancias el flavonoide quercetina, el lignano podofilotoxina, el carotenoide β -caroteno, el esteroide ergosterol, etc.

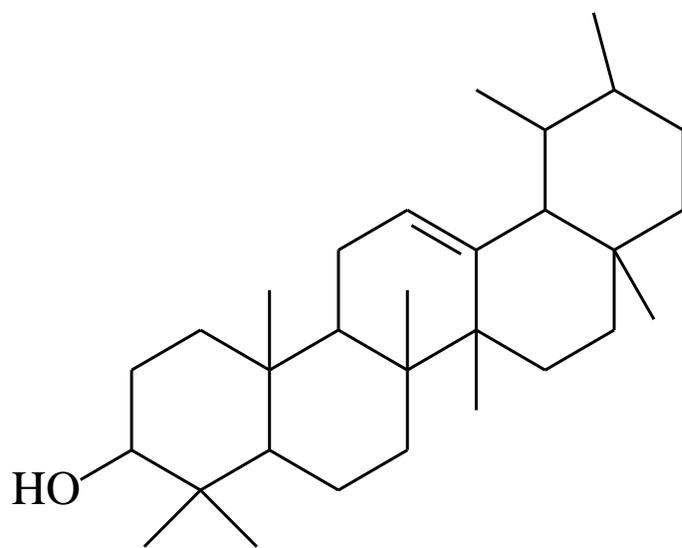
Es importante mencionar que la espectroscopia UV-vis, no solo ayuda al reconocimiento de compuestos naturales con ciertos grupos cromóforos, también es una técnica útil en el proceso de aislamiento, identificación y cuantificación de estas sustancias. Por ejemplo, permite reconocer los compuestos con grupos cromóforos en las placas de cromatografía, y en los sistemas HPLC con detectores bien sea de longitud de onda fija, de onda variable o la opción más moderna que es el detector de arreglo de diodos (sigla inglesa DAD). Finalmente, vale mencionar que es una técnica no destructiva, por lo cual la muestra analizada puede utilizarse para otros procesos analíticos o experimentales.



Estigmaterol



Mentol



Amirina

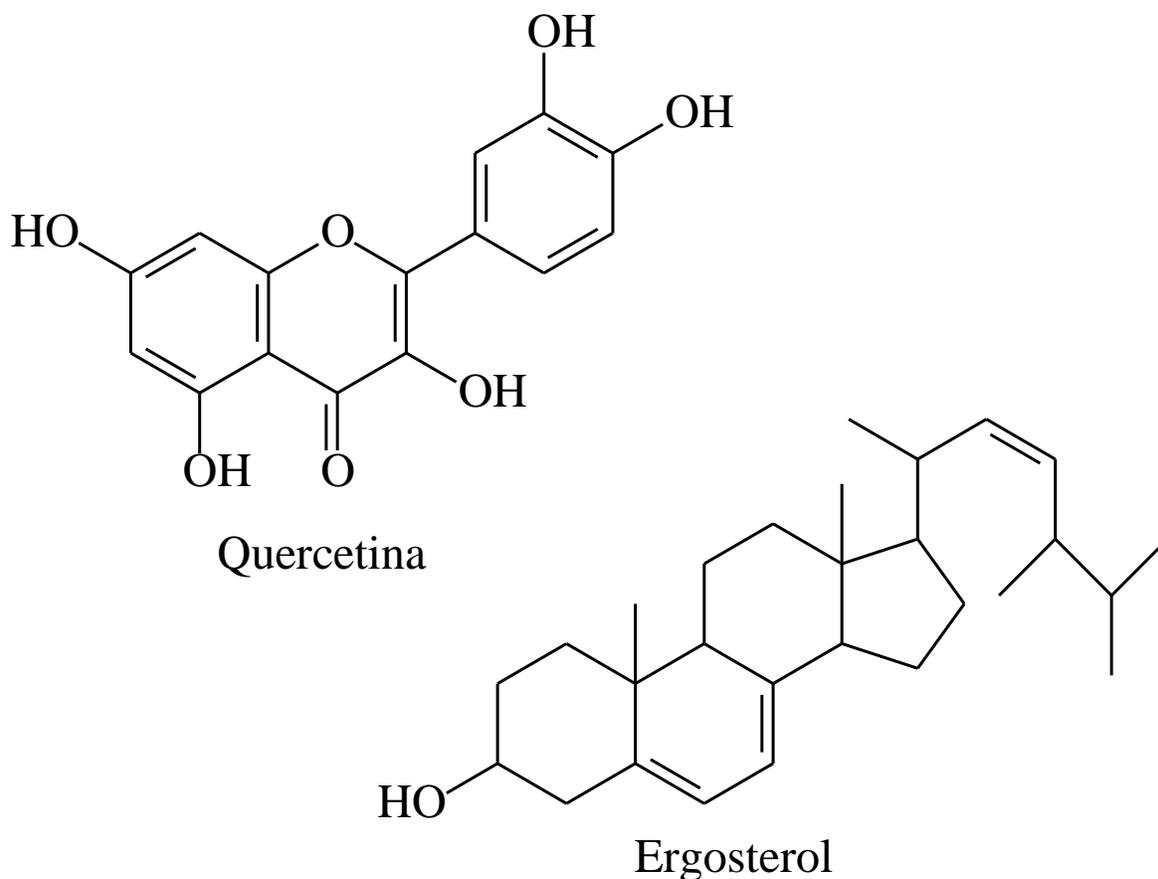


Figura 1.2. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios con y sin grupos cromóforos.

Espectroscopia infrarroja (IR)

La espectroscopia infrarroja, es una técnica instrumental analítica muy útil para el reconocimiento de los grupos funcionales y algunas características estructurales de los metabolitos secundarios. Como la espectroscopia UV-vis, no es destructiva, y las muestras pueden recuperarse y utilizarse para otros propósitos experimentales.

Aunque por sí sola, es una técnica que no permite la identificación completa (caracterización) de una sustancia, sí es muy útil para ayudar en la caracterización no solo de metabolitos conocidos, sino de otros nuevos. Para esto es una técnica complementaria junto a técnicas instrumentales de caracterización como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Es relativamente fácil reconocer a simple vista observando el espectro infrarrojo, cuando se tienen sustancias con y sin anillos aromáticos, en este último caso como son la mayoría de terpenoides. El espectro IR de sustancias con anillos aromáticos, muestra una mayor cantidad de bandas definidas, debido a los tonos y sobre tonos de las bandas de vibración de dichos compuestos. Comparativamente, los espectros IR de moléculas no aromáticas, muestran menos bandas de absorción, y generalmente son anchas y menos definidas.

Al observar el espectro infrarrojo de la 2-metilanttraquinona (compuesto con dos anillos aromáticos); en la base de datos del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada de Japón <https://sdfs.db.aist.go.jp>; pueden verse bandas de absorción muy definidas y agudas, mientras que el espectro de un compuesto sin anillos aromáticos y sin grupos cromóforos como el esteroide colesterol muestra menos bandas y estas son más anchas. El espectro infrarrojo del colesterol también está disponible en la base de datos mencionada.

Aunque el uso de otras técnicas espectroscópicas como la espectroscopia UV combinada con HPLC, es de amplio uso para el análisis de muestras biológicas, también se encuentran aplicaciones de la técnica de infrarrojo para el análisis de matrices vegetales complejas.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es la técnica más útil en la caracterización química de una sustancia natural orgánica. En el caso de los productos naturales, el uso de los experimentos unidimensionales con protones y carbonos ha permitido durante varias décadas, la dilucidación estructural de muchos de ellos. El acceso más reciente a técnicas RMN de alta resolución, y a diferentes experimentos bidimensionales homonucleares y heteronucleares, ha permitido no solo avanzar en la caracterización de sustancias naturales no conocidas, sino en resolver la asignación estructural completa de otras conocidas previamente. Además, la disponibilidad de mejores simuladores RMN comerciales, permite actualmente la predicción y confirmación estructural de los compuestos orgánicos en general.

Para propósitos ilustrativos a continuación se hace la predicción y el análisis RMN de una sustancia con anillos aromáticos como es la 2-metilanttraquinona. No se considerarán los solventes para simplificar la explicación.

La figura 1.3 muestra la estructura y enumeración de la 2-metilanttraquinona. En RMN-¹H, los protones aromáticos resuenan y sus señales se observan aprox. entre 6 y 8 ppm, dependiendo de los grupos vecinos. Las constantes de acoplamiento de los protones aromáticos generalmente oscilan entre 2-3 Hz para los protones acoplados en disposición *meta* entre sí; y entre 8 y 9 Hz, para los protones en disposición *orto* entre sí. Tomando esto en cuenta se puede predecir que el H-1 debe ser un doblete con constante de acoplamiento *meta*, debido a su acoplamiento con el H-3. Por simplicidad de ahora en adelante lo denominaremos doblete-*meta* (d_m). Aunque el protón H-1, acopla con el protón H-4, en posición relativa *para*, la constante de acoplamiento *para* es muy pequeña, cercana a cero, y en la práctica generalmente no se observa.

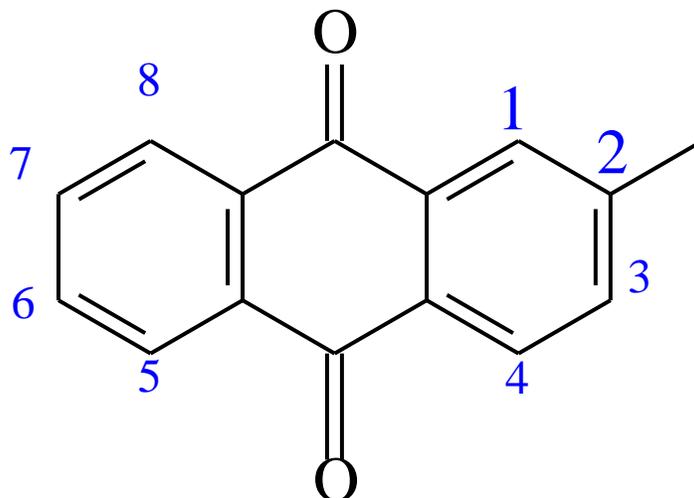


Figura 1.3. Estructura y enumeración de la molécula de 2-metilantraquinona.

Continuando con la predicción para los otros protones aromáticos, el H-3 debe originar una señal doble doblete, con constantes de acoplamiento *orto* y *meta*; debido a que el H-3 acopla con el H-4 en *orto*, y con el H-1 en *meta*. Es decir, en resumen es un doble doblete-*orto,meta* ($dd_{o,m}$).

El protón H-4 debe originar un doblete *orto*, debido a su acoplamiento con el protón H-3. Es decir, debe ser un doblete-*orto* (d_o).

El protón H-5 debe ser un $dd_{o,m}$, igual que su similar H-8. Los protones H-6 y H-7, deben ser dobles triplete *orto-meta*, debido a que por ejemplo el H-6 acopla en *orto* con los protones H-5 y H-7, lo que genera un triplete-*orto*. Un análisis similar permite predecir que el H-7 es muy similar al H-6, y ambos deben generar señales $dt_{o,m}$. En resumen, podemos predecir para la 2-metilantraquinona, los datos calculados presentado en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de desplazamiento y multiplicidades predichas para la 2-metilantraquinona por simple observación de la estructura química.

Protón(es)	Desplazamiento químico (ppm)	Multiplicidad y constantes de acoplamiento
H-1	6-8	Doblete $J=2-3$ Hz (d_m)
H-3	6-8	Doble doblete $J=2-3$ y $8-9$ Hz ($dd_{o,m}$)
H-4	6-8	Doblete $J=8-9$ Hz (d_o)
H-5 y H-8	6-8	Doble doblete $J=2-3$ y $8-9$ Hz ($dd_{o,m}$)
H-6 y H-7	6-8	Doble triplete $J=2-3$ y $8-9$ Hz ($dt_{o,m}$)

Una vez hecha la predicción anterior, vamos a revisar lo que se predijo, frente a espectros simulados disponibles en línea y en software comercial (20, 21).

Al obtener el espectro simulado en línea (Figuras 1.4 y 1.5), utilizando el predictor en línea, se obtienen los valores mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de desplazamiento y multiplicidades predichas para la 2-metilantraquinona junto a los valores calculados con el software en línea www.nmrdb.org

Protón(es)	Desplazamiento químico (ppm)	Desplazamiento Calc. Software en línea	Multiplicidad y constantes de acoplamiento	Multiplicidad y constantes de acoplamiento calc. Con software en línea
H-1	6-8	7.99	doblete J=2-3 Hz (d_m)	ddm, J=1.59 Hz
H-3	6-8	7.32	doble doblete J=2-3 y 8-9 Hz ($dd_{o,m}$)	ddo.m, J=7.73, 1.59 Hz
H-4	6-8	7.62	doblete J= 8-9 Hz (d_o)	dd, J= 7.73 Hz
H-5 y H-8	6-8	7.86	doble doblete J= 2-3 y 8-9 Hz ($dd_{o,m}$)	dd, J= 7.77, 1.29 Hz
H-6 y H-7	6-8	7.63	doble triplete J= 2-3 y 8-9 Hz ($d_{to,m}$)	dd, J= 7.77, 1.29 Hz

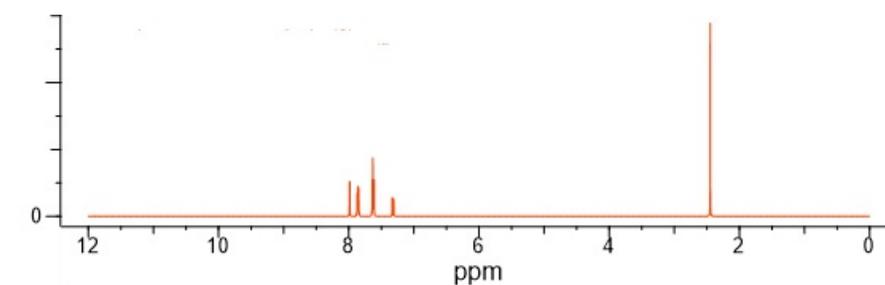


Figura 1.4. Espectro RMN-¹H de la 2-metilantraquinona calculado en línea con la aplicación de www.nmrdb.org

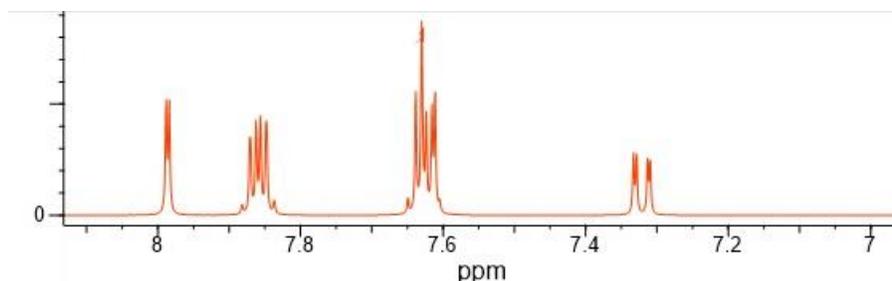


Figura 1.5. Ampliación de la región de protones aromáticos de la 2-metilantraquinona, a partir del espectro simulado en nmrdb.org

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 2, la predicción de los desplazamientos químicos por simple observación se ajusta a lo calculado con el software en línea nmrdb.org, pues todos los valores de desplazamiento calculados están dentro del rango esperado de 6 a 8 ppm.

Cuando se utiliza la versión comercial del software predictor de AcdLabs® versión 11, se obtienen los valores obtenidos se presentan en la tabla 2.3.3.

Tabla 3. Valores de desplazamiento predichos para la 2-metilantraquinona junto a los valores calculados con el software en línea www.nmrdb.org, y el módulo predictor NMR de AcdLabs®

Protón (es)	Desplazamiento químico esperado (ppm)	Desplazamiento Calc. Software en línea (nmrdb.org)	Desplazamiento Calc. ACDLabs NMR-predictor®
H-1	6-8	7.59	8.02
H-3	6-8	7.32	7.54
H-4	6-8	7.62	8.12
H-5 y H-8	6-8	7.86	8.29
H-6 y H-7	6-8	7.63	7.77

Al observar el espectro RMN-¹H de la 2-metilantraquinona en cloroformo deuterado, disponible en la base de datos SDBS <https://sdb.sdb.aist.go.jp>; se pueden apreciar las señales de los protones aromáticos entre 7.5 y 8.5 ppm. Los protones del grupo metilo ligado al carbono-2 se observan como un singlete a 2.5 ppm. El protón 1 se observa como un doblete en 8.05 ppm. El protón 3 se observa como un doblete en 7.56 ppm. El protón 4 se observa como un doblete en 8.15 ppm. Las señales restantes entre 7.7 y 8.3 ppm corresponden a las de los protones 5 y 8. La Tabla 4 resume todos los desplazamientos químicos esperados, calculados y reportados.

Tabla 4. Valores de desplazamiento predichos para la 2-metilantraquinona junto a los valores calculados con el software en línea www.nmrdb.org, el módulo predictor NMR de ACDLabs® y los reportados en la base de datos de la SDBS.

Protón (es)	Desplazamiento químico esperado (ppm)	Desplazamiento Calc. Software en línea (nmrdb.org) (ppm)	Desplazamiento Calc. ACDLabs NMR-predictor® (ppm)	Desplazamiento químico reportado en la base de datos SDBS Japón (ppm)
H-1	6-8	7.59	8.02	8.05
H-3	6-8	7.32	7.54	7.56
H-4	6-8	7.62	8.12	8.15
H-5 y H-8	6-8	7.86	8.29	8.25-8.27
H-6 y H-7	6-8	7.63	7.77	7.76

De acuerdo con la tabla 4, las diferencias entre los valores de desplazamiento calculados y los reportados, oscilan entre 0 y 0.5 ppm aproximadamente, demostrando así la utilidad de los programas de computador disponibles, para complementar el análisis estructural de las sustancias, como la 2-metilantraquinona.

Al realizar la misma secuencia, para el caso del espectro RMN-¹³C, de la misma 2-metilantraquinona, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de desplazamiento predichos para la 2-metilantraquinona junto a los valores calculados con el software en línea www.nmrdb.org, el módulo predictor NMR de AcDLabs® y los reportados en la base de datos de la SDBS.

Carbono (es)	Desplazamiento químico esperado (ppm)	Desplazamiento Calc. Software en línea (nmrdb.org) (ppm)	Desplazamiento Calc. ACDLabs NMR-predictor® (ppm)	Desplazamiento químico reportado en la base de datos SDBS Japón (CDCl ₃ , ppm)
C-1	120-140	127.6	126.96	127.43
C-2	120-140	140.0	144.75	145.24
Me-C-2	21.4	20.9	21.38	21.90
C-3	120-140	131.8	133.83	134.90
C-4	120-140	127.2	126.93	127.38
C-5	120-140	126.7	126.30	N.A.
C-6	120-140	132.4	133.10	133.88
C-7	120-140	132.4	134.00	134.00
C-8	120-140	126.7	126.30	127.10
C-9	195	183.3	182.55	182.88
C-10	195	181.3	182.53	183.32
C-1a	120-140	133.4	133.00	133.29
C-4a	120-140	133.2	130.60	131.19
C-8a	120-140	133.0	132.00	133.51
C-5a	120-140	133.0	132.80	133.48

Los valores de desplazamiento químico esperados se refieren a rangos de valores de desplazamiento conocidos para este tipo de carbonos.

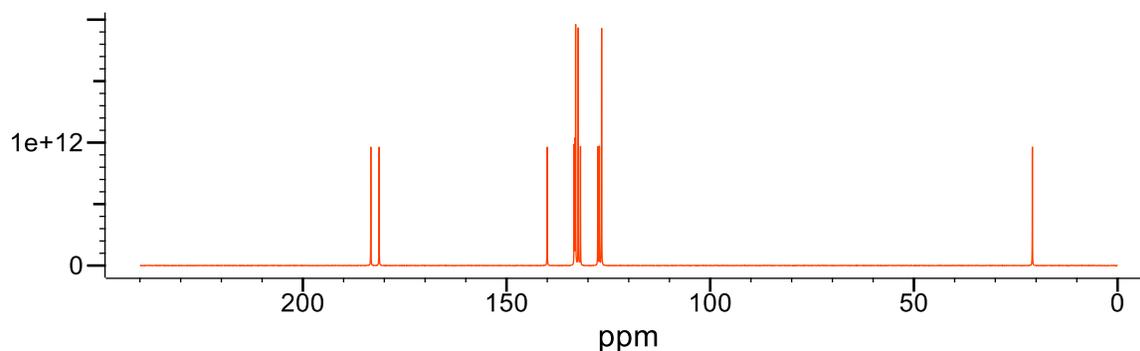


Figura 1.6. Espectro RMN- ^{13}C de la 2-metilantraquinona simulado con la aplicación en línea de NMRdb.org

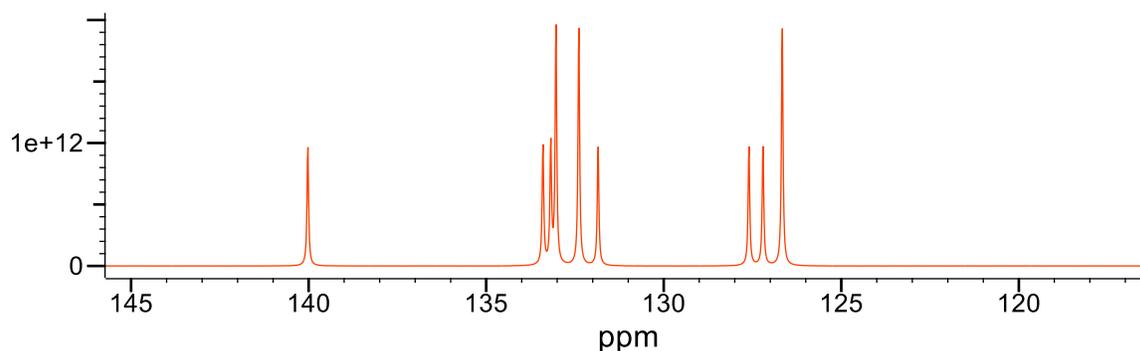


Figura 1.7. Espectro RMN- ^{13}C de la 2-metilantraquinona, región ampliada de señales de carbonos aromáticos.

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla 5, los desplazamientos calculados comparados con los reportados, oscilan entre 0 y 5 ppm aproximadamente, en este caso para la 2-metilantraquinona; demostrando nuevamente la gran utilidad de estas herramientas computacionales.

Es importante tener en cuenta que además la RMN- ^{13}C , permite determinar el número de protones ligados a cada carbono, mediante el experimento denominado RMN- ^{13}C parcialmente desacoplado, en el cual se pueden observar en lugar de las solas señales singlete, las señales cuartete (q) para carbonos metílicos, triplete para carbonos metilénicos, doblete para carbonos metínicos y singlete para carbonos sin protones ligados. Otro experimento muy útil es el DEPT (de la sigla inglesa: Distortionless Enhancement through Polarization Transfer), el cual permite observar en el espectro RMN- ^{13}C , las señales de los carbonos metílicos y metínicos se observan como señales positivas, las de los carbonos metilénicos se observan como señales negativas, y no se observan las señales de carbonos sin protones ligados.

Actualmente, además de los experimentos RMN unidimensionales, se usan ampliamente los experimentos de RMN-2D. Entre los experimentos más usados para los metabolitos

secundarios, están los experimentos COSY (del inglés Correlation Spectroscopy), HMQC (sigla inglesa para Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) y HMBC (sigla inglesa de Heteronuclear Multiple Bond Correlation). El experimento COSY, básicamente muestra un espectro bidimensional con señales de correlación entre protones vecinos (a 3 enlaces). El espectro HSQC muestra señales de correlación entre señales de protones y carbonos directamente ligados. El experimento HMBC muestra al igual que el experimento HSQC, las correlaciones entre señales de carbonos y protones directamente unidos, pero adicionalmente muestra señales de correlación heteronucleares a 2 y 3 enlaces.

Para entender de una manera sencilla estos espectros, vamos a predecirlos a partir de una molécula sencilla como es el 1-propanol.

Para predecir el espectro COSY, se requiere del espectro unidimensional RMN protónico del 1-propanol. Este puede consultarse en la base de datos National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, disponible en la página web: <http://sdfs.db.aist.go.jp>, y muestra cuatro señales definidas: δ 0.94 (s, 3H, H-1), 1.57 (sextete, 2H, H-2), 2.26 (s, H hidroxilo), y 3.582 (t, 2H, H-3).

La figura 1.8 muestra un dibujo del espectro COSY esperado para el 1-propanol. Se pueden observar manchas de correlación (picos cruzados) entre las señales de los protones de C-1 y la de los protones de C-2, por ser vecinos. No se observan manchas de correlación entre las señales de los protones de C-1 y C-3, porque estos no son protones vecinos. Finalmente, se observa correlación entre las señales de protones de C-2 y C-3, por ser vecinos. Por este comportamiento diferentes autores se refieren a COSY como un experimento que determina la **vecindad de protones** en una molécula.

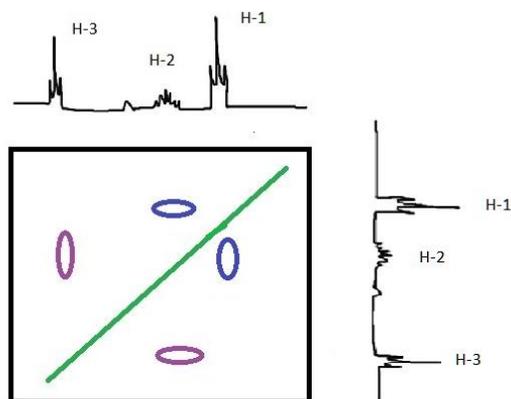


Figura 1.8. Espectro COSY esperado para la molécula de 1-propanol. Se observa la diagonal de color verde, y señales de correlación en colores azul (protones vecinos H-2 y H-3) y violeta (protones vecinos H-1 y H-2) para facilitar su interpretación relativa a la vecindad de protones.

La figura 1.9 muestra el espectro COSY calculado con el software disponible en-línea en el sitio www.nmrdb.org. Se observan señales de correlación entre el triplete de los protones del C-1 (0.9 ppm), y el multiplete de los protones del C-2 (1.7 ppm); y además muestra señales de correlación entre el multiplete de los protones del C-2 (1.7 ppm), y el triplete de los protones del C-3 (3.3 ppm). La figura 1.10 muestra con flechas dobles los protones vecinales.

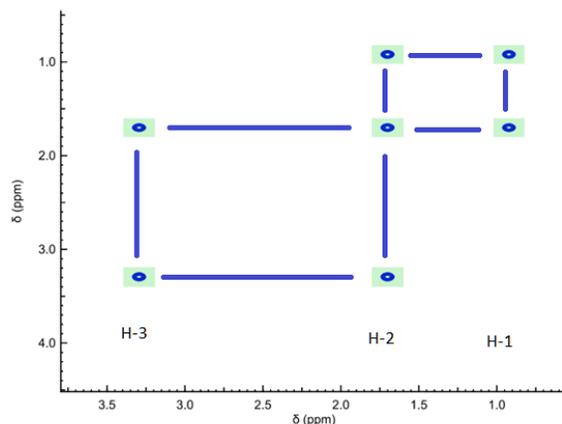


Figura 1.9. espectro COSY H-H de 1-propanol calculado con el software en línea nmrdb.org. Las líneas azules fueron añadidas para visualizar la vecindad o correlación entre los protones.

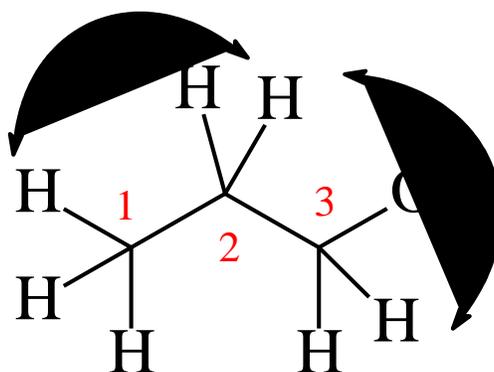


Figura 1.10. Esquema de las correlaciones entre protones vecinos del 1-propanol.

Otro experimento de RMN-¹³C, es el espectro HSQC. La figura 1.11, muestra un modelo simplificado del espectro HSQC esperado para el 1-propanol.

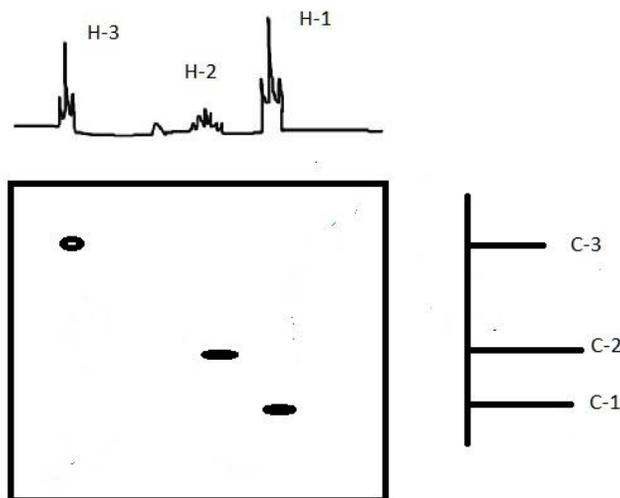


Figura 1.11. Espectro 2D HSQC esperado para el 1-propanol.

El espectro HSQC, muestra señales de correlación entre los **carbonos y protones directamente ligados**, es decir que permite asignar cada señal de protones con cada señal del espectro de RMN- ^{13}C . Normalmente se dice que permite observar señales de correlación hetero nuclear a la distancia de 1 enlace (^1J).

Es muy importante tener en cuenta que las técnicas RMN no solo son útiles para los procesos de caracterización química de los metabolitos secundarios, sino también para su cuantificación. Un ejemplo de esto es la cuantificación de L-dopa, una sustancia utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esta sustancia es abundante en las semillas de *Mucuna pruriens*.

Actualmente, con el uso de técnicas combinadas es posible el análisis rápido de extractos vegetales, como por ejemplo las técnicas utilizadas para el reconocimiento de 131 metabolitos de un extracto de *Polygonum multiflorum*, los cuales incluyeron ácidos fenólicos, estilbenos, flavonas, antraquinonas, naftalenos y derivados. Los autores utilizaron las técnicas combinadas UHPLC y Espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MS-TOF), y UHPLC con Espectrometría de masas tándem (MS/MS). Para propósitos preparativos la combinación de técnicas como la cromatografía en contracorriente (CCC) combinada con la RMN- ^{13}C , también muestra resultados muy interesantes.

Espectrometría de masas

Las técnicas espectrométricas como la RMN, sin duda constituyen unas de las herramientas más valiosas en la identificación y caracterización química de los metabolitos secundarios; pero son muy bien complementadas con técnicas como las de espectrometría de masas, las cuales además de informar sobre pesos moleculares, informan en muchos casos aspectos

estructurales muy importantes. Un ejemplo de esto último es el uso de los espectros de masas de alta resolución y los espectros de masas tándem ms/ms, que combinados con bases de datos como Reaxys®, Chemspider® y otras, permiten la asignación estructural de productos naturales.

Para el caso de los metabolitos no glicósidos, comúnmente denominados agliconas o formas libres, la espectrometría de masas clásica, como se llama a la espectrometría de masas basada en el efecto del impacto de electrones sobre la sustancia de interés, es una herramienta muy valiosa, pues se conocen los mecanismos de fragmentación de muchas sustancias, y se cuenta con bases de datos digitales con los espectros de muchas sustancias naturales.

Pero en el caso de los metabolitos glicosilados, estos compuestos no son estables desde el punto de vista térmico, y por tanto no pueden analizarse con la espectrometría de masas clásica. Esto debido a que esta técnica requiere que la sustancia o las sustancias a analizar, se puedan vaporizar sin descomponerse. Para estos compuestos entonces se requiere de técnicas de ionización más suaves, las cuales generan espectros de masas relativamente más simples, pero con información del peso molecular a través de los iones pseudomoleculares (también denominados iones cuasimoleculares) que se forman por la unión del ion molecular con iones como el Na⁺ el K⁺, el H⁺; los cuales se utilizan (en forma de sales) en los procesos de ionización para generar los espectros de masas.

El desarrollo de dispositivos que acoplan la separación cromatográfica por HPLC ó ultra-HPLC (uHPLC), con detectores de masas, ha permitido un desarrollo notable en los procesos de análisis y control de calidad de metabolitos, inclusive actualmente se están ofreciendo a nivel comercial detectores de masas de bajo costo, lo que beneficia a los laboratorios que trabajan con productos naturales. Aquí es importante destacar el amplio uso de las técnicas que combinan la separación con la identificación de los componentes de una mezcla, conocidas en inglés como *Hyphenation Techniques*, y muy especialmente la combinación de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas (sigla inglesa *LC-MS*). Estas técnicas se han desarrollado notablemente en los últimos años, y son útiles para la separación e identificación de los metabolitos secundarios de diferentes polaridades. Las interfases entre la columna cromatográfica y los detectores o analizadores de masas usan fundamentalmente dos procesos de ionización conocidos con las siglas inglesas ESI (*ElectroSpray Ionization*) que corresponde a Ionización por Electro-Aspersión; y a APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), que corresponde en español a Ionización Química a Presión Atmosférica. En los sistemas que usan ESI, la interfase incluye un sistema de electrodos que genera un campo eléctrico muy fuerte que vaporiza la fase móvil. En sistemas con APCI en lugar de electricidad, se utiliza calor para vaporizar la fase móvil.

Las interfases ESI permiten la obtención y análisis de espectros de masas en modos positivo y negativo. El modo positivo es recomendado para metabolitos de carácter alcalino, y por el contrario para los metabolitos de carácter ácido se recomienda el modo negativo.

En general las interfases APCI son más efectivas para el análisis de moléculas de rangos de masa cercanos a 2000 Da, y especialmente para aquellas de menor polaridad, mientras que ESI presenta ventajas como el análisis de moléculas de más alto peso molecular.

En cuanto a los analizadores de masas, se cuenta con analizadores de cuadrupolo, de trampa de iones, y de tiempo de vuelo.

Los analizadores de cuadrupolo, permiten obtener y seleccionar iones (sigla inglesa *SIM*, *Selective Ion Monitoring*), lo cual los hace ventajosos para procesos de identificación y cuantificación. Los de triple cuadrupolo (sigla inglesa *QQQ*), son los más recientemente desarrollados.

Los analizadores de trampa de iones permiten atrapar ciertos iones y someterlos a una fragmentación posterior, permitiendo obtener un nuevo espectro de masas, lo que lleva a la técnica denominada espectrometría de masas tándem, conocida por la sigla inglesa *MS/MS*. Los espectros así obtenidos proporcionan mayor información de los procesos de fragmentación, lo que es muy útil para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios, además que presentan la ventaja de utilizar los mecanismos de formación de iones de la espectrometría de masas clásica, que usa impacto de electrones.

El analizador de masas de tiempo de vuelo (sigla inglesa *ToF*), prácticamente no tiene limitaciones en cuanto al rango de masas de las sustancias a analizar, y es muy útil para sustancias de alto peso molecular como las proteínas.

Aquí es importante mencionar que se vienen desarrollando técnicas alternativas, que permitirían el uso de las bases de datos de espectros de masas de impacto electrónico disponibles, como es el caso de la técnica cromatografía líquida-espectrometría de masas con haces moleculares supersónicos (sigla inglesa: *EI-LC-MS with SMB*), y la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas de impacto electrónico en frío (sigla inglesa: *GC-MS with Cold EI*). También es importante mencionar el uso cada vez más extendido de las redes de datos moleculares como por ejemplo la red social global de productos Naturales (*Global Natural Products Social Molecular Network, GNPS*), que combinada con otras herramientas disponibles en línea como *LipidsXplorer*, permite la desreplicación, identificación y caracterización estructural de diferentes productos naturales como lípidos y alcaloides esteroideos.

La combinación de las técnicas de RMN y espectrometría de masas, junto con el uso de las bases de datos, facilita mucho el análisis de los metabolitos ya conocidos, así como ayuda en el hallazgo de otros nuevos. En la literatura científica se encuentran reportes de usos de esta

técnica combinada para el análisis de diferentes metabolitos como iridoides, lignanos, flavonoides, alcaloides, otros terpenoides. Además, esta técnica permite a través de los espectros RMN 1D y 2D, determinar aspectos importantes como la estereoquímica.

Técnicas generales de cuantificación de metabolitos secundarios

El desarrollo de las técnicas de análisis químico instrumental permite además de los análisis cualitativos de los metabolitos secundarios, su cuantificación, esto teniendo en cuenta que muchos de estos compuestos naturales, se encuentran en sus fuentes biológicas en concentraciones muy bajas, generalmente de menos del 0.1%.

Entre las técnicas de análisis cuantitativo, indudablemente la cromatografía HPLC y sus diferentes variantes como UPLC, permiten en tiempos muy cortos no solo la separación, identificación de metabolitos secundarios en muestras naturales, sino también su cuantificación. Con esta técnica, y si se cuenta con una sustancia de referencia (también denominada marcador), el proceso se reduce a la elaboración de una curva de calibración (curva de absorbancia vs. concentración), con la sustancia a cuantificar. Las áreas de los picos se miden para hacer una correlación entre dichas áreas y la concentración del marcador. Luego se analiza la muestra y por interpolación del área del pico de interés, se determina la concentración en la muestra. La sensibilidad de este método es determinada por el tipo de sustancia y por el detector, por ejemplo, las sustancias que absorben luz ultravioleta; como es el caso de muchos compuestos con anillos aromáticos y sistemas insaturados conjugados, se pueden cuantificar con detectores sencillos como el detector UV de longitud de onda fija. En cambio, las sustancias que no contienen grupos cromóforos, y que no absorben en la región ultravioleta del espectro electromagnético, como es el caso de muchos terpenoides y derivados de ácidos grasos, requieren su derivatización química o el uso de detectores universales como un refractómetro diferencial ó un detector ELSD, que son menos sensibles que los detectores ultravioleta. Un ejemplo del uso de HPLC con estos tipos de detectores es el reportado para la cuantificación de flavonoides y pinitol en la droga ayurvédica *Saraca asoca*. Es interesante anotar que muchas sustancias sin grupos cromóforos, como esteroides pueden detectarse en longitudes de onda como 210 nm, es decir cerca al límite del rango de detección. Además del método de la curva de calibración, pueden utilizarse otras variantes como el estándar interno, de acuerdo a cada necesidad de análisis cuantitativo en particular.

Otras técnicas espectrofotométricas que se usan para cuantificar metabolitos secundarios de manera aproximada incluyen la espectroscopía ultravioleta-visible. Este es el caso de compuestos fenólicos, los cuales se pueden cuantificar mediante espectroscopia uv-visible, debido a que forman complejos de color azul con sales complejas de metales pesados como el reactivo de Folin-Ciocalteu. Estos compuestos se pueden cuantificar a longitudes de onda como 765 y 790 nm. La figura 1.12 muestra el esquema general de la reacción, que explica

la formación de los compuestos de color azul. Como estándar de referencia se utiliza el ácido gálico, y los valores calculados se expresan en términos de dicho compuesto.

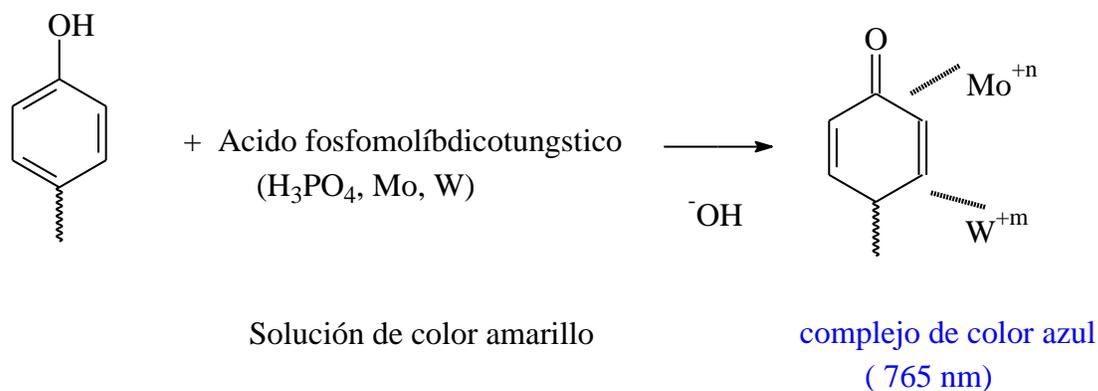


Figura 1.12. Reacción general de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin.

Para el caso del grupo de compuestos denominados flavonoides, se utiliza el cloruro de aluminio, del cual se conoce su afinidad por compuestos que tienen el anillo pirona. Aunque no todos los flavonoides contienen el anillo pirona, los más distribuidos naturalmente como las flavonas y flavonoles, sí lo contienen, y forman complejos que absorben luz visible a 510 nm. Como estándar de referencia se utiliza el flavonoide quercetina.

El desarrollo de métodos quimiométricos, permite la cuantificación simultánea de varios compuestos en una muestra, utilizando equipos fácilmente disponibles en los laboratorios de control de calidad. Un ejemplo de esto es la cuantificación simultánea de quercetina, miricetina y kaempferol, tres flavonoides de interés farmacéutico, mediante el método de ondícula continua (en inglés: Continuous Wavelet Transform CWT).

Finalmente, es importante tener en cuenta, que los avances y desarrollo de las técnicas instrumentales como la resonancia magnética nuclear, permiten actualmente no solo el análisis de mezclas complejas de metabolitos, usadas con otras técnicas como la espectrometría de masas y las técnicas cromatográficas instrumentales. Estas técnicas han dado lugar a un área de investigación como es la metabolómica, la cual redundará en procesos y tiempos de análisis más rápidos, más eficientes y menos contaminantes para el medio ambiente. Sin embargo, el uso de técnicas clásicas de análisis como la cromatografía de capa fina de alta resolución (sigla inglesa HPTLC), por ejemplo utilizando como fase móvil la mezcla acetato de etilo–etilmetilcetona– ácido fórmico 98%–agua (50:30:10:10), con reveladores comunes como son el reactivo de Liebermann-Burchard y el reactivo de anisaldehído/ácido sulfúrico; todavía es útil en laboratorios de control de calidad para el reconocimiento de drogas vegetales, donde no se disponga de las técnicas instrumentales.

Análisis fitoquímico preliminar

Aunque las técnicas de análisis instrumentales modernas han desplazado casi definitivamente el uso de las técnicas clásicas o convencionales utilizadas para la identificación de los metabolitos secundarios, para muchos propósitos se utilizan todavía los análisis fitoquímicos preliminares, también conocidos como marchas fitoquímicas. Estos procedimientos analíticos se han usado durante muchos años, para tratar de identificar en un solo proceso experimental y de manera preliminar en muestras vegetales, la presencia o no de diferentes metabolitos de interés farmacéutico como los alcaloides, los esteroides, los compuestos fenólicos, los flavonoides, las quinonas, etc. Los más usados utilizan una secuencia de procedimientos experimentales relativamente simples, que incluyen técnicas como los ensayos de coloración con diferentes reactivos químicos, los cuales permiten el reconocimiento preliminar de diferentes sustancias naturales, y se fundamentan en las propiedades ácido-base, la solubilidad y la polaridad de las clases principales de compuestos. A continuación, se describen algunos de estos ensayos, y al final se presenta una propuesta de marcha fitoquímica simplificada, que toma en cuenta mucho de lo presentado sobre la polaridad y solubilidad de los diferentes metabolitos secundarios.

Ensayos de reconocimiento de alcaloides

Los alcaloides propiamente dichos, son de carácter alcalino, y pueden formar sales con ácidos diluidos. Estas sales de alcaloides son solubles en medio acuoso ácido, pero cuando reaccionan con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados. Los ensayos químicos usados para el reconocimiento incluyen varios ensayos de precipitación, con diferentes reactivos como son el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Mayer, el reactivo de Valser, el reactivo Reineckato de amonio, el reactivo de Wagner, entre otros. Teniendo en cuenta la toxicidad de muchos de estos reactivos, que utilizan sales de metales pesados como el mercurio, es recomendable el uso del reactivo de Wagner.

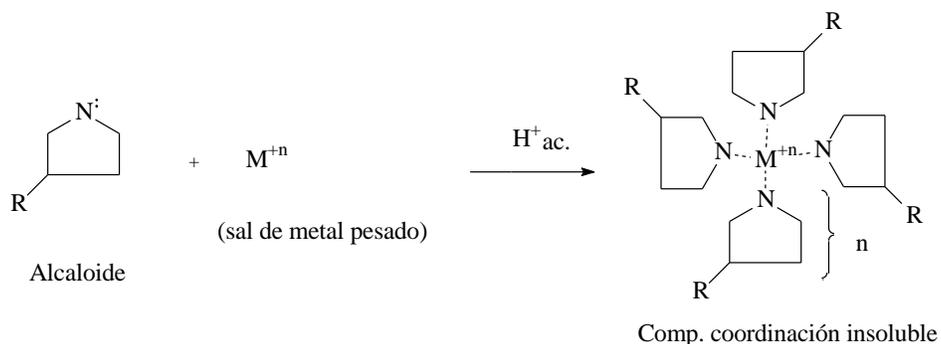


Figura 1.13. Reacción química que explica la formación de complejos insolubles entre un alcaloide y una sal de metal pesado.

Ensayos de reconocimiento para compuestos fenólicos

Debido a la gran cantidad y variedad estructural de las diferentes clases de compuestos fenólicos naturales, se utilizan diferentes ensayos de coloración para su reconocimiento preliminar en muestras biológicas. El ensayo más utilizado es el del cloruro férrico. En este ensayo una solución acuosa o alcohólica de una muestra vegetal, se hace reaccionar con una solución de cloruro férrico acuoso o alcohólico, en concentración del 1%. Los compuestos fenólicos tienden a formar complejos de diferentes colores con el catión Fe^{+3} , la formación de color o precipitados oscuros es aceptada como un resultado positivo sobre la presencia de compuestos fenólicos. No obstante, hay compuestos fenólicos de baja polaridad que no dan resultado positivo con este ensayo, por lo que se requiere otro tipo de análisis diferente.

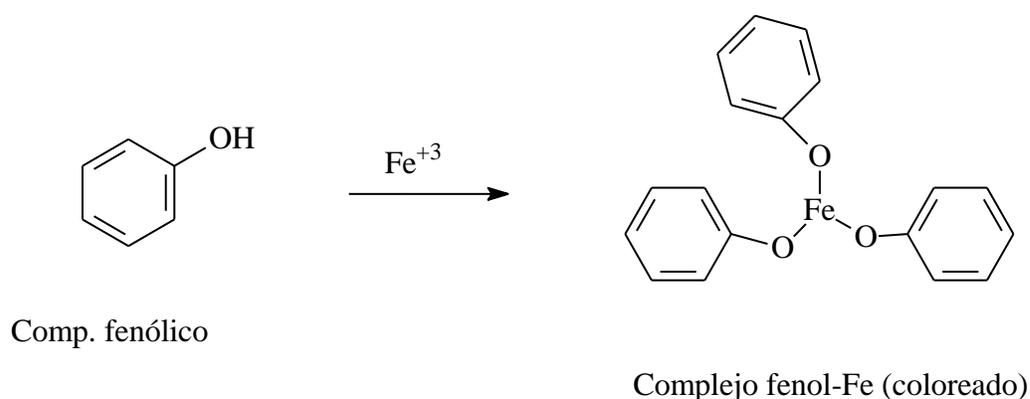
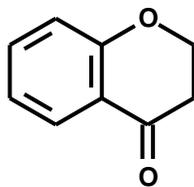


Figura 1.14. Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.

Ensayo de reconocimiento de flavonoides

Dentro de la gran cantidad de compuestos fenólicos, los flavonoides representan un grupo importante de sustancias con propiedades antioxidantes. Los flavonoides que contienen en su estructura un sistema anular γ -benzopirona (también denominado croman-4-ona), reaccionan con iones Mg^{+2} y ácido, para formar complejos coloreados de color rojo o violeta. Por tanto, la formación de coloraciones rojo o violeta, es considerada un resultado positivo que permite inferir la presencia de flavonoides en la muestra analizada. A este ensayo se le conoce como ensayo de Shinoda, entre otros. Es importante mencionar que algunas clases de flavonoides como las chalconas y las catequinas, no dan resultado positivo con este ensayo.



Sistema benzopirona

Adicionalmente, los compuestos fenólicos se pueden observar fácilmente en los análisis por cromatografía en capa fina, pues bajo la luz ultravioleta de 254 nm, presentan absorción de dicha radiación, lo que permite visualizarlos fácilmente y detectarlos en las muestras biológicas.

Ensayos de reconocimiento para terpenoides

Los terpenoides comprenden una gran cantidad de sustancias naturales con estructuras desde las más simples (monoterpenos y sesquiterpenos) hasta otras de gran complejidad estructural (esteroides, triterpenoides, etc.). La mayoría de estas sustancias contienen grupos funcionales tales como enlaces dobles carbono-carbono, hidroxilos alcohólicos, puentes de éter, grupos carboxilos, grupos éster. Con la excepción del carboxilo, los demás grupos funcionales son relativamente poco reactivos para detectarlos mediante ensayos químicos rápidos y confiables. Además, generalmente no poseen grupos cromóforos, que permitan detectarlos con luz ultravioleta de 254 nm. Sin embargo, se pueden reconocer cuando las muestras se extraen con solventes de mediana o baja polaridad (en el caso de las agliconas), al analizarlos por cromatografía en capa fina, revelando las placas cromatográficas con varios reactivos que contienen ácido sulfúrico y calentamiento. El ácido sulfúrico reacciona con muchos terpenoides produciendo manchas coloreadas de color pardo, rojo o violeta.

Los terpenoides que contienen en su estructura enlaces dobles carbono-carbono conjugados, se pueden reconocer mediante el ensayo de Liebermann-Burchard. En este ensayo, a una solución anhidra obtenida de la muestra vegetal, se le agrega en su orden anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se considera positiva, si se forman coloraciones verdes, azules, rojas, violetas, entre otras. Algunos terpenoides como el colesterol que no poseen en su estructura estos enlaces dobles conjugados dan resultado positivo debido a que pueden formar estos dienos conjugados durante la reacción, por deshidratación.

Los terpenoides que contienen en su estructura sistemas cíclicos tipo lactona α,β -insaturada, producen coloraciones violáceas con varios reactivos nitroaromáticos en medio alcalino. Se utilizan varios reactivos como son el reactivo de Kedde (m-dinitrobenceno), el de Raymond

(ácido m-dinitrobenzoico) y el nitroprusiato de sodio. Producen resultado positivo sustancias tales como terpenlactonas, los cardiotónicos (también denominados cardenólidos) y acetogeninas con anillos lactónicos α,β -insaturados.

Adicionalmente, los terpenoides de bajo peso molecular están presentes en los aceites esenciales de muchas plantas, por lo cual son reconocidos preliminarmente por su aroma agradable, especialmente los monoterpenos y los sesquiterpenos.

Las saponinas terpenoides, tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de sus soluciones acuosas, y se pueden reconocer por la formación de espuma estable, al agitar una solución acuosa de la muestra, aunque algunas proteínas de bajo peso molecular también pueden producir un resultado similar.

La figura 1.15. presenta un esquema propuesto de marcha fitoquímica simplificada, que puede ser útil en el análisis preliminar de diferentes metabolitos secundarios y que ayuda a inferir su presencia en muestras biológicas. La muestra seca y molida se extrae inicialmente con un solvente de baja polaridad como es el acetato de etilo (abreviado: AcOEt), con el cual se extraen metabolitos de baja polaridad como son muchas agliconas o formas libres de diferentes clases de metabolitos. Luego el residuo se extrae con etanol (abreviado: EtOH), para extraer metabolitos secundarios de mayor polaridad, y finalmente se extrae con agua, en el cual son solubles compuestos tales como diferentes clases de glicósidos y sustancias como polisacáridos. Los alcaloides se extraen a partir de una muestra separada, realizando una extracción directa con HCl al 5%, teniendo en cuenta que la mayoría de alcaloides forman sales con ácidos diluidos. Con este procedimiento es posible inferir la presencia de metabolitos tales como compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, lactonas, polisacáridos, saponinas, etc.

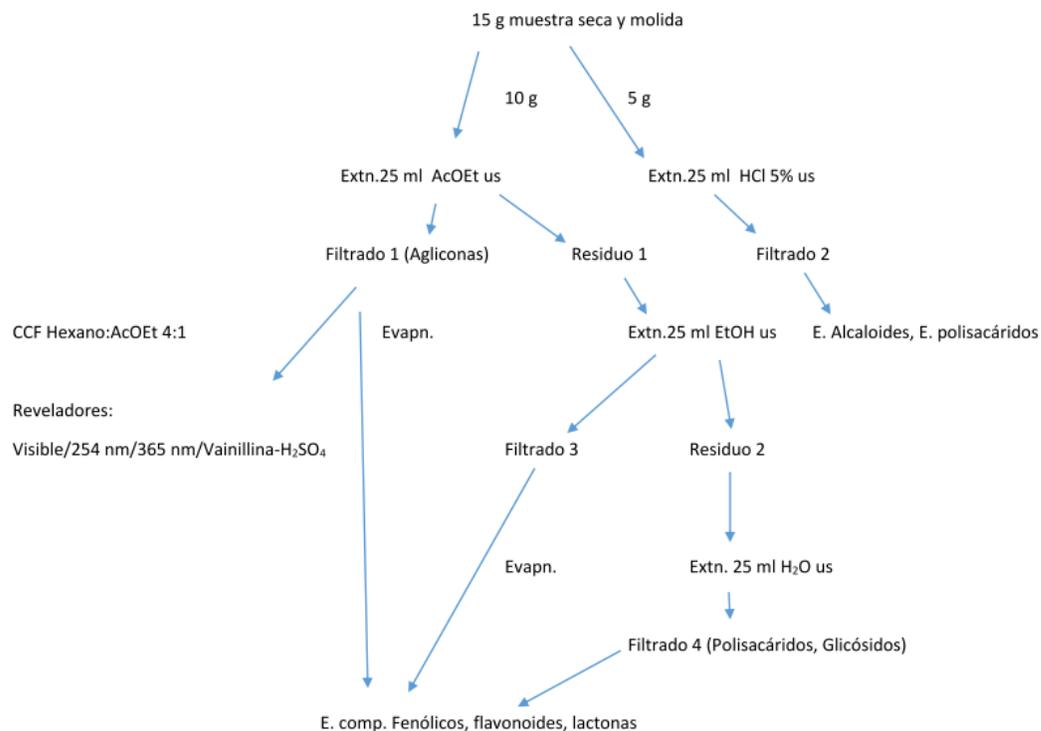


Figura 1.15. Esquema propuesto para una marcha fitoquímica simplificada.

La interpretación de los resultados obtenidos se realiza de la siguiente manera:

En el filtrado 1 concentrado, al analizar primero por CCF se puede observar:

A simple vista manchas amarillas de Rf alto probablemente corresponden a compuestos tales como **carotenoides**. Si hay manchas de color verde pueden deberse a la presencia de **clorofilas**.

A 254 nm se observan **compuestos con anillos aromáticos y otros grupos cromóforos como sistemas dieno conjugados**, en este caso de poca polaridad debido al solvente extractor.

A 365 nm pueden observarse como manchas de fluorescencia rosada las clorofilas, y con fluorescencia azul claro, compuestos como **cumarinas**.

Con el revelador Vainillina-ácido sulfúrico seguido de calentamiento a unos 110°C, se observan manchas de diferentes tonalidades de rojo, violeta, azul, pardo, características de muchos compuestos **terpenoides** en general. Con el revelador ácido sulfúrico y calentamiento, se observan manchas rojizas para muchos terpenoides.

El resto de extracto se evapora a sequedad, y se redissuelve en 5 ml de etanol. Con esta solución se hacen ensayos para compuestos fenólicos, flavonoides y lactonas de mediana y baja polaridad, especialmente agliconas.

El ensayo con el cloruro férrico diluido produce diversas coloraciones con **compuestos fenólicos**.

El ensayo de Shinoda produce coloraciones hacia el rojo y el violeta con varias clases de **flavonoides**.

El ensayo de lactonas se puede realizar con el reactivo de Kedde. La formación de coloraciones violeta o azul permite inferir que la muestra contiene **compuestos lactónicos**, que incluyen cardenólidos, sesquiterpénlactonas, etc.

En el filtrado 2, se realizan ensayos de precipitación para alcaloides. Se observan precipitados cuando la muestra contiene **alcaloides**, aunque algunos residuos de proteínas y otras sustancias pueden ser falsos positivos. También se puede ensayar el reconocimiento de **polisacáridos** por precipitación con etanol.

En el filtrado 3:

Los metabolitos secundarios que no se solubilizaron en el acetato de etilo, pero que son de mayor polaridad y solubles en etanol, se analizan en este filtrado. El ensayo con el cloruro férrico produce diversas coloraciones con **compuestos fenólicos**.

El ensayo de Shinoda produce coloraciones hacia el rojo y el violeta con varias clases de **flavonoides**.

Luego de realizar la CCF, el extracto se evapora a sequedad, se redissuelve en 5 ml de etanol y se le realizan los ensayos para compuestos fenólicos, flavonoides y compuestos lactónicos.

En el filtrado 4, por su naturaleza de mayor polaridad, es posible detectar compuestos tipo **glicósidos y polisacáridos**. En este caso un resultado positivo con el ensayo del cloruro férrico permite inferir la presencia probable de **compuestos fenólicos glicósidos**. Un resultado positivo para flavonoides permite inferir la presencia de **glicósidos flavonoides**, y un resultado positivo para lactonas, permite inferir la presencia de compuestos que además de contener anillos lactona, son glicósidos. Por otro lado, al agitar fuertemente en un tubo de ensayo, un pequeño volumen del filtrado, si se observa formación de espuma estable, se puede inferir la presencia probable de **saponinas terpenoides**. Los **polisacáridos** se precipitan al agregar al menos un volumen de etanol.

Estas pruebas dan resultados positivos siempre y cuando los metabolitos analizados se encuentren en concentraciones adecuadas en las muestras, ya que, si están en concentraciones muy bajas, se pueden obtener resultados negativos, por esto muchos autores los denominan ensayos o pruebas de inferencia, ya que permiten inferir, pero no

descartar la presencia, o no, de diferentes metabolitos. En algunos casos se pueden también obtener resultados falsos positivos, debido a la complejidad y cantidad de metabolitos presentes en las muestras biológicas. Un ejemplo son las pruebas de precipitación de alcaloides, y la prueba de la espuma para saponinas. En el primer caso, hay muchas sustancias que no son alcaloides pero que también producen precipitados como algunas lactonas. En el caso del ensayo de la espuma, además de las saponinas, las proteínas de bajo peso molecular también pueden formar espuma en la solución acuosa.

Referencias bibliográficas

1. Chemat F, Rombaut N, Sicaire A-G, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017; 34: 540–560.
2. Sang Jun, Sang Jie, Ma Q, Hou X-F, Li C-Q. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. *Food Chem.* 2017; 218: 386–395.
3. Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2016; 92: 37–48.
4. He X, Wang X, Fang J, Chang Y, Ning N, Guo H. *et al.* Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2017; 97: 228–237.
5. Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB. *Natural Products Chemistry. Their Chemistry and Biological Significance.* Longman, 1996, p. 367.
6. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Al-Mahasneh MA, Almajwal A, Gammoh S. *et al.*, A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem.* 2017; 218: 99–106.
7. Klein-Júnior LC, Vander Heyden Y, Henriques AT. Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices. *Trends Anal. Chem.* 2016; 80: 66–82.
8. Liu H, Zhang M, Guo Y, Qiu H. Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacontyl-modified silica sorbent. *Food Chem.* 2016; 204: 56–61.
9. Yang R-F, Geng L-L, Lu H-Q, Fan X-D, Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina* baroni. *Ultrason. Sonochem.* 2017; 34: 571–579.
10. Krishnan RY, Chandran MN, Vadivel V, Rajan K.S. Insights on the influence of microwave irradiation on the extraction of flavonoids from *Terminalia chebula*. *Sep. Purif. Technol.* 2016; 170: 224–233.

11. Wang Y, Gao Y, Ding H, Liu S, Han X, Gui J, Liu D. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.* 2017; 218: 152–158.
12. Bladt S., Rickl V. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* 2nd ed. 1996. 2nd printing Edition, Springer, 2009.
13. Allard P-M, Genta-Jouve G, Wolfender JL. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 36: 40–49.
14. Zuo L, Sun Z, Hub Y, Sun Y, Xue W, Zhou L. *et al.*, Rapid determination of 30 bioactive constituents in XueBijing injection using ultra high-performance liquid chromatography-high resolution hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry coupled with principal component analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 137: 220–228.
15. Mercadante AZ, Rodrigues DB, Petry FC, Barros LR. Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Res. Intern.* 2017; 99: 830-850.
16. Wang GH, Huang XY, Duan WD, Quan KJ, Wang BP, Fan RN, Di DL. Advances in Technology of Countercurrent Chromatography for Separation of Protein and Peptide. *Chin. J. Anal. Chem.* 2016; 44(10): 1600–1608.
17. Choi SJ, Hong YD, Lee B, Park JS, Jeong HW, Kim WG. *et al.*, Separation of Polyphenols and Caffeine from the Acetone Extract of Fermented Tea Leaves (*Camellia sinensis*) Using High-Performance Countercurrent Chromatography. *Molecules* 2015; 20: 13216-13225.
18. Tao L, Lin Z, Chen J, Wu Y, Liu X. Mid-infrared and near-infrared spectroscopy for rapid detection of *Gardeniae* Fructus by a liquid-liquid extraction process. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 145: 1–9.
19. Pretsch E, Buhlmann P, Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*, Springer, 4th. Edition, Berlin, 2009.
20. Simpson JH. *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*, Academic Press, 2008.
21. Wang L, Sang M, Liu E, Banahene PO, Zhang Y, Wang T. *et al.*, Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 140: 45–61.
22. Yang Z, Wu Y, Wu S. A combination strategy for extraction and isolation of multi-component natural products by systematic two-phase solvent extraction-¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition and following conical counter-current chromatography separation: Podophyllotoxins and flavonoids from *Dysosma versipellis* (Hance) as examples. *J. Chromatog. A*, 2016; 1431: 184–196.

23. Kind T, Fiehn O. Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution tandem mass spectrometry. *Phytochem. Lett.* 2017; 21: 313-319.
24. Bu X, Regalado EL, Hamilton SE, Welch CJ. The emergence of low-cost compact mass spectrometry detectors for chromatographic analysis. *Trends Anal. Chem.* 2016; 82: 22-34.
25. Dias HJ, de Melo NI, Miller Crotti AE. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview, *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, Dr Jeevan Prasain (Ed.), 2012 InTech, DOI: 10.5772/32680. Available from: <https://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles/electrospray-ionization-tandem-mass-spectrometry-as-a-tool-for-the-structural-elucidation-and-derepl>
26. Chen KW, Chen F, Wang M. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Natural Products Research, In: *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*, 2nd. Edition, edited by Steven M. Colegate, Russell J. Molyneux, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton USA, 2009, 245-266 pp.
27. Hansen SH, Reubsæet L. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS), En: *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry* First Edition. Steen Honoré Hansen and Stig Pedersen-Bjergaard, © 2015 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2015 by John Wiley & Sons, Ltd. 123-172 pp.
28. Seemann B, Alon T, Tszin S, Fialkov AB, Amirav A. Electron ionization LC-MS with supersonic molecular beams—the new concept, benefits and applications *J. Mass Spectrom.* 2015; 50: 1252–1263.
29. Tszin S, Bokka R, Keshet U, Alon T, Fialkov AB, Tal N, Amirav A. Comparison of electrospray LC–MS, LC–MS with Cold EI and GC–MS with Cold EI for sample identification. *Intern. J. Mass Spectrom.* 2017; 422: 119-125.
30. Gomes NGM, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Hybrid MS/NMR methods on the prioritization of natural products: Applications in drug discovery, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 147: 234-249.
31. Wolfender JL, Queiroz EF, Hostettmann K. Development and Applications of LC-NMR Techniques, In: *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*, 2nd. Edition, edited by Steven M. Colegate, Russell J. Molyneux, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton USA, 2009, 143-190 pp.
32. Tewari R, Gupta M, Ahmad F, Rout PK, Misra L, Patwardhan A, Vasudevad R. Extraction, quantification and antioxidant activities of flavonoids, polyphenols and pinitol from wild and cultivated *Saraca asoca* bark using RP-HPLC-PDA-RI method. *Ind. Crops Prod.* 2017; 103: 73–80.

33. Sharma K, Ko EY, Assefa AD, Haa S, Nile SH, Lee ET, Park SW. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties, *J. Food Drug Anal.* 2015; 23: 243-252.
34. Al-Matani SK, Al-Wahaibi RNS, Hossain MA. Total flavonoids content and antimicrobial activity of crude extract from leaves of *Ficus sycomorus* native to Sultanate of Oman. *Karbala Intern. J. Modern Sci.* 2015; 1: 166 – 171.
35. Zhang SL, Deng P, Xu YC, Lü SW, Wang JJ. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. *J. Integ. Agric.* 2016; 15(9): 2175–2181.
36. Sohrabi MR, Darabi G. The application of continuous wavelet transform and least squares support vector machine for the simultaneous quantitative spectrophotometric determination of Myricetin, Kaempferol and Quercetin as flavonoids in pharmaceutical plants. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016; 152: 443–452.
37. Deborde C, Moing A, Roch L, Jacob D, Rolin D, Giraudeau P. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrosc.* 2017; 102–103: 61–97.
38. Topcu G, Ulubelen A. Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques. *J. Mol. Struct.* 2007; 834–836: 57–73.
39. Elyashberg M. Identification and structure elucidation by NMR spectroscopy. *Trends Anal. Chem.* 2015; 69: 88–97.
40. Amaro HM, Guedes AC, Preto MAC, Sousa-Pinto I, Malcata FX. *Gloeotheca sp.* as a Nutraceutical Source—An Improved Method of Extraction of Carotenoids and Fatty Acids. *Mar. Drugs* 2018; 16: 327.
41. Bayona LM, Videnova M, Choi YH. Increasing Metabolic Diversity in Marine Sponges Extracts by Controlling Extraction Parameters. *Mar. Drugs* 2018; 16: 393.
42. Khandelwal S, Tailor YK, Kumar M. Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/ catalyst systems in organic transformations. *J. Mol. Liq.* 2016; 215: 345–386.
43. Bubalo MC, Vidovic S, Redovnikovic IR, Jokic S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod. Process.* 2018; 109: 52-73.
44. Renard CMGC. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. *LWT* 2018; 93: 390-395.
45. Cunha SC, Fernandes JO. Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends Anal. Chem.* 2018; 105: 225-239.
46. Dai Y, Spronsen JV, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 2013; 766: 61–68.
47. Espino M, Fernández MA, Gomez FJV, Silva MF. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 2016; 76: 126–136.

48. Dai Y, Spronsen JV, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *J. Nat. Prod.* 2013; 76: 2162 – 2173.
49. Tomé LIN, Baião V, da Silva W, Brett CMA. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Appl. Mater. Today* 2018; 10: 30–50.
50. Bosiljkov T, Dujmic F, Bubalo MC, Hribar J, Vidrih R, Brncic M, *et al.* Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* 2017; 102: 195–203.
51. Aryafard M, Abbasi M, Řeha D, Harifi-Mood AR, Minofar B. Experimental and theoretical investigation of solvatochromic properties and ion solvation structure in DESs of reline, glyceline, ethaline and their mixtures with PEG 400. *J. Mol. Liq.* 2019; 284: 59-67.
52. Roldán-Ruiz MJ, Jiménez-Riobóo RJ, Gutiérrez MC, Ferrer ML, del Monte F. Brillouin and NMR spectroscopic studies of aqueous dilutions of malicine: Determining the dilution range for transition from a “water-in-DES” system to a “DES-in-water” one. *J. Mol. Liq.* 2019; 284: 175-181.
53. ElAchkar T, Fourmentin S, Greige-Gerges H. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *J. Mol. Liq.* 2019; 288.
54. Lapeña D, Lomba L, Artal M, Lafuente C, Giner B. The NADES glyceline as a potential Green Solvent: A comprehensive study of its thermophysical properties and effect of water inclusion. *J. Chem. Thermodyn.* 2019; 128: 164-172.
55. Abria A, Babajani N, Zonouz AM, Shekaari H. Spectral and thermophysical properties of some novel deep eutectic solvent based on l-menthol and their mixtures with ethanol. *J. Mol. Liq.* 2019; 285: 477-487.
56. Škulcová A, Majová V, Dubaj T, Jablonsk M. Physical properties and thermal behavior of novel ternary green solvents *J. Mol. Liq.* 2019; 287: 110991.
57. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 2013; 766: 61–68.
58. Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sust. Chem. Eng.* 2014; 2: 2416–2425.
59. Ribeiro B, Florindo C, Iff L, Coelho M, Marrucho I. Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2015; 3: 2469–2477.
60. Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syltatk C, Holtmann D. Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 2019; 37(9): 943-959.
61. Benabid S, Benguerba Y, AlNashef IM, Haddaoui N. Theoretical study of physicochemical properties of selected ammonium salt based deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* 2019; 285: 38-46.

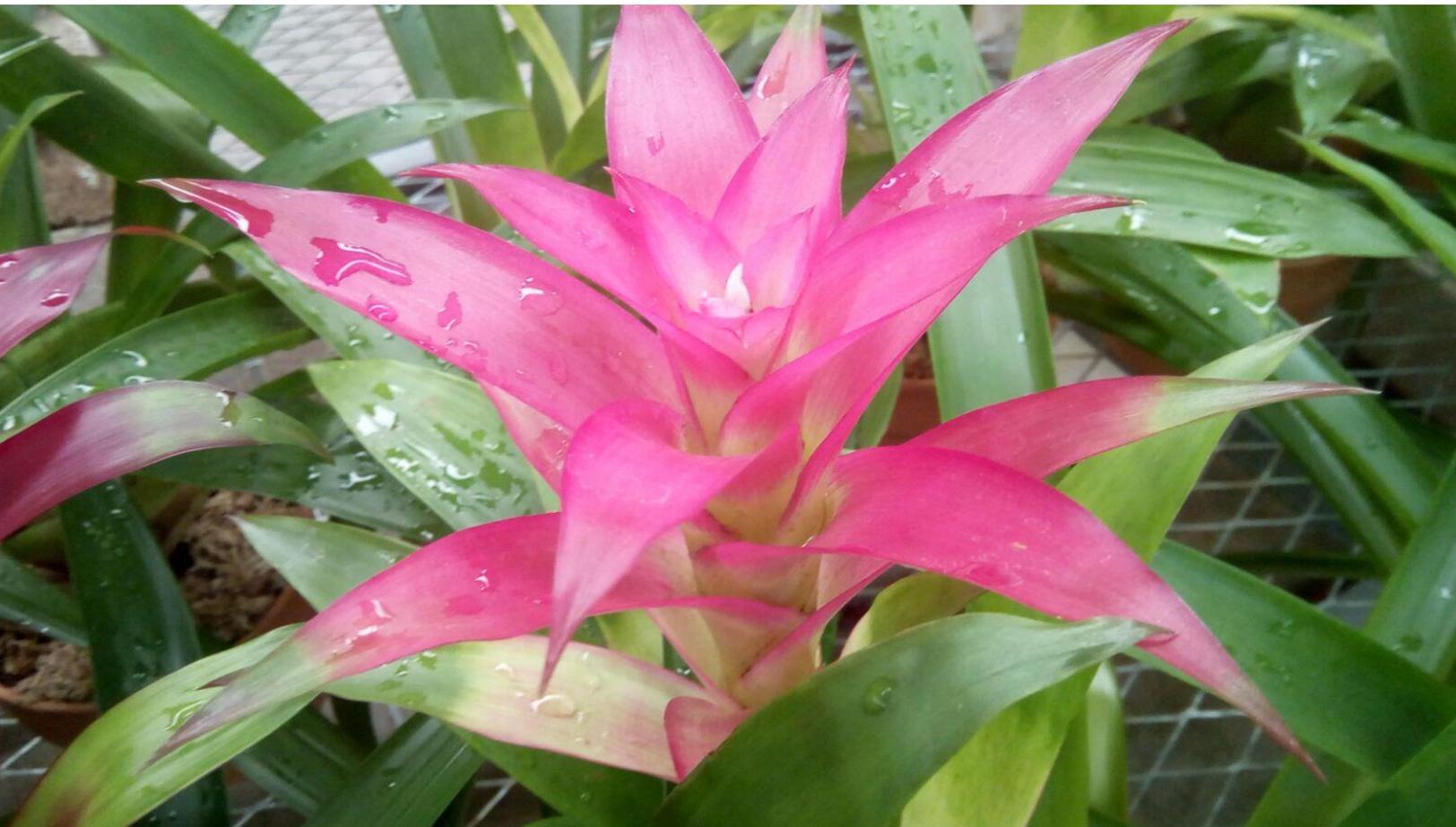
62. Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65 (18): 3591–3601.
63. Bosiljkov T, Dujmic F, Bubalo MC, Hribar J, Vidrih R, Brncic *et al.* Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* 2017; 102 195–203.
64. Zeng YJ, Xu P, Yang HR, Zong MH, Lou WY. Purification of anthocyanins from saskatoon berries and their microencapsulation in deep eutectic solvents LWT - Food Sci. Technol. 2018; 95: 316–325.
65. Chanioti S, Tzia C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2018; 48: 228–239.
66. Zhuang B, Dou LL, Li P, Liu EH. Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi cacumen*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 134: 214–219.
67. Ma Y, Liu M, Tan T, Yan A, Guo L, Jiang K. *et al.* Deep eutectic solvents used as extraction solvent for the determination of flavonoids from *Camellia oleifera* flowers by high - performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 2018; 1-10.
68. van Osch DJGP, Zubeir LF, van den Bruinhorst A, Rocha MAA, Kroon MC. Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Water Immiscible Extractants. *Green Chem.* 2015; 17: 4518-4521.
69. Zhou P, Wang X, Liu P, Huang J, Wang C, Pan M, Kuang Z. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Ind. Crops Prod.* 2018; 120: 147–154.
70. Vieira V, Prieto MA, Barros L, Coutinho JAP, Ferreira ICFR, Ferreira O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. *Ind. Crops Prod.* 2018; 115: 261–271.
71. Saha SK, Dey S, Chakraborty R. Effect of choline chloride- oxalic acid based Deep eutectic solvent on the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Aegle marmelos* J. *Mol. Liq.* 2019; 287: 110956.
72. Bi W, Tian M, Row KH. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatog. A* 2013; 1285: 22–30.
73. Meng Z, Zhao J, Duan H, Guan Y, Zhao L. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from *Pollen Typhae* by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 161: 246–253.

74. Liu Y, Zhang H, Yu H, Guo S, Chen D. Deep eutectic solvent as a green solvent for enhanced extraction of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin from *Aurantii Fructus* Phytochem. Anal. 2018; 1-8.
75. Ibrahim RK, Hayyan M, ALSaadi MA, Ibrahim S, Hashim MA. Physical properties of ethylene glycol-based deep eutectic solvents. J. Mol. Liq. 2019; 276: 794–800.
76. Kanberoglu GS, Yilmaz E, Soylak M. Application of deep eutectic solvent in ultrasound-assisted emulsification microextraction of quercetin from some fruits and vegetables. J. Mol. Liq. 2019; 279: 571–577.
77. Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Lee J. Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. J. Clean. Prod. 2017; 151: 87-95.
78. Huang Y, Feng F, Jiang J, Qiao Y, Wu T, Voglmeir J, Chen ZG. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. Food Chem. 2017; 221: 1400–1405.
79. Fernández MA, Espino M, Gomez FJV, Silva MF. Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. Food Chem. 2018; 239: 671-678.
80. Krížek T, Bursová M, Horsley R, Kuchar M, Tuma P, Cabala R, Hložek T. Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. J. Clean. Prod. 2018; 193: 391-396.
81. Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, Jayakumar NS. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. Anal. Chim. Acta 2017; 979: 1-23.
82. Di Sanzo G, Mehariya S, Martino M, Larocca V, Casella P, Chianese S. *et al.*, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Astaxanthin, Lutein, and Fatty Acids from *Haematococcus pluvialis* Microalgae. Mar. Drugs 2018; 16: 334.
83. Dias Maia J, Ramos de Ávila C, Mezzomo N, Lanza M. Evaluation of bioactive extracts of mangaba (*Hancornia speciosa*) using low and high pressure processes. J. Supercrit. Fluids 2018; 135: 198-210.
84. Molino A, Martino M, Larocca V, Di Sanzo G, Spagnoletta A, Marino T. *et al.* Eicosapentaenoic Acid Extraction from *Nannochloropsis gaditana* Using Carbon Dioxide at Supercritical Conditions. Mar. Drugs 2019; 17: 132-147.
85. Cikoš AM, Jokic S, Šubaric D, Jerkovic I. Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. Mar. Drugs 2018; 16(10): 348.
86. Lopez-Avila V, Luque de Castro MD. Microwave-Assisted Extraction Reference. Module in Chemistry, Mol. Sci. Chem. Engin. 2014; 1389.

87. Martino E, Della Volpe S, Cavalloro V, Amri B, Bettaeib L, Kaab B. *et al.* The use of a microwave-assisted solvent extraction coupled with HPLC-UV/PAD to assess the quality of *Marrubium vulgare* L. (white horehound) herbal raw material. *Phytochem. Anal.* 2019; 30: 377–384.
88. Santana APR, Mora-Vargas JA, Guimarães TGS, Amaral CDB, Oliveira A, Gonzalez MH. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *J. Mol. Liq.* 2019; 111452.
89. Fernandez-Pastor I, Luque-Muñoz A, Rivas F, Medina-O'Donnell M, Martinez A, Gonzalez-Maldonado R. *et al.* Quantitative NMR analysis of L-Dopa in seeds from two varieties of *Mucuna pruriens*. *Phytochem. Anal.* 2018;1–6.
90. Prasad B, Garg A, Takwani H, Singh S. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 2011; 30 (2): 360-387.
91. Soares SHV, Taujale R, Garrett R, da Silva AJR, Borges RM. Extending compound identification for molecular network using the LipidXplorer database independent method: A proof of concept using glycoalkaloids from *Solanum pseudoquina* A. *Phytochem. Anal.* 2018;1–7.
92. Aszyk J, Bylinski H, Namiesnik J, Kot-Wasik A. Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry based metabolomics *Trends Anal. Chem.* 2018; 108: 278-295.
93. Ebrahimi-Najafabadi H, Kazemeini SS, Pasdaran A, Hamed A. A novel similarity search approach for high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) fingerprinting of medicinal plants. *Phytochem. Anal.* 2019; 30 (4).
94. Bayram B, González-Sarrías A, Istas G, Garcia-Aloy M, Morand C, Tuohy K, García-Villalba R, Mena P. Breakthroughs in the Health Effects of Plant Food Bioactives: A Perspective on Microbiomics, Nutri(epi)genomics, and Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66 (41): 10686-10692.
95. Wist J. Assistant Professor, Chemistry Department, Universidad del Valle, Cali, Colombia, julien.wist@correounivalle.edu.co, <http://www.nmrlab.org/>
96. <http://www.nmrdb.org>
97. <http://www.cheminfo.org>

Capítulo 2

Metabolitos secundarios aromáticos



Dentro de los metabolitos secundarios, los compuestos con anillos aromáticos constituyen junto con los metabolitos no-aromáticos y los alcaloides, uno de los tres grandes grupos de sustancias naturales, muchos de ellos con grupos hidroxilos fenólicos, por lo que muchos autores los refieren como compuestos fenólicos, aunque estrictamente hablando, algunos de ellos tengan anillos aromáticos, pero no hidroxilos fenólicos. Un ejemplo de estos es la podofilotoxina, un lignano. Estos metabolitos varían estructuralmente, desde moléculas pequeñas con un solo anillo aromático, hasta estructuras con muchos anillos aromáticos, como varios polímeros fenólicos de alto peso molecular.

A continuación, se presentan diferentes aspectos que incluyen aspectos biogénéticos de sustancias derivadas del ácido shikímico; después se presentarán algunos aspectos relevantes de dos clases de compuestos presentes en muchas drogas vegetales como son las antraquinonas y los flavonoides.

Compuestos fenólicos derivados del ácido shikímico

La gran mayoría de estos metabolitos contienen una o varias unidades básicas, denominadas fenilpropanos, que están constituidas por un anillo aromático ligado a una cadena de tres átomos de carbono, en términos simplificados se refieren simplemente como compuestos C_6C_3 , donde C_6 se refiere al anillo aromático y C_3 , a la cadena propanoide. Las figuras 2.1., 2.2 y 2.3 muestran la estructura básica de estos y otros metabolitos secundarios aromáticos, con algunos ejemplos representativos.

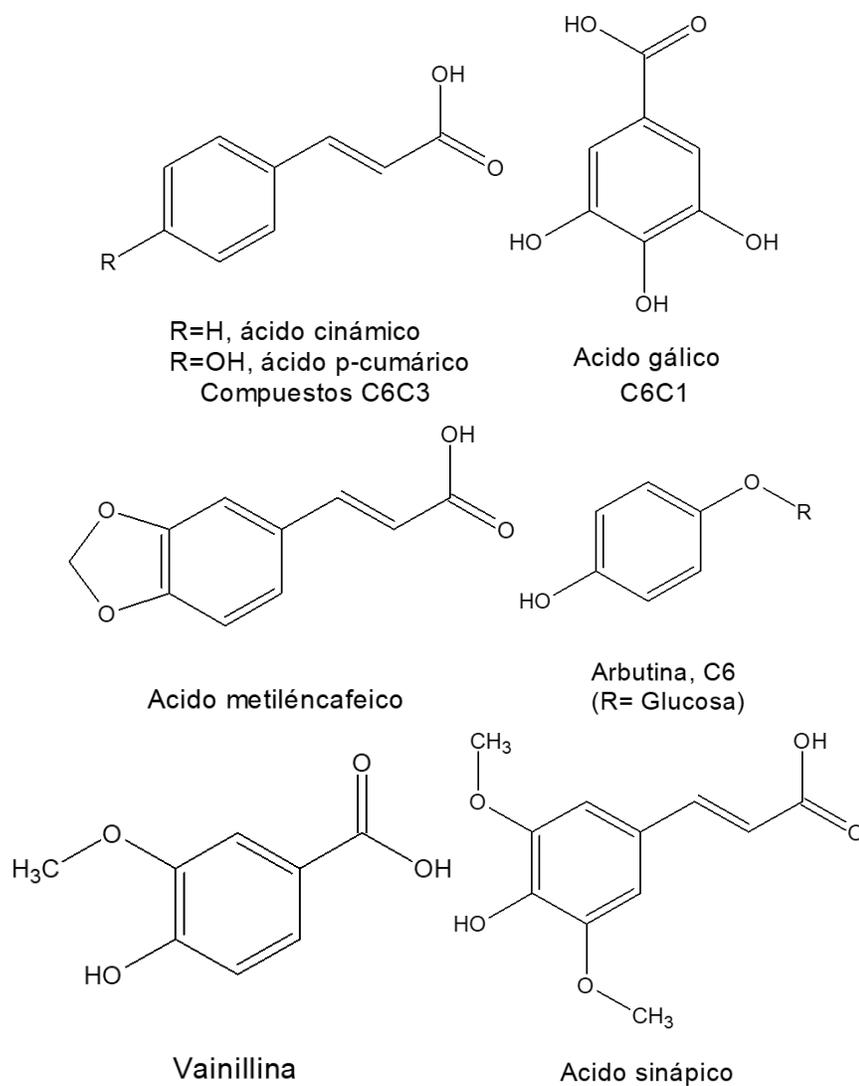
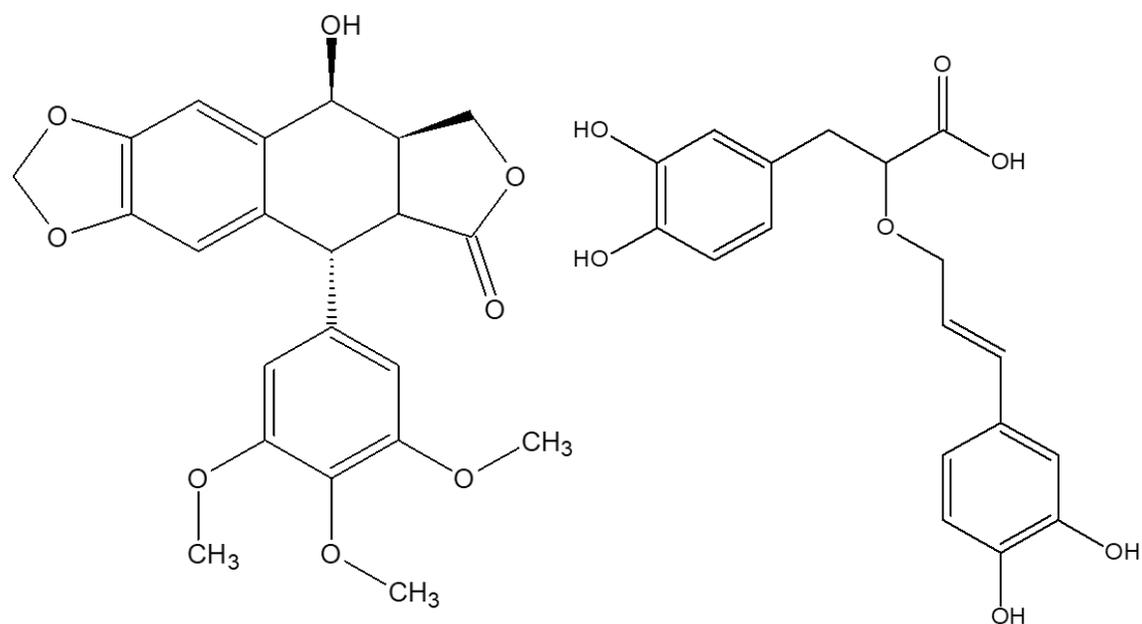
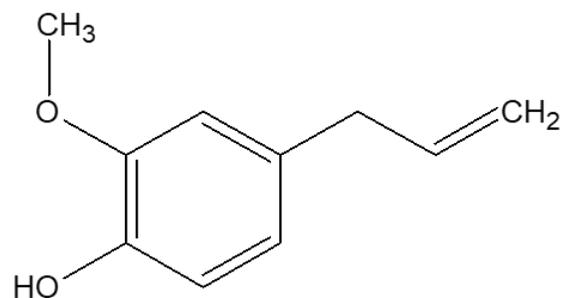


Figura 2.1. Ejemplos estructurales de algunos compuestos C₆, C₆C₁, y C₆C₃. Nótese los sustituyentes oxigenados sobre el anillo aromático con patrones de sustitución *orto* y *di-orto*, característicos de derivados del ácido shikímico.



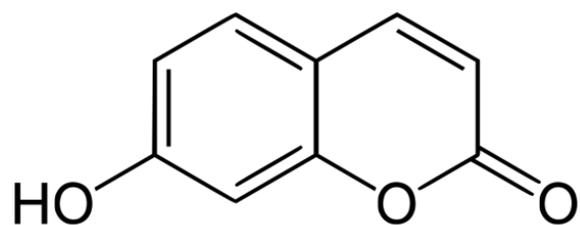
Podofilotoxina (Lignano)
no fenólico (C₆C₃)₂

Acido rosmarínico
(Neolignano) (C₆C₃)₂

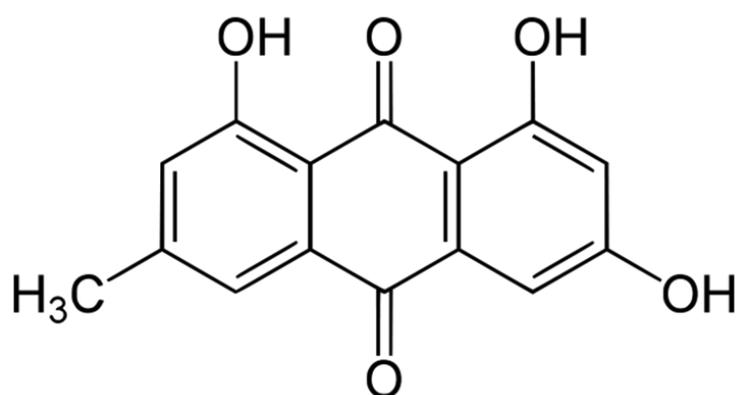


Eugenol

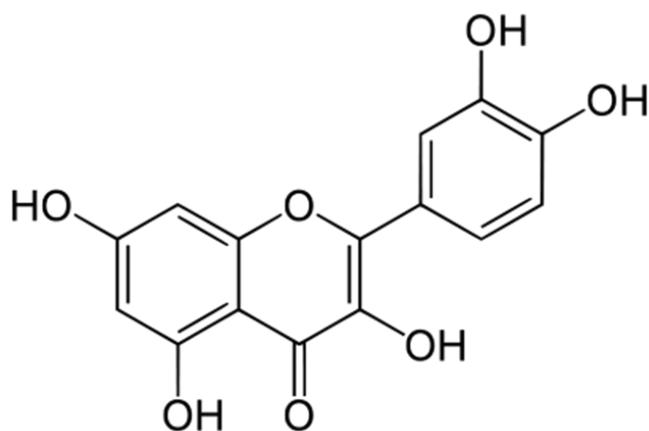
Figura 2.2. Ejemplos estructurales de algunos compuestos C₆C₃, y (C₆C₃)₂



Umbeliferona (una cumarina)



Emodina (una antraquinona)



Quercetina (un flavonoide)

Figura 2.3. Ejemplos estructurales de algunos compuestos aromáticos derivados de la acetilcoenzima-A y del ácido shikímico. La cumarina umbeliferona es derivada del ácido shikímico. La antraquinona emodina es derivada de la acetilcoenzima-A (anillo aromático *meta*-dioxigenado), y el flavonoide quercetina, es derivado de las dos rutas metabólicas secundarias (metabolismo mixto). Nótese que el anillo aromático de la izquierda es *meta*-dioxigenado y el de la derecha es *orto*-dioxigenado.

Desde el punto de vista de su origen biológico, estos compuestos son biosintetizados por los organismos que los producen, mediante rutas biosintéticas que incluyen la del ácido shikímico, la de la acetil coenzima-A, o la combinación de estas (metabolismo mixto) (1-3). A continuación, se tratará del caso de los compuestos originados a través del ácido shikímico, enfatizando en su ruta de biogénesis, y con algunos ejemplos representativos de los principales grupos de compuestos.

El ácido shikímico se aisló inicialmente de la planta asiática *Illicium sp.* (Fam. Illiciáceas) y es reconocido como un compuesto que es el punto de partida para un vasto número de compuestos naturales de muchas clases. Su existencia como un discreto constituyente vegetal ha sido observada ampliamente solo a finales del siglo XX, pero no hay duda de que es un metabolito universal de las plantas superiores y de muchas clases de organismos no mamíferos. El ácido shikímico se extrae comercialmente a partir del anís estrellado *Illicium verum* y es precursor industrial para la obtención del medicamento antiviral Tamiflu®.

El ácido shikímico es el precursor de la mayoría de constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos diferentes de los formados en la ruta del acetato-malonato. En muchos casos puede observarse un patrón estructural claro que permite reconocer los compuestos derivados del ácido shikímico. Este es el patrón de oxigenación del anillo aromático. En compuestos derivados de la ruta del Acetato-Malonato los grupos oxigenados generalmente están en disposición *meta* entre sí, o sea que los polifenoles son derivados tipo resorcinol. En compuestos aromáticos derivados del ácido shikímico, los patrones de oxigenación son generalmente tipo catecol (*orto*) o pirogalol (*di-orto*), y así por ejemplo los fenoles mono oxigenados de origen shikímico son generalmente *p*-hidroxi-compuestos.

La formación del ácido shikímico ocurre a partir de precursores de 3 y 4 átomos de carbono como son el ácido fosfoenol-pirúvico (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P) a través de una serie de etapas que se resumen en la Figura 2.4. El precursor inmediato es el ácido quínico.

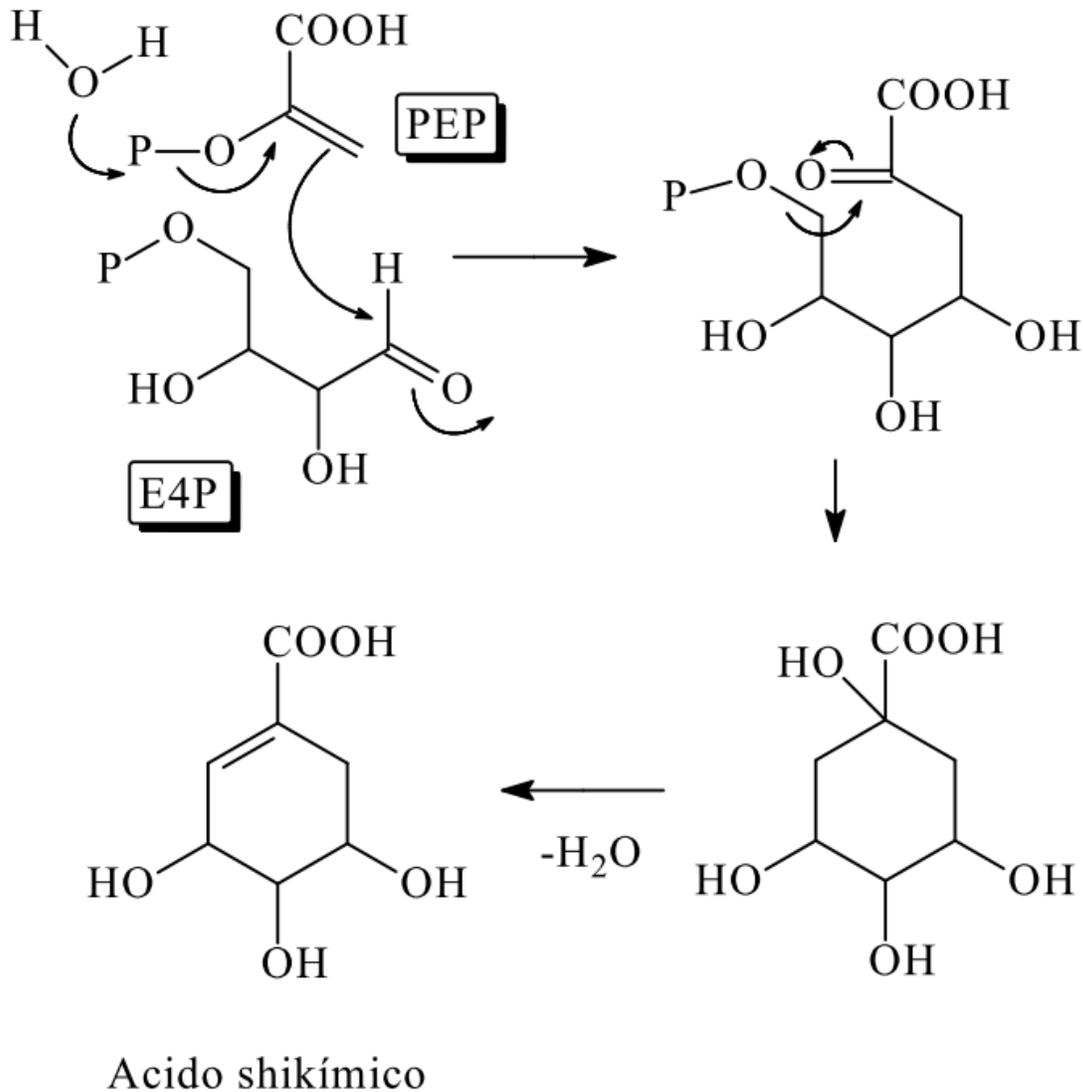


Figura 2.4. Biogénesis del ácido shikímico a partir de PEP y 4EP.

Biogénesis de fenilalanina y tirosina

La reacción posterior del ácido shikímico con PEP seguida de las transformaciones que se muestran en el esquema de la Figura 2.5a, llevan por la vía del ácido corísmico intermedio al ácido prefénico. La deshidratación, descarboxilación y transaminación del ácido prefénico, llevan al ácido fenilpirúvico y al aminoácido fenilalanina (Figura 2.5b). La deshidrogenación, descarboxilación y transaminación del ácido prefénico, llevan al aminoácido aromático tirosina. Ambos aminoácidos fenilalanina y tirosina, son punto de partida para diversos metabolitos.

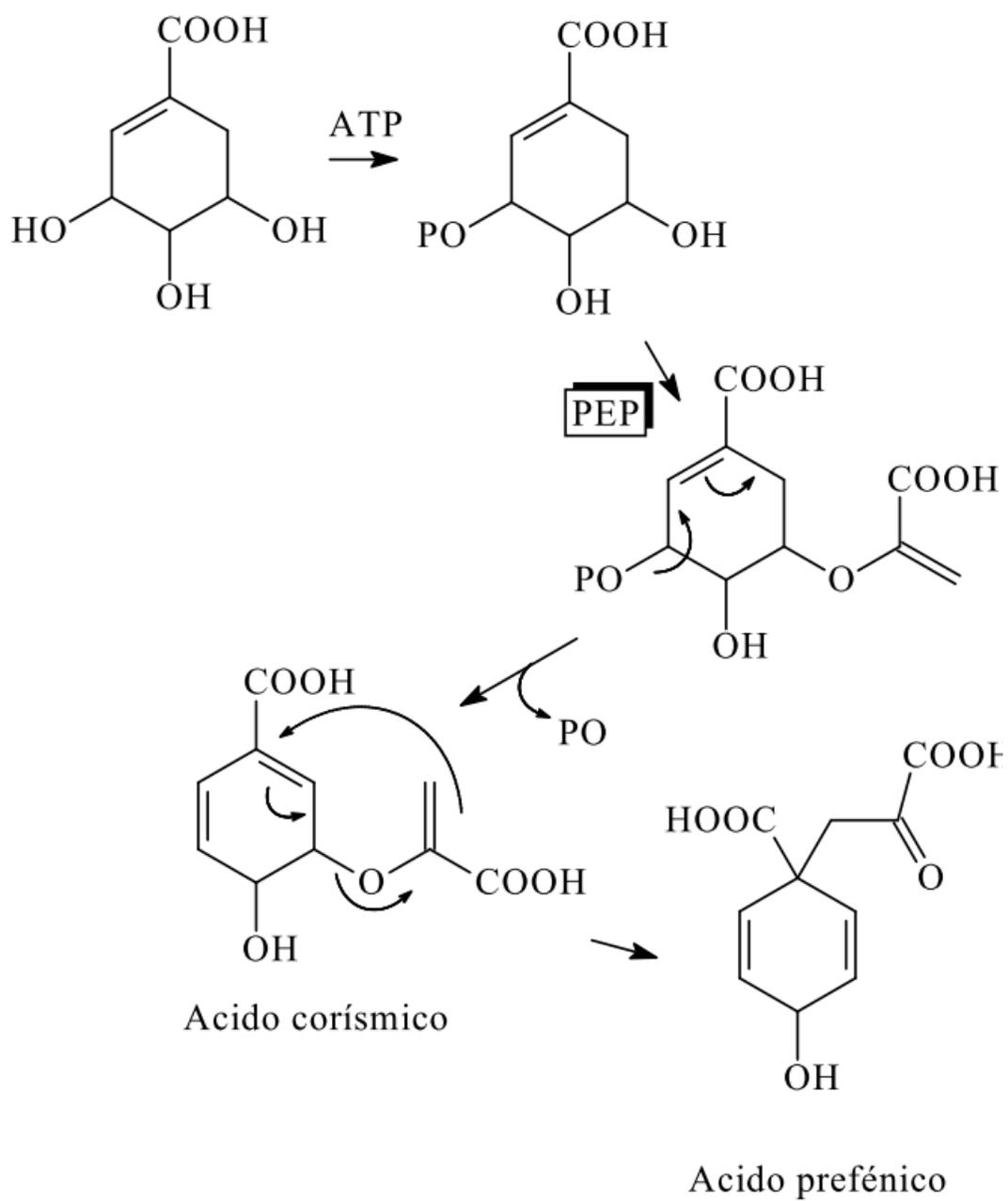


Figura 2.5a. Esquema biogénico para mostrar el origen del ácido corísmico y prefénico, a partir del ácido shikímico.

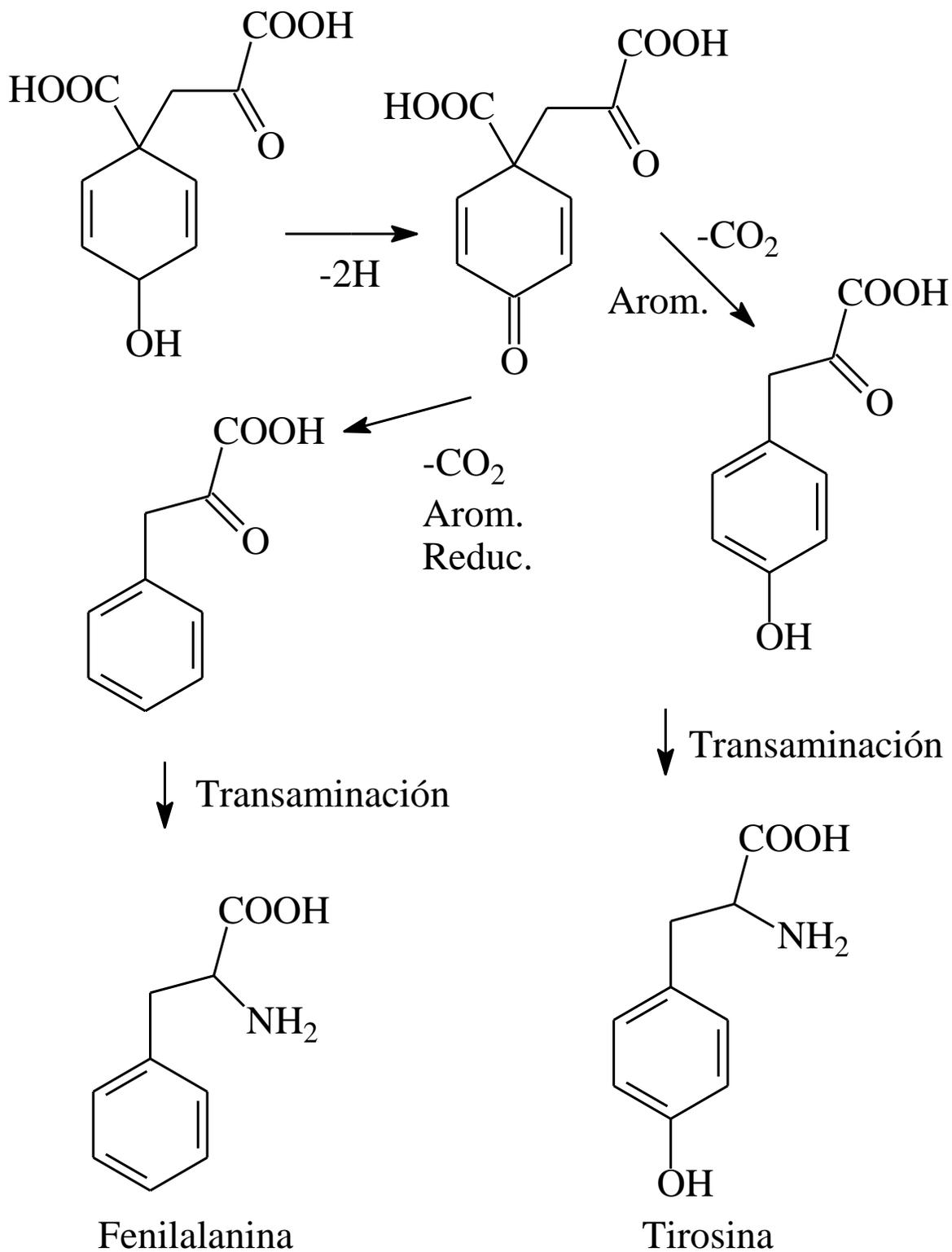


Figura 2.5b. Esquema biogénico que explica el origen de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina a partir del ácido prefénico.

El ácido corísmico es el precursor inmediato no solo del ácido prefénico sino también del ácido antranílico y se aisló inicialmente de una cadena mutante de *Aerobacter aerogenes*.

El ácido prefénico, el ácido fenilpirúvico y el *p*-hidroxifenilpirúvico son los precursores de fenilalanina y tirosina. La fenilalanina es un constituyente universal de proteínas y es precursor de una extensa clase de alcaloides y además es punto de partida para la secuencia biosintética que lleva a los llamados compuestos C₆C₃.

La ruta principal para la producción de los ácidos cinámico y *p*-cumárico a partir de fenilalanina o tirosina respectivamente, se explica mediante la remoción de amoníaco de la fenilalanina o tirosina. La figura 2.6 esquematiza el proceso. La fenilalanina-amonioliasa PAL, elimina amoníaco y genera el doble enlace C=C para dar origen al ácido cinámico; mientras que la tirosina-amonioliasa TAL, elimina amoníaco y genera el enlace C=C que da origen al ácido *p*-cumárico.

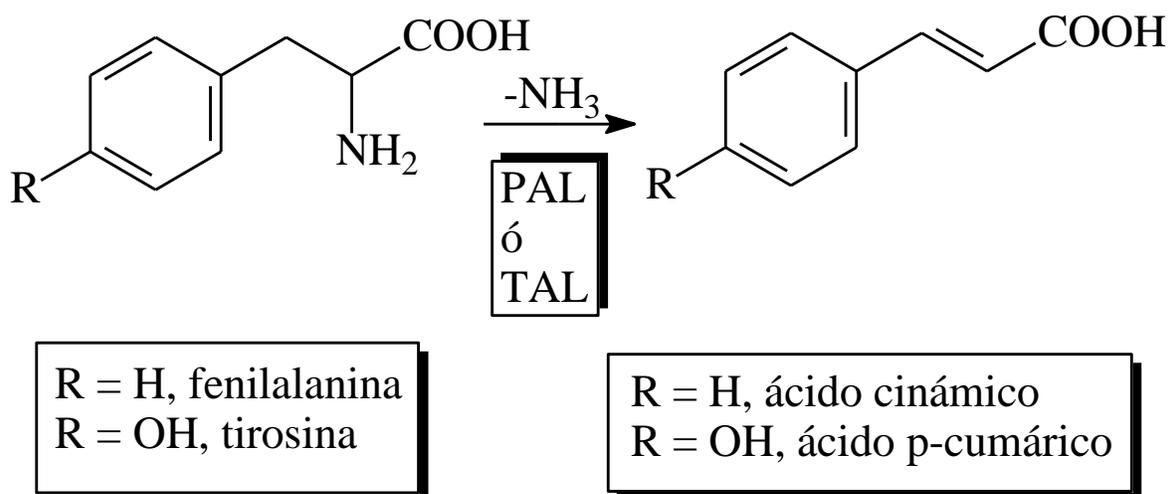


Figura 2.6. Esquema biogénico que explica la desaminación de los aminoácidos para dar origen a los denominados ácidos cinámicos. PAL corresponde a la sigla inglesa de Phenylalanine Ammonia Lyase, y TAL a Tyrosine Ammonia Lyase.

Las evidencias experimentales muestran que la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) se encuentra ampliamente distribuida en los vegetales, mientras que la tirosina-amonioliasa (TAL) se encuentra principalmente en ciertas gramíneas. Estas enzimas son esteroespecíficas ya que son capaces de desaminar los L-aminoácidos pero no los D-aminoácidos. Los ácidos cinámicos proporcionados por acción de las amonioliasas constituyen el punto de partida para una cantidad enorme de procesos metabólicos secundarios.

Biogénesis de compuestos C₆

Relativamente pocos compuestos con solo 6 átomos de carbono en un anillo bencénico han sido aislados de la naturaleza. Los más comunes son la arbutina (el β -D-glucopiranosido de la hidroquinona) y su éter metílico. La arbutina es derivada de la ruta del ácido shikímico \rightarrow fenilalanina. Esto se comprobó por experimentos en los cuales se administró fenilalanina, ácido cinámico, tirosina y ácido shikímico marcados con ^{14}C a hojas de *Pyrus communis* (Pera, familia rosáceas. Estos experimentos demostraron que la arbutina era originada a partir de estos precursores ya que efectivamente se aisló arbutina radiactiva. Estos resultados y la posterior demostración experimental de la formación de arbutina a partir de fenilalanina marcada en *Grenvillea robusta* (Fam. proteáceas) confirmaron este hallazgo. Esta biogénesis se esquematiza en la Figura 2.7.

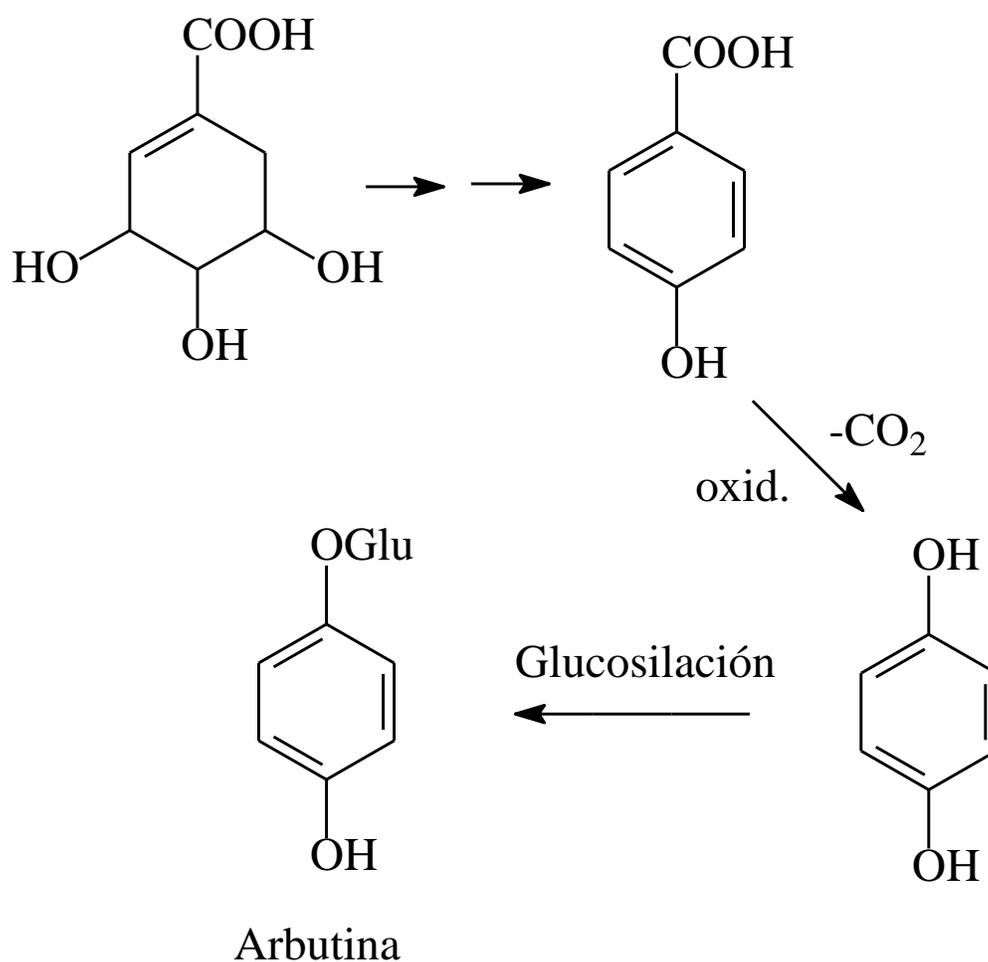


Figura 2.7. Biogénesis de arbutina.

Biogénesis de compuestos C_6C_1

A partir de los ácidos cinámicos las plantas pueden generar compuestos aromáticos C_6C_1 , formando inicialmente el éster de la coenzima A y el ácido cinámico (o p-cumárico), el cual puede sufrir degradación de la cadena lateral de 3 átomos de carbono mediante un proceso enzimático similar a la β -oxidación de los ácidos grasos. El esquema de este proceso es el descrito en la Figura 2.8.

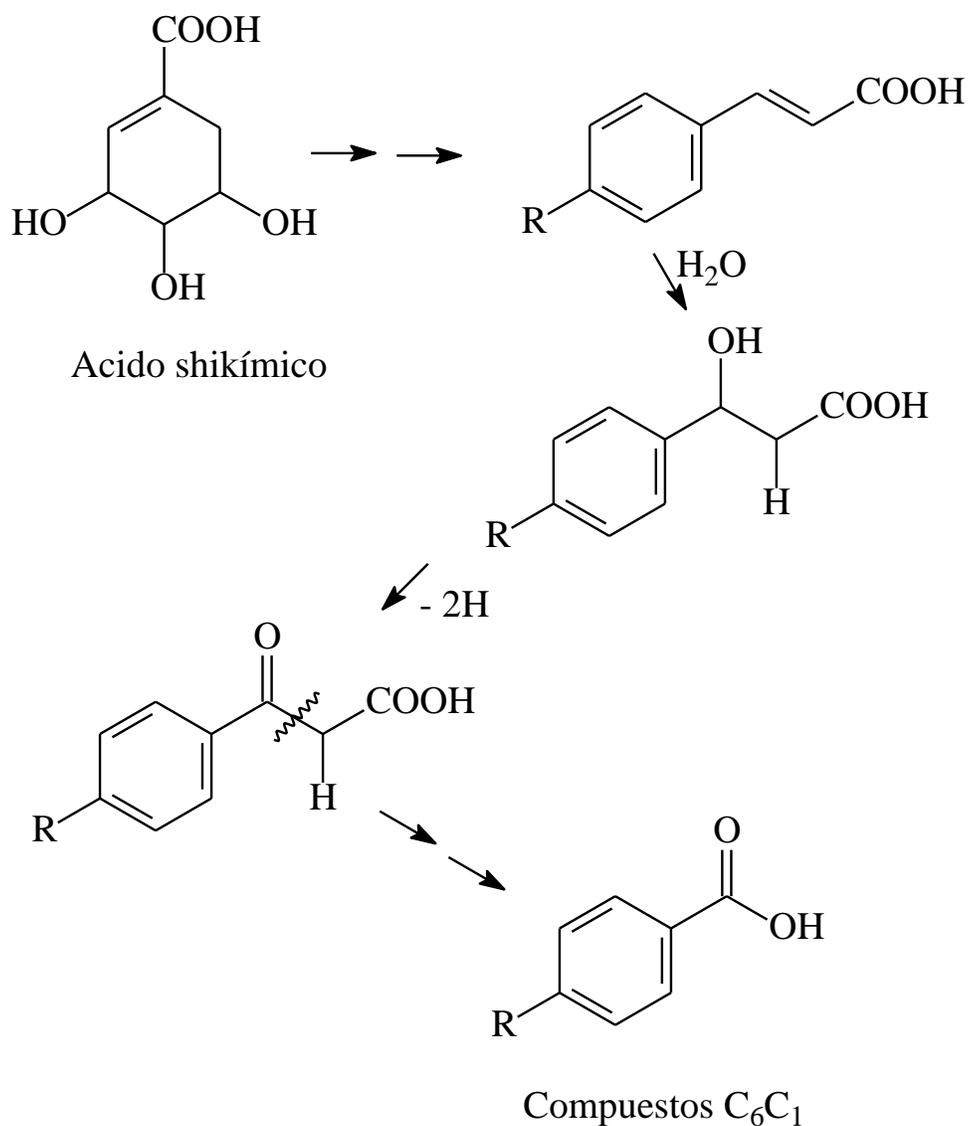


Figura 2.8. Esquema para la biogénesis de compuestos C_6C_1

El derivado ácido benzoico así originado puede ser descarboxilado para generar compuestos C_6 , o sufrir una o varias etapas de hidrogenación para generar derivados tipo benzaldehído, alcohol bencílico y compuestos tipo tolueno (Figura 2.9.).

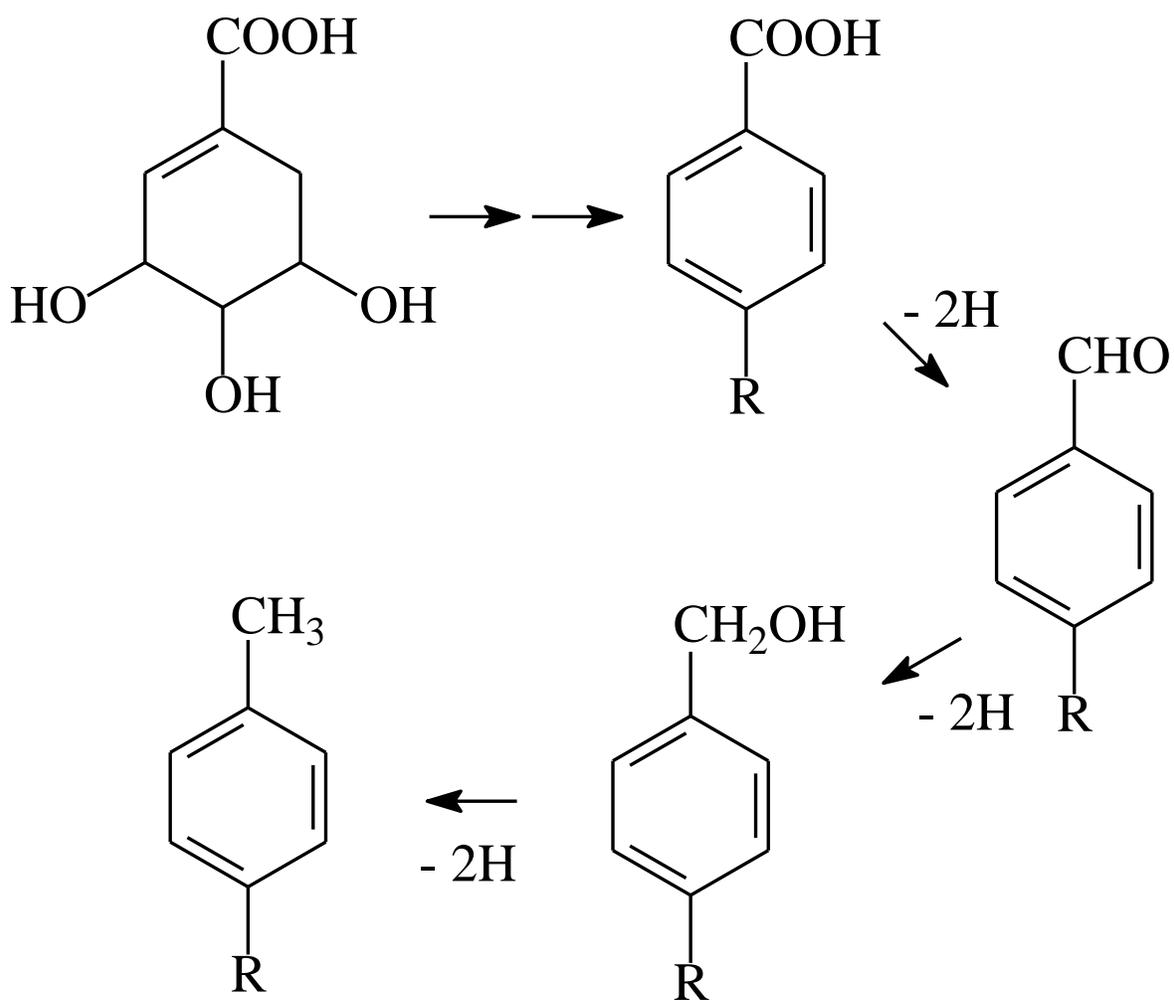


Figura 2.9. Esquema biogénico que explica el origen de compuestos C_6C_1 con diferente grado de oxidación (R puede ser H u OH , dependiendo del aminoácido precursor).

La Figura 2.10 muestra algunos ejemplos de compuestos naturales C_6 y C_6C_1 .

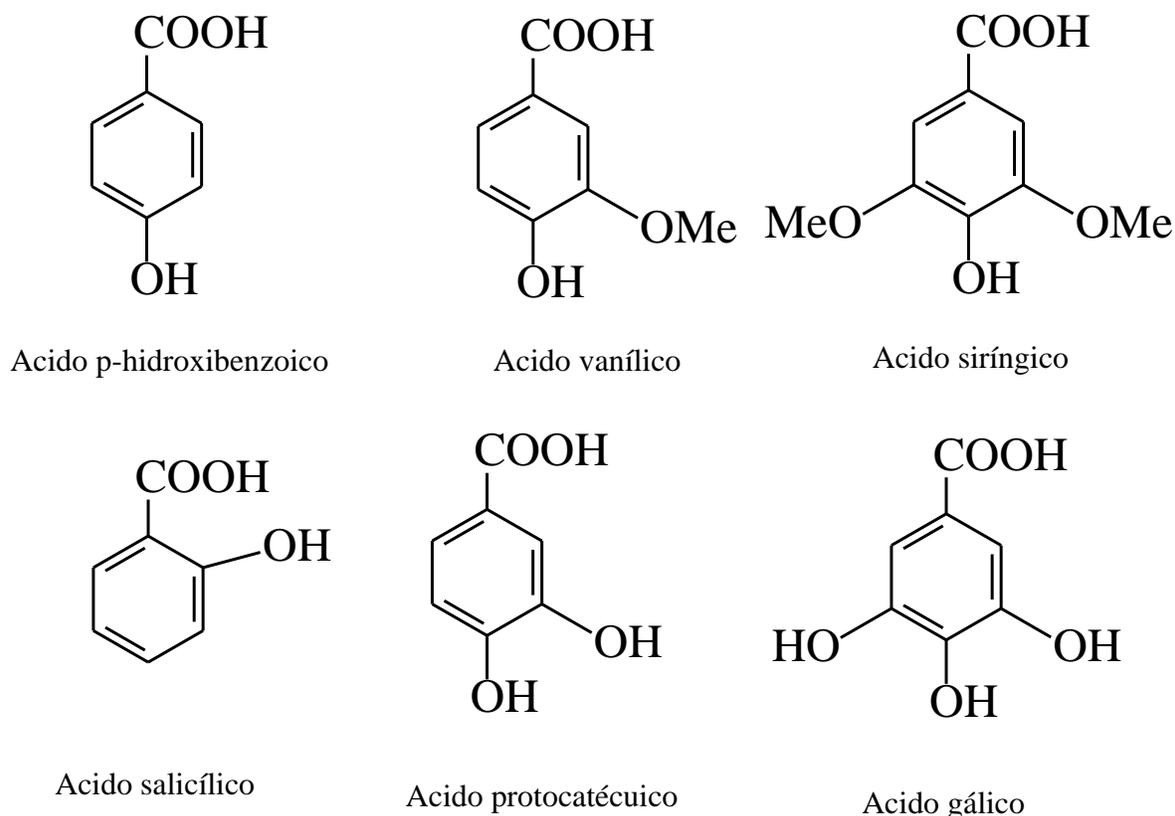


Figura 2.10. Estructuras de varios compuestos naturales C_6 y C_6C_1

Biogénesis de compuestos C_6C_2

Muchos derivados feniletilamina (considerados por algunos autores como protoalcaloides) se derivan de la fenilalanina y la tirosina, presumiblemente por una descarboxilación del aminoácido, seguida (o precedida) por modificaciones simples tales como N-metilación (por metionina) y oxidación.

Una clase de compuestos C_6C_2 que provienen de compuestos C_6C_3 por el proceso de β -oxidación seguido de descarboxilación del resultante β -cetoácido, son derivados tipo acetofenona, de los cuales son ejemplos típicos: pungenósido, piceína y androsina.

Biogénesis de compuestos C_6C_3 (Fenilpropanoides)

La importancia fundamental de la secuencia de reacciones ácido shikímico \rightarrow ácido prefénico \rightarrow fenilalanina (o tirosina) \rightarrow ácidos cinámicos, y la amplia distribución natural de los ácidos cinámicos y sus productos de biodegradación, lleva a la conclusión de que muchos compuestos naturales que contienen cadenas laterales de 3 átomos de carbono ligados a núcleos fenólicos, son productos de reducciones biológicas de los ácidos cinámicos. La naturaleza ofrece muchos ejemplos de casi todos los niveles de oxidación de la cadena lateral de estos compuestos.

Una característica estructural general en este tipo de sustancias es la presencia frecuente de funciones oxigenadas en posiciones 4 y 3, 4 (Figura 2.11).

Es interesante anotar también que en ciertos casos los isómeros *alil* y *propenil* se encuentran juntos en algunas plantas. Por ejemplo, el safrol y el isosafrol se encuentran juntos en *Cananga odorata* (Fam. anonáceas), y la miristicina junto con la isomiristicina se encuentran juntas en *Myristica fragrans* (Fam. miristicáceas).

Biogénesis de compuestos $(C_6C_3)_2$ (Lignanos) y $(C_6C_3)_n$ Ligninas

Los lignanos y la lignina son una clase de compuestos fenilpropanoides ampliamente distribuidos en la naturaleza cuyas estructuras sustentan la visión de que se forman por dimerización oxidativa o polimerización de unidades C_6C_3 . En la figura 2.12 se dan las estructuras de algunos ejemplos típicos de lignanos naturales. La figura 2.13, explica el mecanismo probable de formación de un núcleo característico de lignanos, mediante un acoplamiento oxidativo de fenoles. La figura 2.14 muestra una estructura parcial del polímero lignina, característico de la madera de muchos árboles.

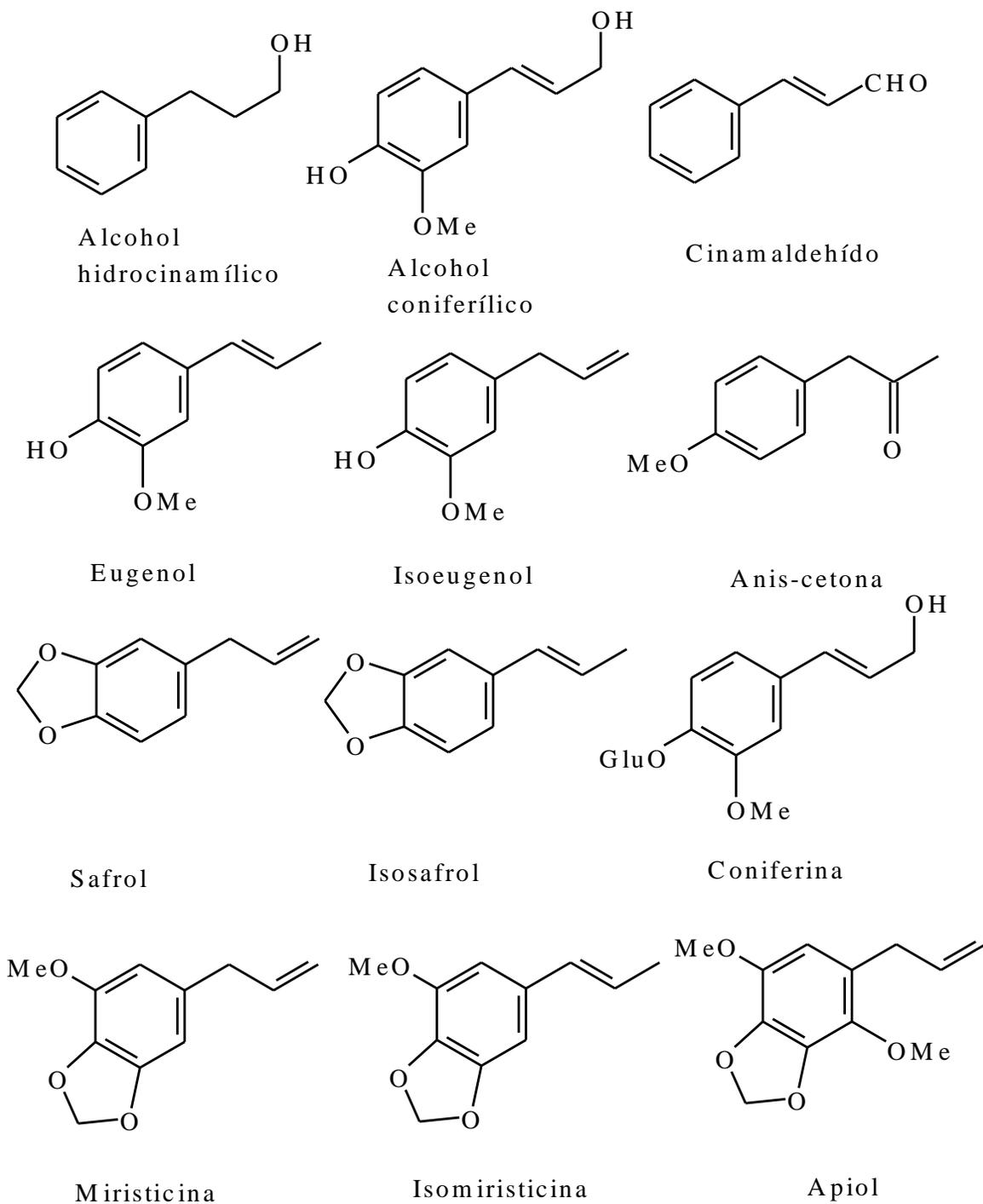


Figura 2.11. Ejemplos estructurales de sustancias naturales C_6C_3 derivadas biogénicamente del ácido shikímico vía fenilalanina y tirosina.

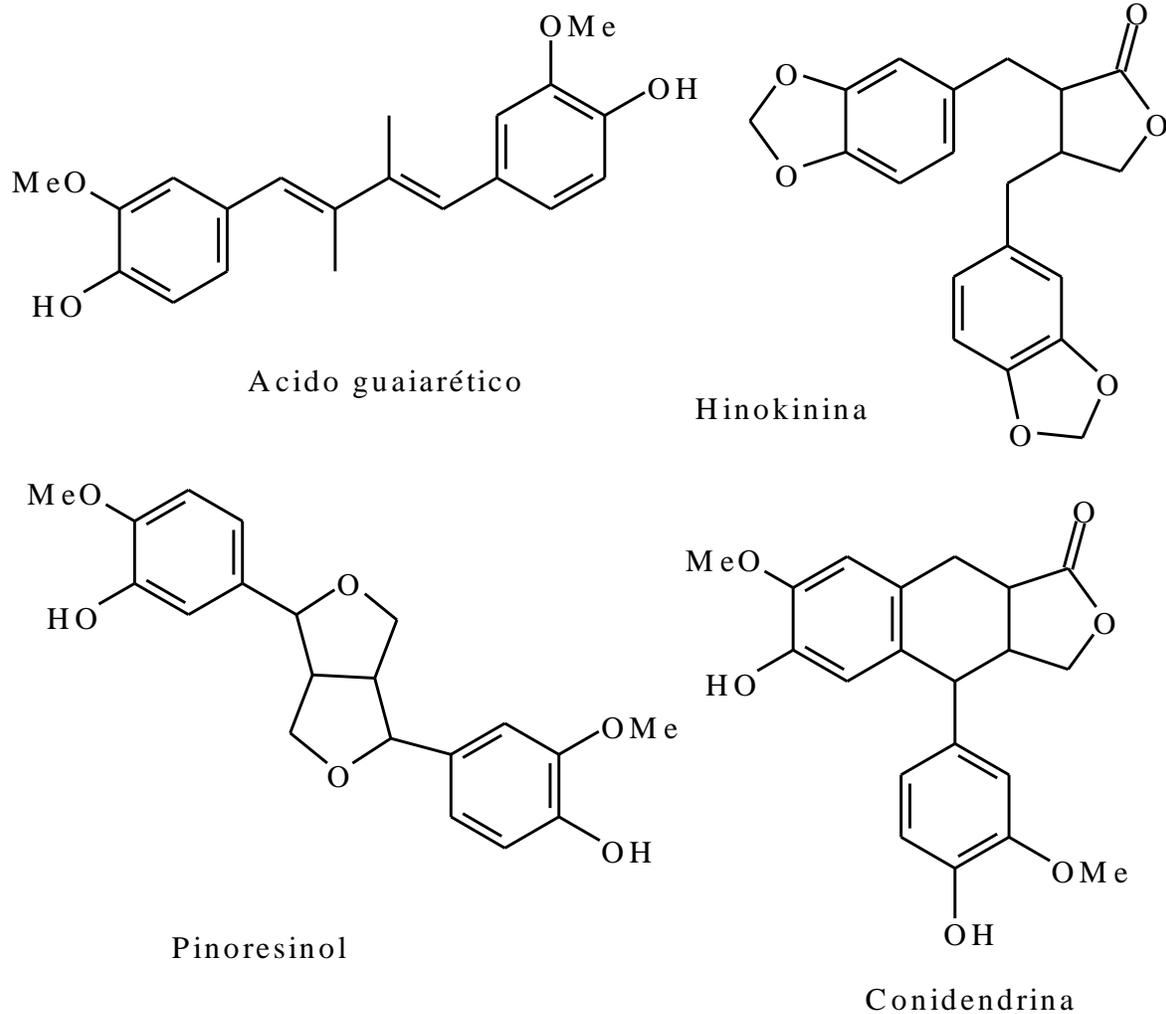
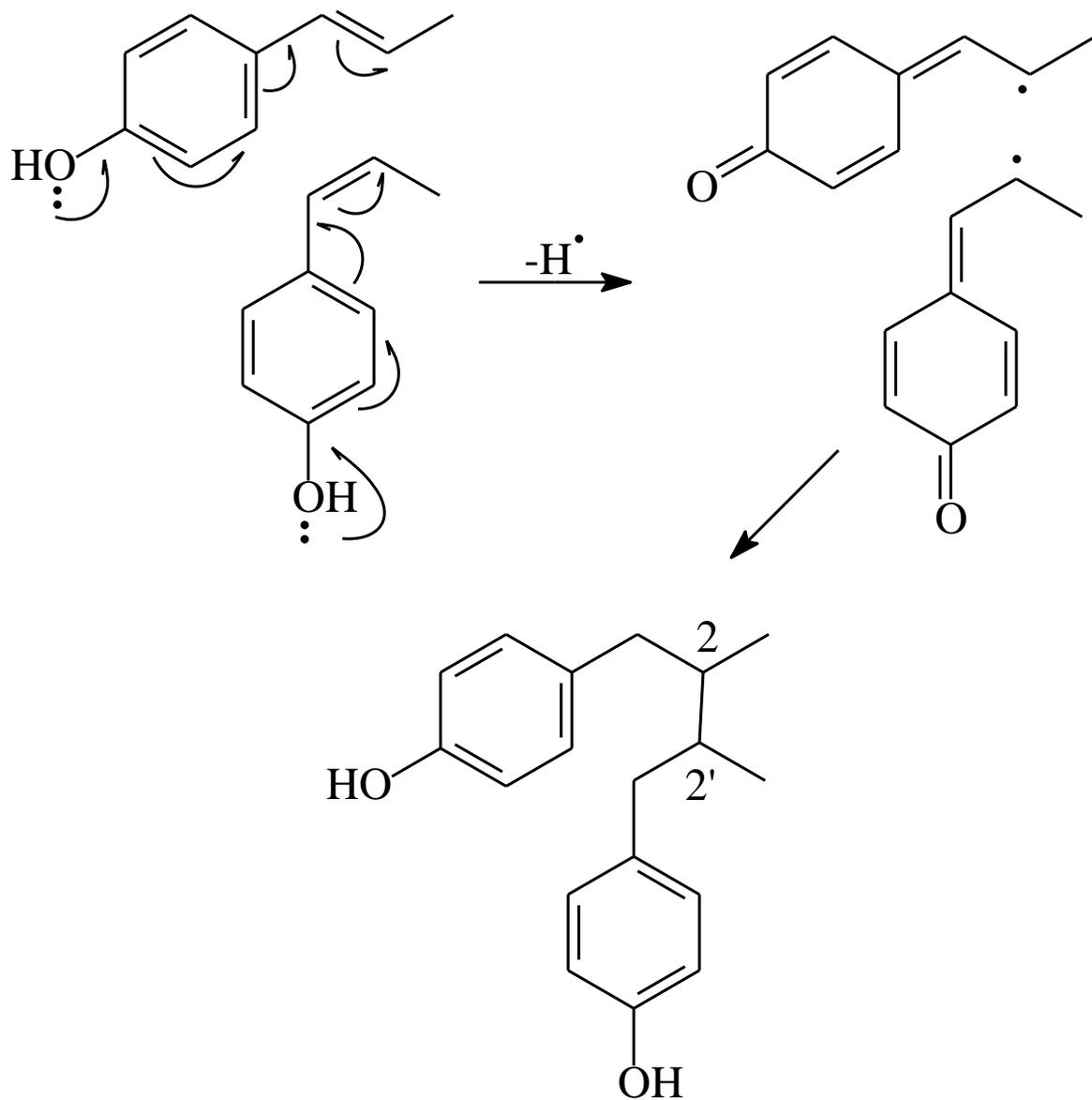


Figura 2.12. Ejemplos de estructuras químicas de lignanos naturales.



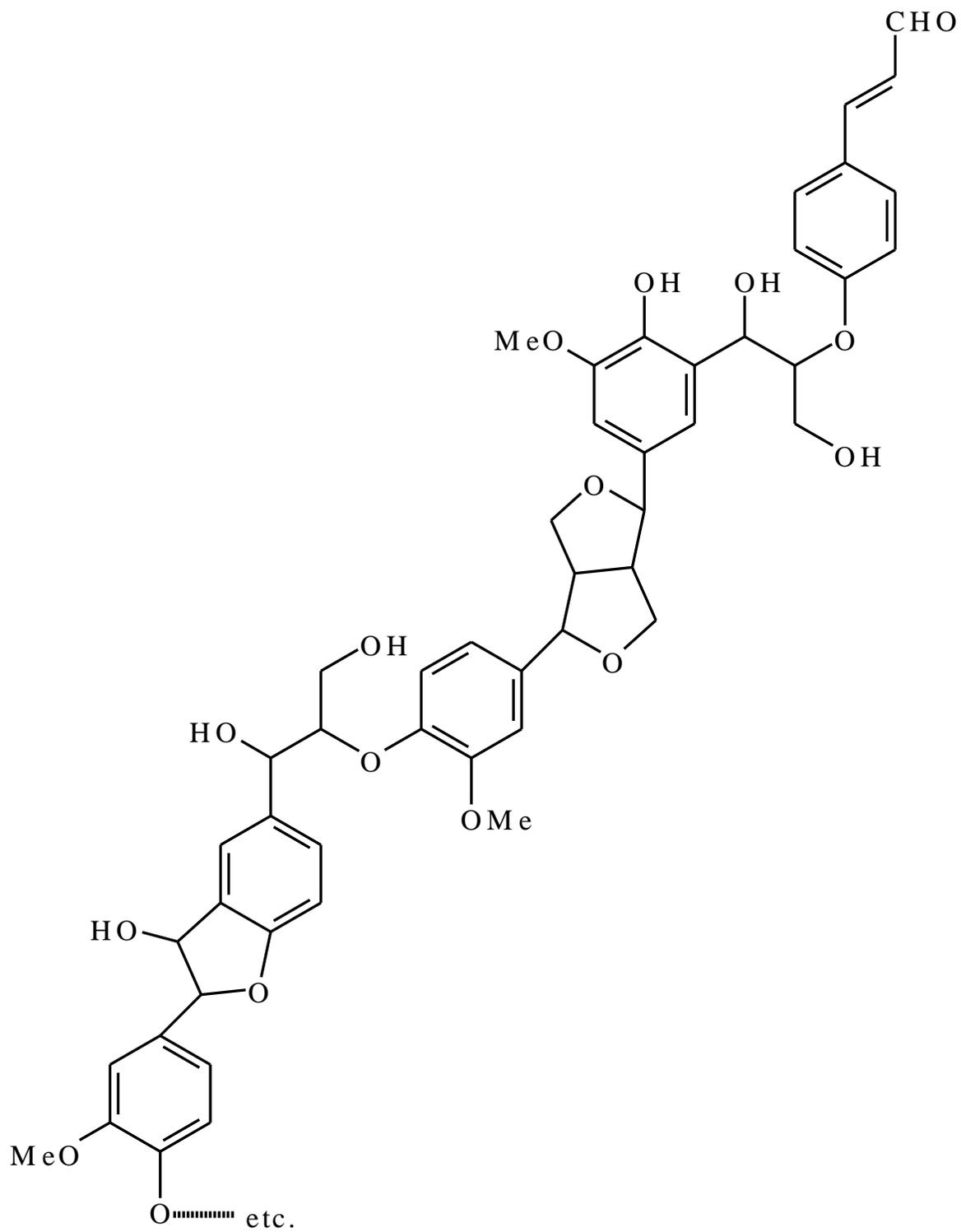


Figura 2.14. Estructura parcial de la molécula de lignina, un polímero $[C_6C_3]_n$

Biogénesis de cumarinas

Las cumarinas son otra clase de compuestos C_6C_3 de los cuales una gran cantidad derivan biogénicamente del ácido shikímico. La Figura 2.15 muestra varios ejemplos de cumarinas naturales originadas vía shikímico.

La biogénesis de las cumarinas simples derivadas de ácido shikímico se explica según el esquema de la Figura 2.16.

Además de las cumarinas simples citadas antes, también se originan a partir del ácido shikímico las llamadas cumarinas piránicas y furánicas. La biogénesis de estas cumarinas relativamente complejas en su estructura, puede proceder vía una ciclización de una cumarina simple previamente prenilada.

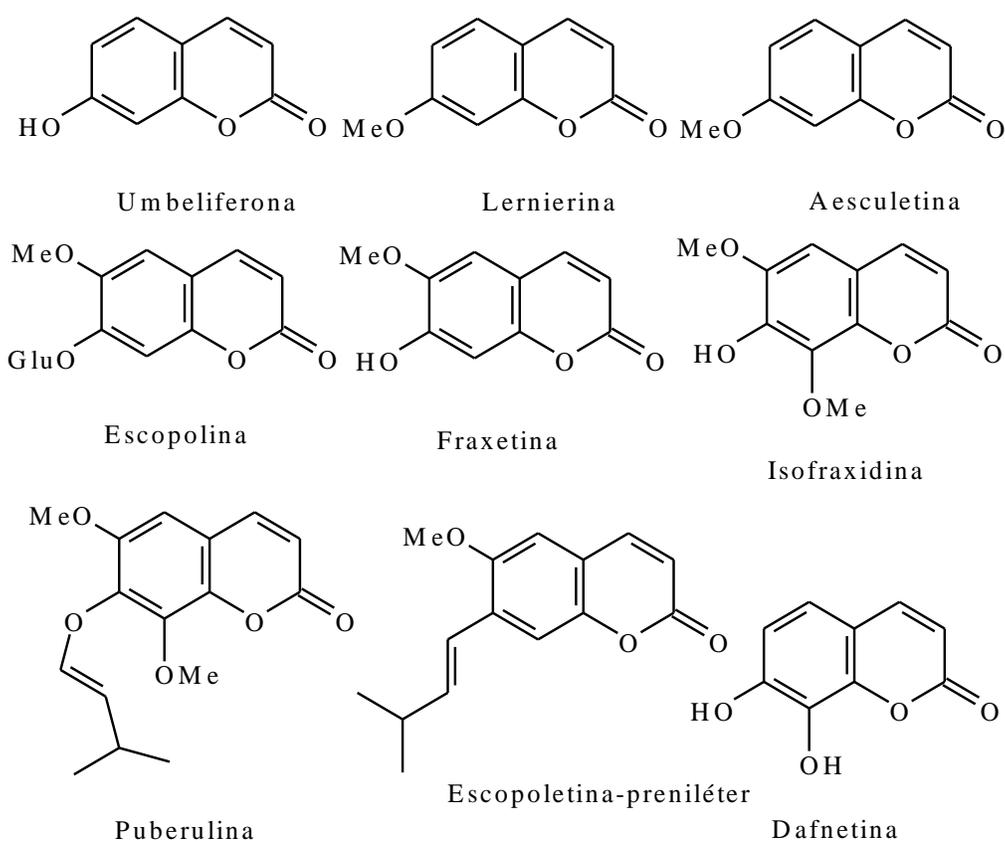


Figura 2.15. Estructuras químicas de algunas cumarinas naturales.

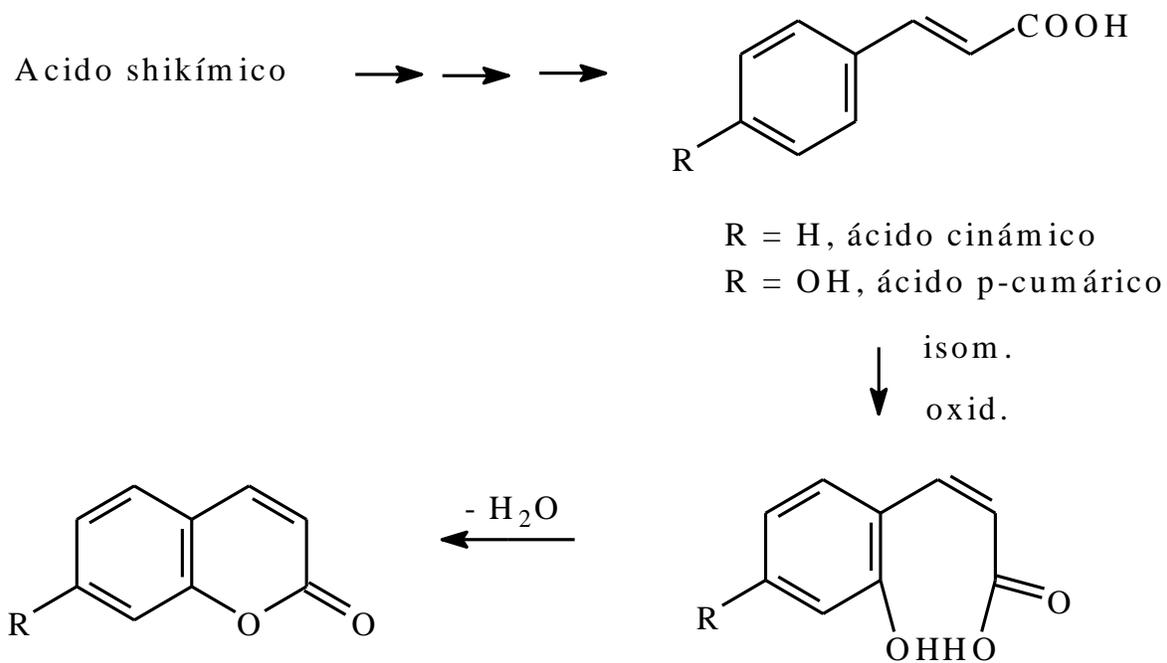


Figura 2.16. Esquema biogénico que explica la biogénesis de cumarinas simples.

Antraquinonas y compuestos relacionados

Se denomina quinonas a las sustancias naturales que contienen un anillo de seis carbonos con dos grupos carbonilo vecinales u opuestos; a las primeras se las denomina *orto*-quinonas y a las segundas *para*-quinonas. Dentro de estas últimas se incluyen las antraquinonas, las cuales presentan la estructura básica mostrada en la figura 2.17.

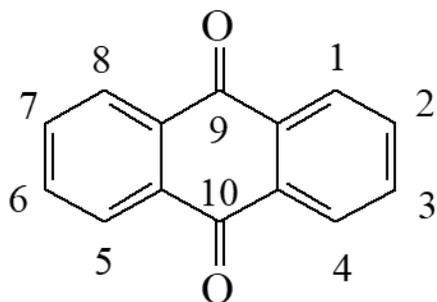
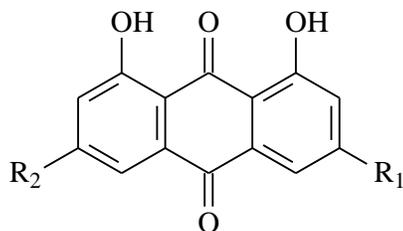
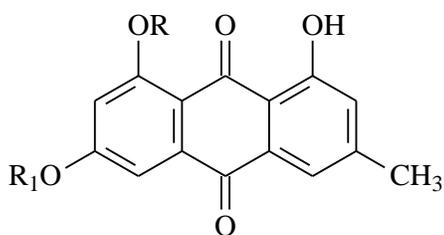


Figura 2.17. Núcleo básico de las antraquinonas con enumeración utilizada para propósitos de nomenclatura.

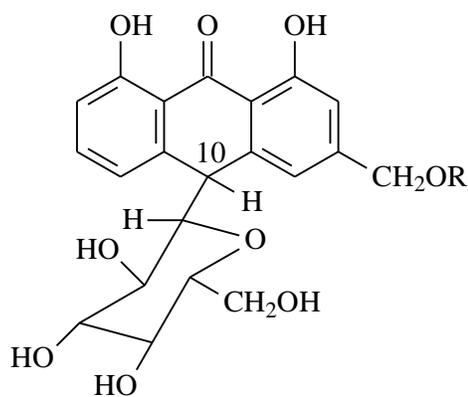
Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico. La figura 2.18. muestra las estructuras de varias antraquinonas naturales como fisciión, emodina, rheína, y otros compuestos químicamente relacionados.



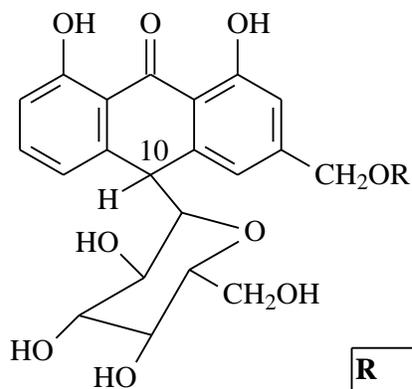
R ₁	R ₂	Compuesto
CH ₃	OH	Rheum-Emodina
CH ₃	OCH ₃	Fisción
CH ₃	H	Crisofanol
CH ₂ OH	H	Aloé-emodina
COOH	H	Rheína



R	R ₁	Compuesto
Glucosil	Ramnosil	Glucofrangulina-A
Glucosil	Apiosil	Glucofrangulina-B
H	Ramnosil	Frangulina-A
H	Apiosil	Frangulina-B



Aloína-A
Aloinósido-A



Aloína-B
Aloinósido-B

R	Compuesto
H	Aloínas A y B
Ramnosil	Aloinósidos A y B

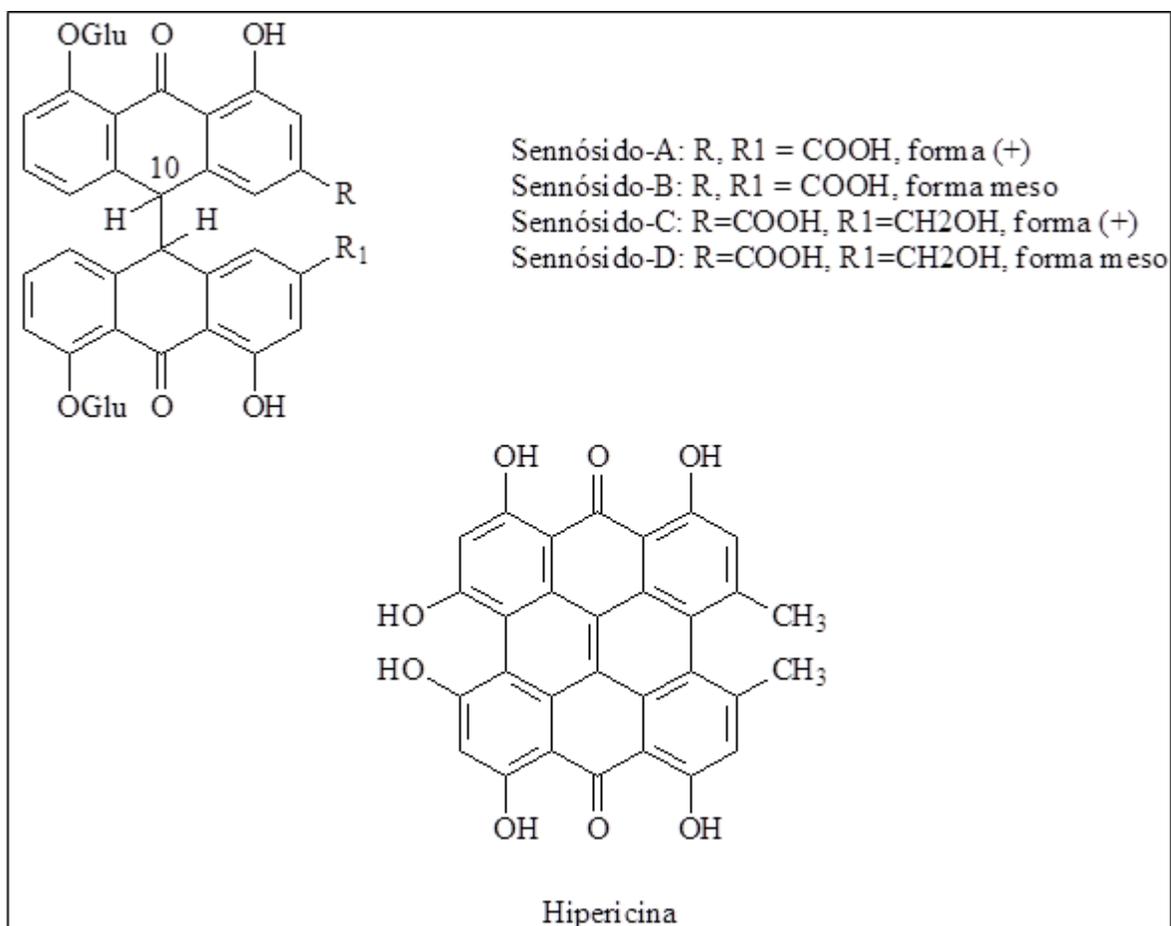


Figura 2.18. Estructuras de varios compuestos antracénicos naturales.

Nomenclatura

A estos productos naturales se les denomina comúnmente con nombres vulgares con la terminación "ina" en el caso de las agliconas, u "ósido" en el caso de los glicósidos.

Para una nomenclatura sistemática sencilla de estas sustancias se debe asignar la terminación antraquinona, precedida de los correspondientes sustituyentes, y siguiendo la enumeración dada en la figura 2.16. A manera de ejemplo, el nombre sistemático para la endocrocina (Figura 2.19) será: 4,5,7-trihidroxi-3-carboxi-2-metilantraquinona.

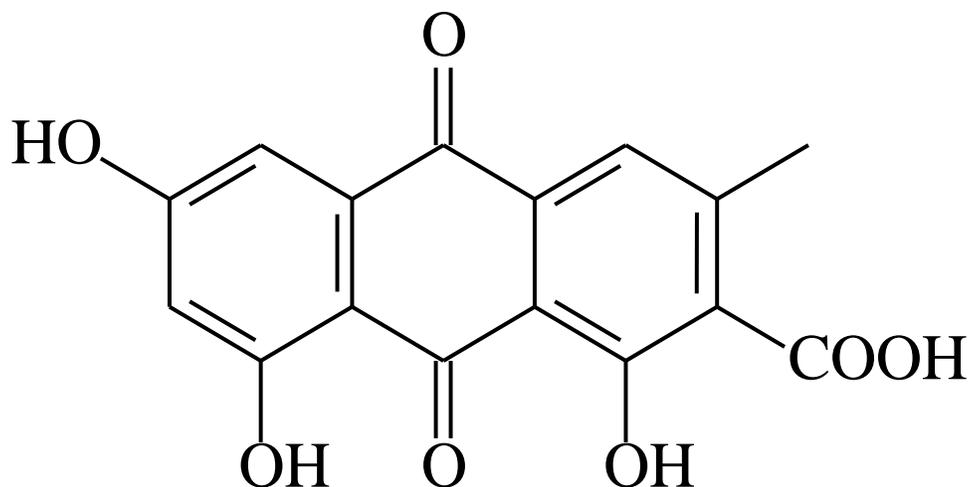


Figura 2.19. Estructura química de la antraquinona natural endrocrocina.

En el caso de los glicósidos, como en el caso de la glucofrangulina-A, el nombre sistemático será: 4-hidroxi-5-O-glucosil-7-O-ramnosil-2-metilantraquinona.

Clasificación

Los compuestos antracénicos vegetales pueden clasificarse según su estado de oxidación en siete grupos estructurales:

- a. Antraquinonas
- b. Antronas
- c. Diantronas
- d. Antranoles
- e. Oxantronas
- f. Naftodiantronas
- g. Antrahidroquinonas

La Figura 2.20 muestra las estructuras básicas de estas siete clases de compuestos antracénicos. Puede observarse en el caso de las diantronas (dímeros de las antronas), que el enlace que une las dos unidades básicas, es decir el enlace entre los carbonos 10 y 10', genera la posibilidad de isómeros CIS y TRANS a través del mismo. Además, si las dos unidades básicas son idénticas, se dice que son HOMODIANTRONAS (por ejemplo, las senidinas A y B), mientras que, si son diferentes, se las llama HETERODIANTRONAS (por ejemplo las senidinas C y D).

Biogénesis

Las antraquinonas y demás compuestos antracénicos citados, son biosintetizados por la ruta de la malonilCoenzima A en el caso de los hongos, líquenes y plantas superiores de las familias ramnáceas, poligonáceas y leguminosas; mientras que, en las rubiáceas, las gesneriáceas, las escrofulariáceas, las verbenáceas y las bignoniáceas, se biosintetizan a partir de ácido shikímico y ácido mevalónico.

Biogénesis vía MalonilCoA

En este proceso, una molécula de AcetilCoA se condensa sucesivamente con 7 moléculas de MalonilCoA para producir una cadena policetídica de 16 carbonos u octacétido. Luego, el octacétido se pliega de la manera mostrada en la figura 2.21, y se cicliza por condensaciones entre los grupos metilenos y sus vecinos carbonilos para dar el triciclo cetónico. Este intermedio enoliza para generar el núcleo de las antronas. El núcleo de las antronas puede dimerizarse enzimáticamente para producir diantronas, o puede oxidarse para dar antranoles y/o antraquinonas.

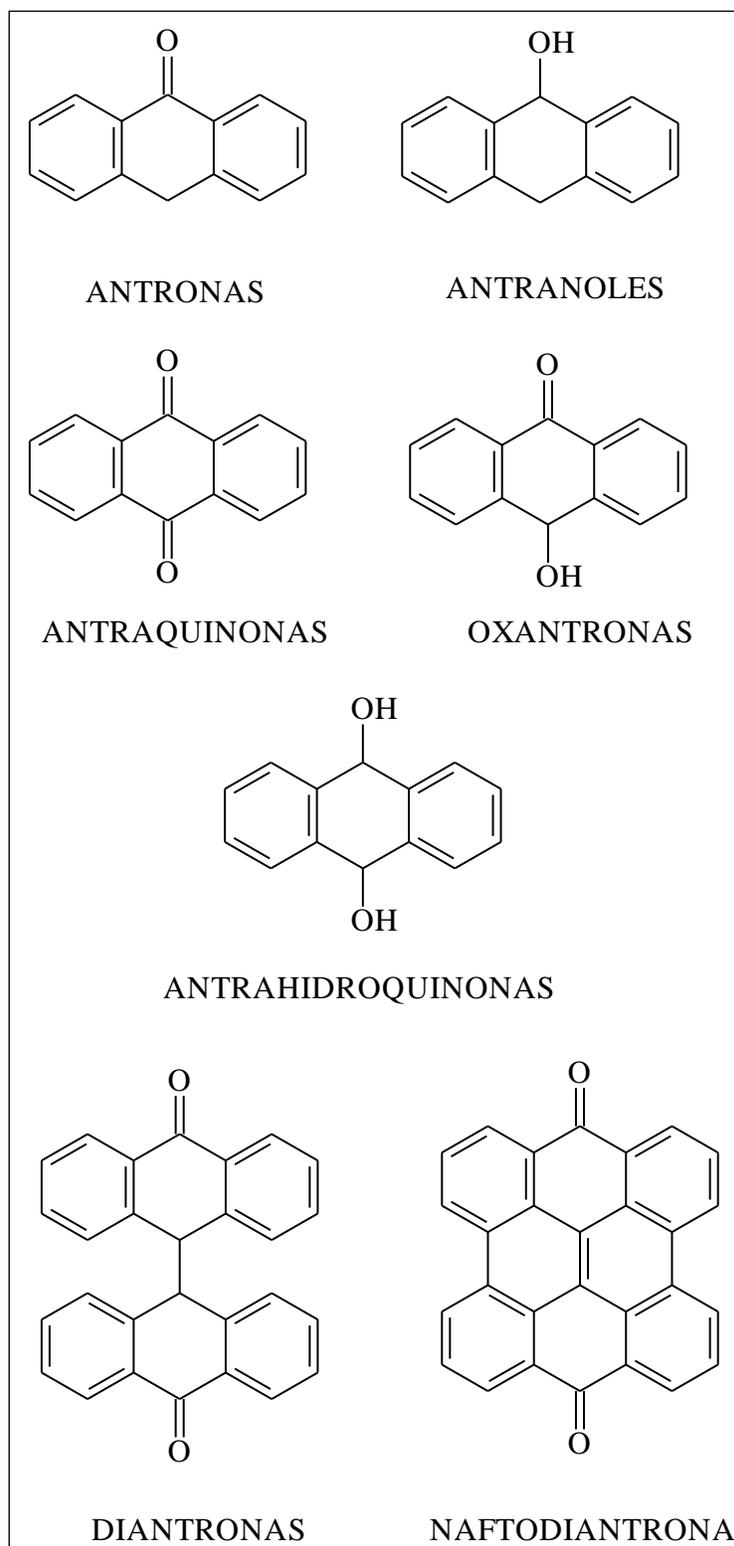


Figura 2.20. Núcleos básicos de compuestos antracénicos.

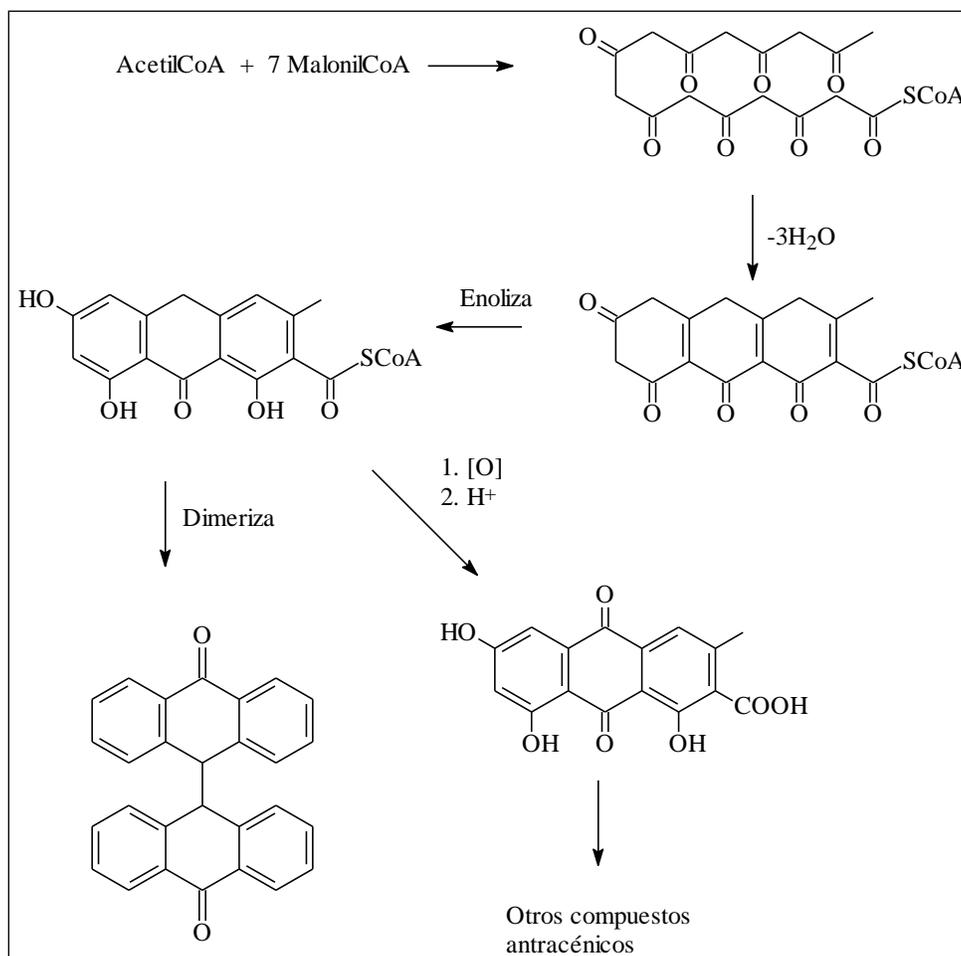


Figura 2.21. Biogénesis de compuestos antracénicos vía MalonilCoA.

Biogénesis vía ácido shikímico + ácido mevalónico

La Figura 2.22 esquematiza el proceso de biogénesis de antraquinonas por combinación de las rutas del ácido shikímico y la acetilCoA (a través de su derivado ácido mevalónico). Inicialmente, una molécula de ácido shikímico se condensa con una molécula de ácido α -cetoglutárico (proveniente del ciclo de los ácidos cítricos). Posteriormente, el anillo del ácido shikímico es deshidratado y aromatizado. Luego, ocurre una condensación intramolecular entre el carbonilo proveniente del ácido shikímico y el metileno α al grupo carbonilo proveniente del ácido α -cetoglutárico, para formar el biciclo. Después, al biciclo se une una cadena de 5 carbonos denominada isopentenilo (proveniente de AcetilCoA vía ácido mevalónico). Esta cadena se cicliza al anterior anillo formado, y luego de procesos de oxidación y aromatización se llega a las antraquinonas.

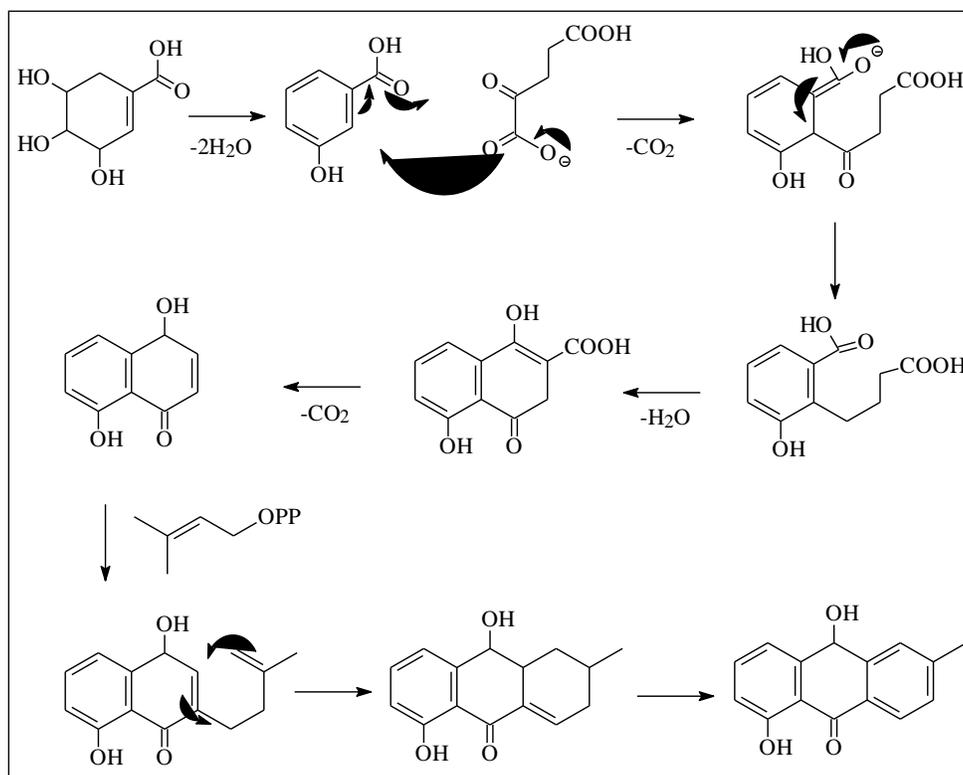


Figura 2.22. Biogénesis de compuestos antracénicos vía ácido shikímico y AcetilCoA.

Distribución y estado natural

Las antraquinonas están ampliamente distribuidas en plantas, y en menor proporción en microorganismos (p. ej. hongos marinos), equinodermos e insectos.

En las plantas se conocen unas 200 antraquinonas. Las familias vegetales que contienen compuestos antracénicos incluyen las rubiáceas, las ramnáceas, las fabáceas, xantorroeáceas y las poligonáceas; y en una menor proporción las liliáceas, leguminosas, bignoniáceas, melastomatáceas, droseráceas, vismiáceas, etc.

En las plantas inferiores como los líquenes se conoce una gran variedad de antraquinonas, incluyendo antraquinonas halogenadas como p.ej. la 7-cloroemodina.

Estas sustancias pueden encontrarse en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, madera y frutos.

Se las encuentra principalmente en forma de glicósidos (por ejemplo, las senidinas y la barbaloina), y en menor proporción en forma libre o agliconas (por ejemplo, alizarina y crisofanol). También se han reportado compuestos antracénicos sulfatados. Se las pueda encontrar también en forma dimérica.

Sin embargo, existen todavía dudas acerca del verdadero estado natural de estas sustancias, pues existen evidencias experimentales de ciertas plantas, las cuales demuestran que las antraquinonas no se encuentran como tales en ellas, sino que son productos de degradación enzimática de las correspondientes formas reducidas (es decir, las antronas y los antranoles). Según esto, las antraquinonas aisladas corresponden a productos de oxidación o dimerización de antronas o antranoles.

En el caso de las antraquinonas aisladas de organismos marinos tales como las anémonas de mar, se tienen evidencias experimentales que estas sustancias son producidas por bacterias asociadas que conviven con estos organismos marinos, como son los ejemplos de la lupinacidina-A y la galvaquinona-B.

Hechos estructurales

Las antraquinonas naturales generalmente presentan las siguientes características estructurales:

- a. Tienen grupos OH en C-4 y C-5.
- b. Generalmente contienen un grupo metilo, hidroximetileno o carboxilo sobre el carbono 2.
- c. Las antraquinonas originadas por la vía de la malonilcoenzima-A generalmente contienen un grupo OH u OMe en los carbonos C-5 y C-7. Las originadas por la vía del ácido shikímico tienen sustituyente oxigenado en C-5.
- d. Los carbohidratos ligados son principalmente glucosa, ramnosa y rutinosa.
- e. Los O-glicósidos tienen los carbohidratos ligados a través de C-5 o C-7.

Métodos de extracción y aislamiento

Los procedimientos para el aislamiento de estas sustancias dependen del tipo de núcleo de interés, es decir si se desea obtener las agliconas, los glicósidos, las formas reducidas, las formas oxidadas, etc. Para aislar efectivamente las agliconas, la muestra vegetal se extrae con solventes poco polares como acetato de etilo. Los compuestos glicosídicos se extraen ya sea con etanol, agua o mezclas de etanol-agua. Cuando se desee extraer las formas reducidas, debe tenerse precaución especial, ya que la sola presencia del oxígeno del aire produce la oxidación, en este sentido es aconsejable trabajar en atmósferas inertes como, por ejemplo, una atmósfera de nitrógeno. El proceso de oxidación es también bastante rápido en soluciones alcalinas, y en estas condiciones se forman diantronas, poliantronas y por supuesto antraquinonas.

En cuanto se refiere al método de extracción, el uso de ultrasonido y microondas, son los de mejores resultados en cuanto a tiempos de extracción, facilidad de uso, y efectos contra el medio ambiente.

Luego de la extracción, los glicósidos deben concentrarse bajo presión reducida para obtener los cristales crudos. Estos cristales pueden purificarse por recristalizaciones sucesivas en mezclas acetona-agua. Los O-glicósidos se hidrolizan fácilmente al calentarlos con ácido acético o clorhídrico alcohólico diluido (por ejemplo, al 5%). La hidrólisis ocurre en una hora calentando a 70°C. Luego de la hidrólisis se añade una mezcla 1:1 de acetato de etilo-etanol, y se diluye con HCl al 0.5% acuoso. La capa orgánica que contiene las agliconas, se separa. Las agliconas obtenidas ya sea por hidrólisis o por extracción directa de la planta, pueden purificarse por extracción de la fase acetato de etilo con un álcali diluido, seguido de precipitación con un ácido (las agliconas con grupos -COOH libres pueden extraerse desde la fase acetato de etilo haciendo una primera extracción con una solución de bicarbonato de sodio, y una segunda extracción con solución de KOH o NaOH, para remover las sustancias menos ácidas). Este precipitado crudo se cristaliza desde acetato de etilo o alcohol.

La cromatografía en capa fina con sílica gel G y varios eluentes, ha sido una técnica muy útil especialmente en la valoración de drogas vegetales con compuestos antraquinónicos, tanto en su variante normal, como de alta resolución. Se cuenta con excelentes referencias de sistemas cromatográficos a utilizar para el caso de las drogas vegetales más usadas, siendo las cromatoplasmas de sílica gel y el eluyente acetato de etilo/metanol/agua 100/13.5/10, el más utilizado.

Cuando se desea aislar las antraquinonas, la mejor técnica es la cromatografía en contracorriente con fases móviles como diferentes mezclas de hexano/acetato de etilo/alcohol/agua, combinando también esta técnica con HPLC en fase reversa con detectores como el de arreglo de diodos DAD, o con espectrómetros de masas. Aunque también se ha reportado el uso de otras técnicas como la electroforesis capilar, con buenos resultados.

Las antraquinonas se pueden detectar sobre las placas cromatográficas por sus colores visibles y bajo luz Ultravioleta. Al rociar las placas con KOH al 10% metanólico, los colores amarillos y pardos originales cambian a rojos, violetas, verdes o púrpuras. El reactivo de Borntrager, es muy útil para reconocer las antraquinonas hidroxiladas, y consiste en una solución de NaOH/KOH al 5% en metanol, que produce manchas de colores que varían entre el naranja, hasta el rojo y el púrpura. Los valores R_f de algunas antraquinonas naturales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores Rf y máximos de absorción de algunas antraquinonas (eluyente: acetato de etilo-metanol-agua 100:13.5:10).

ANTRAQUINONA	RfX100	MAXIMOS DE ABSORCION (nm)
Emodina	95	223, 254, 267, 290, 440
Crisofanol	-	225, 258, 279, 288, 432
Fisci6n	-	226, 255, 267, 288, 440
Alo6-emodina	-	225, 258, 279, 289, 430
Re6na	15-25	230, 260, 432
6cido em6dico	-	227, 252, 274, 290, 444

Valoraci6n de antraquinonas y compuestos relacionados

Existen m6todos fisico-qu6micos y biol6gicos para la valoraci6n cuantitativa de compuestos antrac6nicos naturales, especialmente para drogas que los contengan.

La muestra vegetal seca y pulverizada se extrae exhaustivamente con agua o una mezcla etanol-agua. El filtrado se lava con un solvente org6nico apolar e inmiscible con el solvente de extracci6n. La fase org6nica se desecha si no se van a cuantificar las agliconas. La fase acuosa o acuo-etan6lica se somete a los siguientes tratamientos por reflujo:

- Con cloruro f6rrico en medio 6cido
- Con un 6cido mineral

El tratamiento con el cloruro f6rrico en medio 6cido tiene como fin romper las uniones C-glic6sido y ayudar a la oxidaci6n de las formas reducidas hasta antraquinonas. El tratamiento con un 6cido mineral es con el fin de hidrolizar todos los glic6sidos, y dejar libres las agliconas.

Luego de estos tratamientos, se recuperan las agliconas por extracci6n con un solvente org6nico como el acetato de etilo. La fase acetato de etilo se separa y se elimina el solvente por evaporaci6n bajo presi6n reducida. Las agliconas se redisuelven en una soluci6n est6ndar de KOH o NaOH, y se lee colorim6tricamente a 500 nm contra una curva patr6n.

Cuando se desea hacer una cuantificaci6n aproximada del contenido de antraquinonas en muestras vegetales se utiliza la espectroscopia ultravioleta.

Ensayo de Bornträger

Las antraquinonas y sus formas reducidas pueden reconocerse en muestras vegetales a través del denominado Ensayo de Bornträger.

En este ensayo, una porción del material vegetal se pone en ebullición con una solución de KOH acuoso diluido, durante varios minutos. Este tratamiento no solo hidroliza los glicósidos antracénicos, sino que también oxida las antronas y antranoles hasta antraquinonas. La solución alcalina se deja enfriar, se acidifica y se extrae con acetato de etilo. Cuando la fase orgánica se separa y se pone en contacto con una solución acuosa diluida de un álcali, la fase orgánica pierde su color amarillo, y la fase acuosa se torna de color rojo si la muestra contiene antraquinonas. El ensayo no es específico para las antraquinonas ya que las naftoquinonas también dan coloraciones rojas. Si la muestra contiene antraquinonas parcialmente reducidas, la solución original no se torna roja inmediatamente después de hacerla alcalina, pero se torna de color amarillo con una fluorescencia verdosa, y poco a poco se va tornando roja, a medida que ocurra la oxidación. Si se desea, la oxidación puede acelerarse añadiendo un poco de peróxido de hidrógeno al 3% acuoso. La reacción colorimétrica puede utilizarse también como base para la valoración cuantitativa de estas sustancias en diferentes muestras. Es posible también reconocer con la ayuda de un espectrofotómetro ultravioleta si la muestra contiene formas reducidas u oxidadas, ya que las primeras absorben alrededor de 360 nm, mientras las segundas absorben alrededor de 440 nm. Por otro lado, las 1,4-dihidroxiantraquinonas pueden reconocerse porque al disolverlas en solución de ácido acético presentan fluorescencia.

Ensayo con Acetato de Magnesio alcohólico

Al tratar las soluciones que contienen antraquinonas puras con una solución de acetato de magnesio en alcohol, se producen coloraciones características dependiendo del patrón de hidroxilación de la sustancia. Las quinonas *meta*-dihidroxiladas producen color amarillo naranja, las *para*-hidroxiladas color púrpura, y las *orto*-hidroxiladas producen coloraciones violetas.

Ensayo de reducción moderada

Las antraquinonas se reducen fácilmente en presencia de un metal y un ácido mineral, perdiendo su coloración original; pero al dejar expuesto al aire el producto de reducción, este se oxida por el oxígeno del aire y reaparece la coloración original.

Espectroscopia Ultravioleta

Las antraquinonas en general presentan en solución etanólica hasta cuatro bandas de absorción entre 220 y 290 nm ($\epsilon=9000-3000$), otra entre 300 y 350 nm ($\epsilon=3000-6000$), y

otra entre 400 y 500 nm ($\epsilon=2000-9000$). La Tabla 1 muestra los máximos de absorción en el Ultravioleta de varias antraquinonas conocidas.

La presencia de grupos hidroxilos en posiciones 1, 4, 5 y 8 del núcleo antraquinónico (también denominados grupos hidroxilos *peri*), puede detectarse en el espectro UV, ya que al añadir cloruro de aluminio en solución etanólica a la solución alcohólica de la antraquinona, se observa un notable desplazamiento bato crómico del espectro, el cual se mantiene aún después de añadir un ácido mineral. El desplazamiento bato crómico es debido a la formación de un quelato estable tal como se ilustra en la Figura 2.23.

Espectroscopia Infrarrojo

El espectro infrarrojo de las antraquinonas muestra bandas de absorción en 1695-1650 y 1640-1595 cm^{-1} , debidas al grupo dicarbonilo α,β -insaturado. En el caso de los grupos carbonilos vecinos a hidroxilos *peri* (en 1, 4, 5 u 8), estos absorben alrededor de 1630 cm^{-1} , mientras los grupos carbonilos no vecinos a hidroxilos *peri* absorben alrededor de 1660 cm^{-1} .

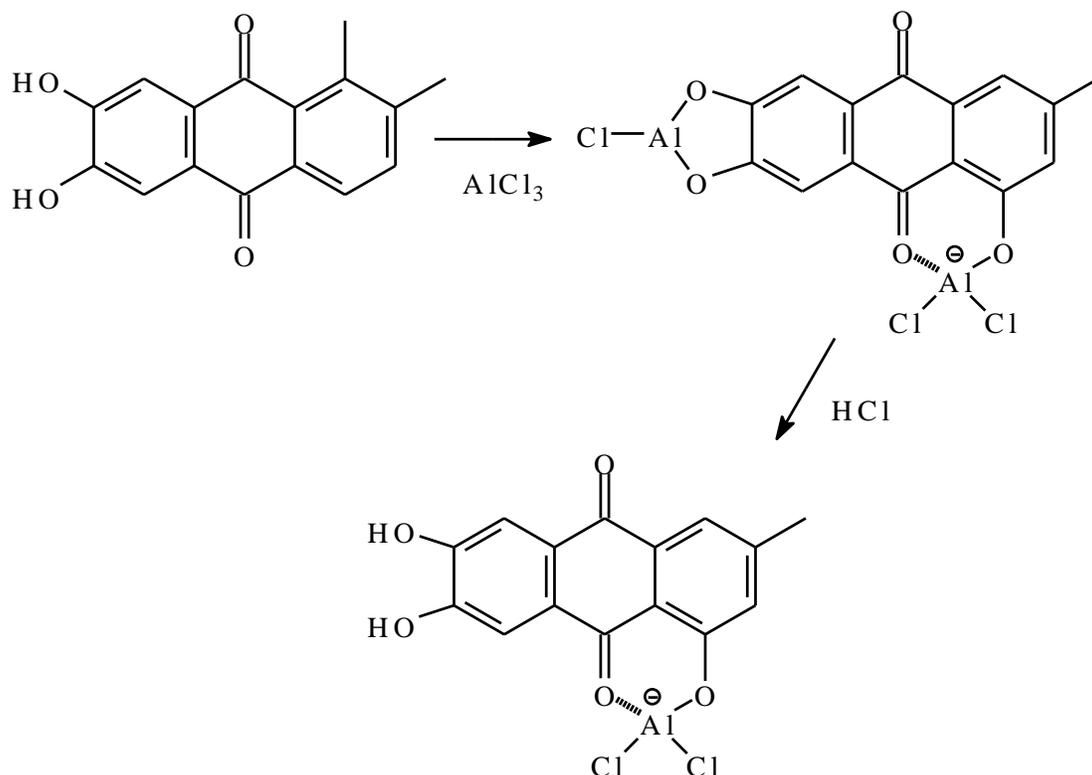
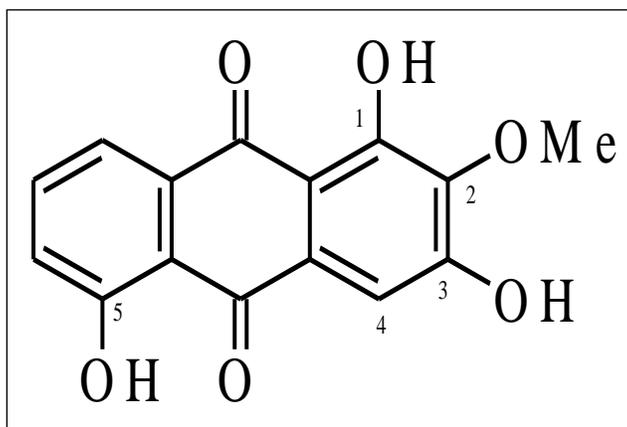


Figura 2.23. Formación de quelatos con cloruro de aluminio, de grupos hidroxilo *peri* y *orto*-dihroxilos de antraquinonas. Nótese como el quelato con los hidroxilos *orto* es inestable al agregar el ácido.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

En el espectro de resonancia magnética protónica de las antraquinonas libres, se observan las señales características de protones aromáticos (6-8 ppm), alifáticos (MeO-Ar 3.8-4.1 ppm; Me-Ar 2.2-2.5 ppm, etc.) y de grupos Ar-CH₂-OH, Ar-COOH y Ar-CHO. Además, y en una forma similar a lo que ocurre en el espectro UV con cloruro de aluminio, los protones de los grupos hidroxilos en posiciones 1, 4, 5 y 8 (grupos hidroxilo *peri*), algunas veces se observan como singletes en la región de 12 a 14 ppm, debido al efecto desprotector de los carbonilos.

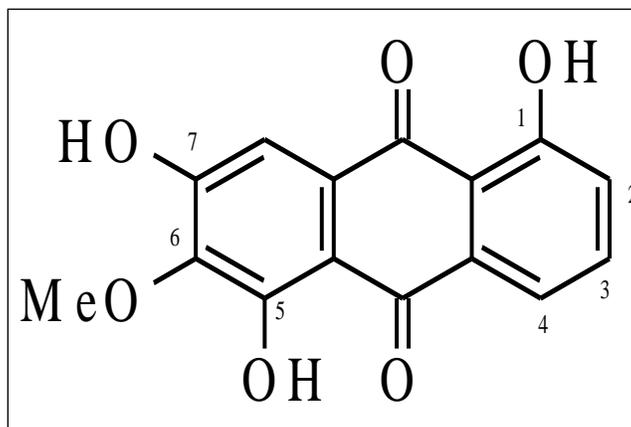
Aquí es importante mencionar que para los protones hidroxílicos no siempre se observan sus señales en el espectro RMN. El desplazamiento químico de estos protones hidroxílicos permite reconocer la distribución en la molécula de otros sustituyentes tales como metoxilos y metilos, de acuerdo con sus efectos los cuales pueden predecirse con las reglas empíricas de Schripsema y Dagnino. Por ejemplo, para la antraquinona:



Para calcular el δ del hidroxilo-1:

Valor base: 13.14 (Tabla 2 del artículo de Schripsema-Dagnino, 1996; para antraquinonas 1,3-dihidroxi-2-metoxiladas) + 0.13 (Tabla 1 del mismo artículo, para cuando existe un OH en 5), entonces el valor calculado para el OH en 1 es δ 13.27

Y para calcular el δ del hidroxilo-5, simplemente se gira la molécula a:



De esta manera el OH en 5 se convierte en el OH en 1, y aplicando los valores de las tablas 1 y 2 del artículo de Schripsema-Dagnino para antraquinonas 1-hidroxiladas, pero sin sustituyentes en 2, ni en 3 ni en 4:

Valor base: 12.69

+5-OH: 0.13

+6-OMe: 0.13

+7-OH: -0.09

Y el δ calculado para el OH-5 es 12.86 ppm.

En el espectro de RMN-¹³C se aprecian las señales de los carbonilos quinoides alrededor de 180 ppm (C=O no quelatados) y 185 ppm (C=O quelatados).

Los carbonos de metilos ligados a C aromáticos resuenan alrededor de 15-25 ppm, los de metoxilos se observan alrededor de 55-65 ppm, los carbonos aromáticos protonados alrededor de 100-135, los carbonos aromáticos hidroxilados y metoxilados alrededor de 140-165 ppm.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas de impacto electrónico de las agliconas antraquinónicas muestran un ion molecular intenso. Además, se observan las pérdidas de una o dos moléculas de monóxido de carbono (M-CO, M-2CO) acompañadas de la pérdida de un hidrógeno (M-COH, M-2CO-H). En el caso de los espectros de masas ESI, por ejemplo, la alizarina (1,2-dihidroxiantraquinona), muestra fragmentos similares, pero a partir del ión cuasimolecular m/z 241, es decir se observan m/z 213 (M - CO) y m/z 185 (M - 2CO).

Los espectros de masas FAB además de proporcionar el peso molecular, permiten reconocer también los carbohidratos ligados. También se utilizan los espectros de masas de ionización

química (CIMS). Los espectros de masas ESI muestran iones cuasimoleculares como $M-H^+$, $M-H^+$ y $M+Na^+$.

Actividad biológica

Las antraquinonas se destacan por sus notables actividades biológicas: anticancerígena, antiinflamatoria, diurética, antiartrítica, antifúngica, antibacteriana y antipalúdica. Estas sustancias también tienen aplicaciones en química analítica y procesos industriales para la producción de celulosa. Se pueden usar como colorantes, agroquímicos y prototipos para el desarrollo de nuevas moléculas con actividades biológicas. Las drogas vegetales que contienen antraquinonas poseen según la dosis acciones usos terapéuticos aceptados como colagogos, laxantes o purgantes.

Las 4,5-dihidroxi-antraquinonas son los principios activos de drogas laxantes como el sen, el ruibarbo, la cáscara sagrada y la penca sábila.

Los compuestos antracénicos más activos son los O-glicósidos de diantronas y antraquinonas, y los C-glicósidos de antronas con el grupo metileno C-10 libre. Para la acción catártica se requiere que la antraquinona posea dos grupos hidroxilos en C-1 y C-8, un grupo metilo, hidroximetileno o carboxilo en C-3, y un grupo hidroxilo o metoxilo en C-6.

Las geninas antracénicas se absorben en el intestino grueso a nivel del colon con efectos irritantes e indeseables, mientras que los glicósidos por ser más polares se absorben menos. Una vez que traspasan la pared intestinal estas sustancias excitan las terminaciones nerviosas locales del Sistema nervioso autónomo, induciendo una acción neuroperistáltica.

Sin embargo, se han hecho estudios más recientes, y se tiene evidencia de actividades hepatoprotectoras para fisción, aloé-emodina, xanthorina, crisofanol, etc.; anticancerígena para nordamnacanthal, alizarina-1-metiléter, rubiadina, soranjidiol, morindone, etc.; antimicrobiana y antimicótica; antivirales como el crisofanol y aloé-emodina; propiedades antidiabéticas para crisofanol y emodina; y propiedades antioxidantes para emodina, fisción, rheina y como fotosensibilizantes. También es importante mencionar que se están obteniendo mediante síntesis química, algunos compuestos híbridos que contienen una antraquinona y una chalcona, con actividad contra leucemia.

Algunas drogas vegetales que contienen antraquinonas y compuestos relacionados

Sen

Comercialmente se conocen el "Sen de Alejandría", el cual corresponde a la especie *Cassia senna* (Leguminosae); el "Sen de Tinnevely o de la India" el cual corresponde a *Cassia angustifolia* (Leguminosae); y otras especies como *C. acutifolia* y *C. obovata*.

La droga la constituyen las hojas y frutos secos.

El país de origen parece ser Arabia, y los principales productores son Sudán, India, Pakistán y Egipto.

La droga muchas veces es falsificada o adulterada con otras especies de *Cassia*.

Los componentes de las hojas son glicósidos antraquinónicos, glicósidos de antronas, 2.5 a 5% de senósidos A, B, C y D. Además, aloé-emodina, reína y 2-naftalénglicósidos, y más recientemente se han reportado las sustancias volátiles presentes. La farmacopea europea Vol I. especifica que la droga debe contener no menos de un 2.5% de componentes antracénicos, calculados como senósido B.

De los frutos existen dos drogas comerciales: El "sen de Alejandría" debe contener no menos de 3.6% de compuestos antracénicos, según la farmacopea europea el "sen de Tinnevelly" debe contener no menos de 2.5% de componentes antacénicos calculados como senósido B. Los componentes principales son los glicósidos diantrónicos Senósidos A/B, aunque también están presentes los senósidos C y D; mono- y diglicósidos de reína y emodina.

Estas drogas se utilizan como laxantes y purgantes, en forma de tisanas, polvos, extractos, sales cálcicas de los senósidos A y B cristalizadas, etc. Sin embargo, se ha reportado que el uso prolongado de esta droga conlleva a arritmia cardiaca. En el caso de mujeres embarazadas, existen evidencias experimentales del uso seguro de esta droga para casos de constipación.

La acción laxante de las 1,8-dihidroxiantraquinonas presentes en el sen depende del número de moléculas de azúcar ligadas, siendo las agliconas prácticamente inactivas.

Es importante anotar que esta droga (y otras como *Rheum*, *Aloe* y *Andira*) presenta genotoxicidad y carcinogenicidad potencial por lo cual se usa con restricciones en Alemania.

Actualmente se cuenta también con técnicas como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), para verificar la autenticidad de esta droga.

Frángula (o Arraclán)

Esta droga la constituye la corteza desecada de *Rhamnus frangula*, Rhamnaceae, una planta de origen europeo, y cuyos principales productores son la región balcánica y Rusia.

La falsificación más común de esta droga se hace con espino cerval *Rhamnus catartica*.

La droga contiene 5-10% de O-glicósidos de antraquinonas como los glucofrangulósidos A y B, los frangulósidos (o frangulinas) A y B, emodin-diantrona, palmidina-C, palmidina-C-monoramnósido, emodín-diantrona-monoramnósido, y emodín-8-O-β-gentiobiósido.

Esta droga se usa ampliamente en Europa como laxante en forma de tisanas, formas galénicas, y para la extracción de las frangulinas y glucofrangulinas. Sin embargo, se reportan evidencias de genotoxicidad, por lo cual los autores recomiendan su uso laxante con precaución.

Cáscara sagrada

La droga la constituye la corteza desecada de *Rhamnus purshiana*, Ramnáceas. Es una planta originaria de América, y cuyos principales productores son Oeste de Canadá y Estados Unidos, y Kenia.

Normalmente, esta droga es falsificada con otras especies como *R. alnifolia*, *R. crocea*, *R. californica*, *R. fallax*, etc.

La droga contiene 6-9% de derivados antracénicos (tanto O- como C-glicósidos), de los cuales los principales son los cascarósidos A, B, C y D; barbaloina, crisaloína, emodín-oxantrona, aloé-emodina, crisofanol, emodina; y las palmidinas A, B y C.

Esta droga es utilizada especialmente en países anglosajones como laxante en forma de tisanas, formas galénicas, extractos titulados de cascarósidos (elíxires), extracto seco en comprimidos. También es usada en veterinaria. El estudio del contenido de antraquinonas en varias especies del género *Rhamnus*, muestra que además de sus propiedades antioxidantes, tienen propiedades antimicrobianas; y que especies como *R. alaternus* y *R. fallax*, presentan altos contenidos de crisofanol, fisción y emodina.

Ruibarbo

La droga la constituyen las raíces desecadas de *Rheum palmatum*, Polygonáceas. Es una planta originaria de la China y producida principalmente en Asia.

La droga es falsificada con otras especies como *R. rhaponticum*, *R. officinale*, *R. emodi*, *R. webbianum*, *R. coreanum*.

La composición de la droga es bastante compleja e incluye antraquinonas sin grupo carboxilo (crisofanol, aloé-emodina, emodina y fisción) y sus heterósidos (p. ej. crisofaneína y glucoaloé-emodina), antraquinonas con un grupo carboxilo (reína y glucoreína), antronas o diantronas de crisofanol, emodina, aloé-emodina y fisción, glucósidos de reína (Senósidos A y B) y sus oxalatos (Senósidos E y F), heterodiantronas: palmidinas A y B, crisofanol-antrona, palmidina-C, reín-antrona (senidina C y senósido C), crisofanol-antrona (reidina B), fisción-antrona (reidina C) y otras sustancias como oxalato de calcio, almidón, catequinas, etc.

Esta droga se la utiliza como amargo estomáquico, purgante o laxante ocasional. También se ha reportado que el extracto acetónico presenta alguna acción contra el bitiligo. Sin embargo, se reporta que el ruibarbo crudo puede causar diarrea severa y toxicidad renal y

hepática, por lo cual en la medicina tradicional china se están usando diferentes procesos para reducir estos efectos laterales.

Hay un ensayo cualitativo para reconocer esta droga. En este, se refluja varios minutos una porción de la droga pulverizada con una solución acuosa de cloruro férrico en ácido clorhídrico. Enseguida se hace partición con un solvente orgánico. La fase orgánica se pone en contacto con una solución diluida de amoníaco, y esta toma color rosado a rojo cereza.

En el caso particular de *R. officinale*, esta droga es utilizada para el tratamiento de fiebres, infecciones, como antiinflamatorio, y contra el cáncer en China, Japón y Corea.

Penca sábila (Acíbar, Aloe)

La droga la constituye el jugo desecado de las hojas de varias especies de *Aloe* (Familia Liliáceas). Los principales productores son Sudáfrica (*Aloe capensis*, "Aloé del Cabo"), Kenia, Curazao, Aruba, Bonaire (*Aloe barbadensis*).

Las falsificaciones son otras especies de *Aloe*.

Las farmacopeas describen varios tipos de Aloe ("Aloe del Cabo" y "Aloe de Curazao"), y como drogas comerciales ("Aloes de Uganda, Kenia y de la India").

Comercialmente se encuentran las drogas denominadas "Extracto de Aloe", "Aloe barbadenses", "Aloe capensis" y "Aloe perryi".

El "Extracto de aloe" contiene aloína (10-C- β -glucopiranosido de Aloé-emodin-antrona) principalmente como una mezcla de los esteroisómeros α - y β -; aloinósidos A y B (estereoisómeros de 11- α -L-ramnosilaloína); aloesinas A y B (denominadas "Aloé resina" y sin acción purgante). La aglicona es la aloé-emodina, que tiene propiedades antiagregantes de proteínas por lo que tiene potencial contra enfermedades como diabetes, y enfermedades de Huntington y Alzheimer.

La droga "Aloé barbadensis" contiene no menos de un 28% de derivados hidroxiantracénicos calculados como aloína incluyendo aloína y las aloesinas A y B.

La droga "Aloe capensis" contiene no menos de un 18% de derivados hidroxiantracénicos calculados como aloína. El "Aloe del Cabo tipo A" proviene de la especie *Aloe ferox* MILLER, y contiene aloína, aloinósidos A/B, y aloesinas A/B.

El "Aloe del Cabo tipo B" contiene solamente aloína y aloesinas A/B.

La droga "Aloe socotrina" proviene de la especie *Aloe perryi* BAKER, y contiene aprox. un 14% de derivados hidroxiantracénicos calculados como aloína. Los componentes son aloína, aloinósidos A/B y aloesinas A/B.

Estas drogas se utilizan como purgantes y son componentes de la "tintura de Benjuí compuesta" ("Bálsamo de Friari"). También se ha mencionado el uso del *Aloe* para el tratamiento de heridas, quemaduras e infecciones.

Para el reconocimiento de estas drogas además de la cromatografía en capa fina, existen los siguientes ensayos:

El aloe presenta diferentes actividades como anti cáncer, antioxidante, antimicrobiana, antialérgica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, hepatoprotectora, anti ulcera y antidiabética, sin embargo, los mecanismos por los cuales actúan sus componentes, aún se desconocen. Además, se debe tener en cuenta sus efectos tóxicos, los cuales también son tema de investigación.

Hierba de San Juan

Esta droga corresponde a *Hypericum perforatum* (Hypericaceae), contiene naftodiantronas (sin acción purgante): hipericina, isohipericina y protohipericina. Además, los flavonoides rutina e hiperósido, y ácido clorogénico. Se menciona su uso para el tratamiento de heridas, contra la depresión inclusive contra el sida. Se han reportado interacciones con medicamentos como anticonceptivos orales, y el posible desarrollo del denominado síndrome serotoninérgico.

Cochinilla hembra

El "Carmín" es un preparado comercial que contiene aprox. 50% de ácido carmínico. Este se obtiene de la hembra de la cochinilla, el insecto *Coccus cacti* (*Dactylopius coccus*), del orden de los hemípteros, originario de América Central. Los principales productores son Perú, Islas Canarias, Argelia y Honduras.

El "Carmín" es un material de color rojo que contiene 10% de ácido C-glucosilcarmínico, y el cual es falsificado o adulterado con otros materiales coloreados orgánicos e inorgánicos.

El "Carmín" se utiliza como agente colorante de sólidos y líquidos, y como indicador, aunque como colorante ha sido poco a poco reemplazado por otros colorantes sintéticos. También ha mostrado propiedades antimicrobianas y antitumorales.

La valoración de la droga se hace colorimétricamente a 530 nm y a un pH de 8.

Además del carmín se han aislado otras antraquinonas como el ácido 4-aminocarmínico de este insecto.

Naftoquinonas

Las naftoquinonas, a diferencia de las antraquinonas, han sido menos estudiadas químicamente debido a que solo se han aislado en años recientes. Los métodos utilizados

para su aislamiento, reconocimiento y caracterización son prácticamente los mismos de las antraquinonas. Al igual que las antraquinonas pueden biosintetizarse bien sea por la ruta de la malonilCoA o por la ruta del ácido shikímico conjugada con la del ácido mevalónico. Se las ha encontrado en diferentes partes vegetales (especialmente corteza de tallos y raíces) de plantas pertenecientes a las familias litráceas, bignoniáceas, melastomatáceas, boragináceas, droseráceas, juglandáceas, plumbagináceas, poligonáceas, ebenáceas, etc. En esta última familia se las encuentra en forma dimérica.

Por otro lado, las características espectrales de las naftoquinonas son similares a las de las antraquinonas, aunque a diferencia de estas pueden observarse acoplamiento alílicos entre protones de un carbono ligado al carbono 2, y el protón ligado al carbono 3 (y viceversa), con constantes de acoplamiento de 1.5 a 3 Hz en el espectro RMN-¹H. En el espectro de masas de impacto electrónico también se observan fragmentos debidos a pérdidas de una o dos moléculas de CO, entre otros. Se han reportado procedimientos para la síntesis del núcleo naftoquinona. Varias de estas sustancias presentan actividad biológica, entre otras algunas tienen actividad antimalárica, antipsoriática, antitumoral y contra la lepra. En particular se han preparado diferentes derivados con actividad potencial contra glioblastomas.

Problemas

1. De las raíces de *Cassia singueana*, fabáceas; se aisló por métodos cromatográficos una sustancia denominada islandicina que presenta las siguientes características espectrales:

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 13.51 (s, 1H), 12.35 (s, 1H), 12.30 (s, 1H), 7.91 (dd, J = 1.2, 8.0, 1H), 7.73 (t, J = 8.0, 1H), 7.33 (dd, J = 1.2, 8.0, 1H), 7.18 (s, 1H), 2.40 (s, 3H).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 190.4, 186.3, 162.5, 157.8, 157.7, 141.8, 136.6, 129.0, 124.5, 119.3, 116.5, 111.6, 110.8, 110.6, 16.5.

Determine la estructura más probable para esta sustancia y compare los datos RMN con los calculados con el software en línea nmrdb.org

2. De las raíces de *Cassia singueana*, fabáceas; se aisló por métodos cromatográficos una sustancia denominada xanthorina que presenta las siguientes características espectrales:

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 13.61 (s, 1H), 12.83 (s, 1H), 12.32 (s, 1H), 7.71 (bs, 1H), 7.12 (bs, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.03 (s, 3H), 2.50 (s, 3H).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 187.4, 186.1, 162.6, 160.2, 157.0, 149.7, 147.1, 132.1, 124.6, 118.8, 113.5, 111.8, 106.3, 104.9, 56.1, 21.1.

Determine la estructura más probable para esta sustancia. Calcule los desplazamientos químicos de las señales de los protones de los hidroxilos peri, utilizando las reglas de Schripsema-Danigno. Compare los datos RMN con los calculados con el software en línea nmrdb.org

3. De *Streptocarpus dunni*, familia gesneriáceas; se aisló por métodos cromatográficos una sustancia que cristaliza en agujas amarillas de P.F. 183-4°C y con las siguientes características espectrales:

UV (MeOH): 226(4.24), 247(4.40), 254(4.42), 279(4.02), 325(3.43), 408(3.74) nm

IR (KBr): 1660, 1625, 1580 cm⁻¹, etc.

RMN-¹H: 2.37δ (s, 3H), 7.51 (d, J = 8Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.73-7.86 (m, 2H), 8.20-8.35 (m, 2H), 12.93 (s, 1H).

%C = 75.4 %H = 4.1

EMIE: M⁺ = 238

Determine la estructura más probable para esta sustancia, emule el espectro RMN y compare con los datos experimentales, describa su biogénesis a partir de AcetilCoA, y asígnele el correspondiente nombre sistemático.

4. De las raíces de *Abrus cantoniensis*, familia leguminosas; se aisló por métodos cromatográficos una sustancia cristalina amarilla de P.F. 194-6°C, con las siguientes características:

%C = 70 %H = 4

UV (MeOH): 226(4.61), 257(4.38), 279(4.04), 289(4.07), 433(3.93)

IR (KBr): 1680, 1631 cm^{-1} , etc.

RMN-¹H (CDCl₃): 2.45 δ (s, 3H), 7.1 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.2-8.1 (m, 3H), 12.25 (s, 1H), 12.35 (s, 1H).

EMIE: m/z: 254 (M⁺, 100%)

Determine la estructura más probable para esta sustancia, emule y compare los datos experimentales RMN, y asígnele el correspondiente nombre sistemático. Describa la biogénesis de esta sustancia a partir del precursor básico correspondiente.

5. Del extracto acetónico de las raíces de *Polygonum cuspidatum*, familia poligonáceas; se aisló mediante métodos cromatográficos una sustancia que cristaliza en agujas amarillas desde metanol con P.F. 299-302°C. Esta sustancia produce una coloración amarillo-naranja al tratarla con acetato de magnesio en solución, y posee las siguientes características espectrales:

UV (EtOH): 204 (4.26), 224 (4.49), 250.5 (4.10), 269 (h, 4.16), 286.5 (4.29), 422 (3.86), 443 (3.86) nm.

IR (Nujol): 1670, 1635, 1605, 1570 cm^{-1} , etc.

RMN-¹H (CDCl₃ + DMSO-d₆): 2.42 δ (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 6.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2 Hz, 1H), 13.31 (s, 1H).

EMIE: M⁺ = 284

Determine la estructura más probable para esta sustancia y asígnele el correspondiente nombre sistemático. Describa su biogénesis a partir del precursor básico correspondiente.

6. Del extracto acetónico de la corteza de la raíz de *Ventilago calyculata*, ramnáceas; se aisló una sustancia cristalina amarilla de P.F. 252°C, la cual posee además las siguientes características:

UV (MeOH): 230(4.48), 257(4.32), 295(4.01), 440(4.02) nm

IR (CHCl₃): 1635, 1685, 3500 cm⁻¹, etc.

RMN-¹H: 2.43δ (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 6.70 (s, 1H), 7.04 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2 Hz, 1H), 12.05 (s, 1H), 12.95 (s, 1H).

EMIE: m/z (%IR): 314.0787 (100), 299 (79), 297 (62), 296 (52), 286 (58), 285 (82), 284 (46), 271 (67), 269 (50), 258 (21), 230 (48).

Determine la estructura más probable para esta sustancia.

7. Las raíces secas de *Polygonum cuspidatum* ("kojo-kon" o "Hadori-kon"), familia poligonáceas, han sido utilizadas para el tratamiento de la dermatitis supurativa, gonorrea, pie de atleta e hiperlipidemia en la medicina tradicional china y japonesa. Del extracto acetónico de esta droga se aislaron por métodos cromatográficos dos sustancias A y B. La sustancia A cristaliza en agujas amarillas desde metanol y tiene P.F. 181.5-3.5°C. Esta sustancia produce coloración roja al tratarla con amoníaco acuoso, y un color violeta oscuro al tratarla con cloruro férrico. Además, posee las siguientes características:

UV (CHCl₃): 242.5 (4.29), 290 (4.28), 427 (3.87) nm

IR (Nujol): 1700, 1680, 1625, 1595 cm⁻¹, etc.

RMN-¹H (CDCl₃): 2.36δ (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.13 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 12.64 (s, 1H).

EMIE m/z (% IR): 260 (100), 245, 232, 217, 43, etc.

La sustancia B corresponde al fallacínol, funde a 232-4°C, con acetato de magnesio produce coloración rojo naranja y posee las siguientes características espectrales:

UV (EtOH): 203 (4.24), 224.5 (4.49), 255 (4.20), 266.5 (4.22), 288.5 (4.19), 432.5 (4.02), 4.56 (3.97) nm

IR (Nujol): 3550, 3450, 1670, 1630, 1620, 1570, 1560 cm⁻¹, etc.

RMN-¹H (DMSO-d₆, 90 Mhz): 3.92δ (s, 3H), 4.63 (d, J = 5 Hz, 2H), 5.57 (1H, t, J = 5.0 Hz), 6.78 y 7.11 (1H c/u, d, J = 2.5 Hz), 7.26 y 7.64 (1H c/u, d, J = 2.5 Hz), 12.03 y 12.14 (1H c/u, s).

Determine la estructura más probable para estas dos sustancias.

8. Del extracto éter de petróleo de la corteza de *Tectonia grandis*, verbenáceas; se aisló un sólido amarillo cristalino que posee las siguientes características espectrales:

UV (EtOH): 215, 248 (h), 270, 298, 400 nm

IR (CCl₄): 2860-2820, 1660, 1340, 1320, 1230 cm⁻¹, etc.

RMN-¹H (400 Mhz, CDCl₃): 2.19δ (d, J = 1.5 Hz, 3H), 4.06 (s, 3H), 4.08 (s, 3H), 6.80 (c, J = 1.5 Hz, 1H), 7.73 (t, J = 7 Hz, 1H), 7.76 (t, J = 7 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 1 y 7 Hz, 1H), 8.40 (dd, J = 1 y 7 Hz, 1H).

EMIE m/z (% IR): 282.0890 (100), 267 (20), 254 (60), 253 (44), 239 (24), 211 (12), 210 (13), 57 (98), etc.

Determine la estructura más probable para esta sustancia.

9. Determine la estructura más probable para una sustancia vegetal denominada Rhinacantina-A que posee las siguientes características:

Agujas de color naranja P.F. 186.5-7 °C

[α]_D: -12.9° (CHCl₃, c = 0.25)

Análisis elemental: %C = 69.5 %H = 5.5

UV (MeOH): 245.5 (h, 4.59), 250.4 (4.83), 280.8 (4.35), 332.1 (3.70)

IR (KBr): 3550, 1670, 1655, 1620, 1600 cm⁻¹, etc.

EMIE m/z (% IR): 258 (100), 243 (18), 240 (11), 225 (29), 200 (14), 197 (18), 189 (18), 188 (29), 187 (25), 172 (18), 171 (18), 160 (18), 159 (29), 115 (32), 105 (25), 104 (21), 72 (82).

RMN-¹³C: 184.35 (s), 179.42 (s), 157.73 (s), 133.93 (d), 133.08 (d), 131.97 (s), 121.01 (s), 126.36 (d), 125.96 (d), 118.17 (s), 80.48 (s), 68.29 (d), 25.73 (t), 26.48 (q), 21.76 (q).

10. Determine la estructura para una sustancia aislada de dos plantas de la familia juglandáceas con las siguientes características:

EMIE m/z (% IR): 176 (100), 148 (18), 147 (15), 121 (29), 120 (83), 92 (41), 63 (16).

RMN-¹H: 3.0-3.2δ (4H, m), 7.26 (1H, dd, J = 8.2 y 1.4 Hz), 7.55 (1H, dd, J = 7.4 y 1.4 Hz), 7.66 (1H, dd, J = 8.2 y 7.4 Hz), 12.12 (s, 1H).

11. Del extracto clorofórmico de la corteza de *Pera nitida*, familia euforbiáceas; se aisló una sustancia amarilla con las siguientes características:

P.F. 77-78°C

Ensayo con cloruro férrico: Color rojo

Ensayo con NaOH: Color violeta

Ensayo de reducción con Zn/AcOH: Desaparece el color rojo, pero reaparece por oxidación al aire.

EMIE (70 Ev): m/z (% IR): 188 (100), 189 (11.97), 190 (1.39), 170 (28), 160 (34), 131 (57), 120 (47), 92 (54), 77 (20), 63 (36).

ESPECTROS UV:

MeOH: 420 (1550), 263 (4608), 253 (4475), 208 (12675) nm

NaOH: 515 (1713), 268 (4150), 211 (13760), 204 (13800) nm

NaOH+HCl: 420 (1520), 265 (4590), 253 (4490), 208 (11995) nm

AlCl₃: 493 (1725), 278 (4100), 272 (4215), 216 (11490) nm

AlCl₃+HCl: 493 (1725), 276 (3730), 270 (4140), 216 (9340), 211 (10500) nm

IR (KBr): 3440, 1670, 1650, 1610, 1455, 1365, 1260, 1230, 900, 840, 760 cm⁻¹.

RMN-¹H (60 Mhz, CCl₄): 2.10δ (d, 3H, J = 1.8 Hz), 6.70 (c, 1H, J = 1.8 Hz), 7.20 (dd, 1H, J = 9 y 3 Hz), 7.35-7.65 (m, 2H), 11.9 (s, 1H).

Determine la estructura más probable para esta sustancia. Emule el espectro RMN y compare con los datos experimentales.

12. De los extractos diclorometano y n-butanol de las raíces de *Galium sinaicum* (rubiáceas) se aislaron sustancias citotóxicas con las siguientes características:

a) P.F.: 177-180°C

UV (MeOH): 206, 286, 306h, 380h.

IR (KBr): 3450, 2925, 1662, 1630, 1580, 1517, 1460, 1320, 1240, 1220, 1180, 1105, 1060, 982, 880, 772, 620 cm⁻¹.

EMIE: 300 (100), 281 (12), 257 (13), 229 (19), 212 (5), 186 (18), 155 (7), 136 (14), 109 (5), 91 (12), 69 (19).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 3.98 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 6.55 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 7.17 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 7.59 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 12.95 (s, 1H).

RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): 56.1 (dos carbonos), 105.2, 107.3, 111.3, 108.2, 108.3, 127.8, 127.5, 134.8, 153.3, 153.6, 164.7, 166.9, 181.2, 184.5 ppm.

b) P.F.: 270-3°C

UV (MeOH): 205, 288, 328, 400 nm

IR (KBr): 3425, 2920, 2310, 1660, 1630, 1595, 1517, 1450, 1320, 1220, 1160, 1117, 1060, 1000, 895, 817, 760, 605 cm^{-1} .

EM-FAB: m/z 301 (M+H, 30%), 300 (6), 243 (6), 223 (31), 207 (30), 185 (48), 153 (10), 131 (32), 115 (100).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 2.06 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 7.18 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 13.28 (s, 1H).

RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): 8.0, 55.9, 107.3, 108.5 (dos carbonos), 112.6, 116.7, 125.9, 128.0, 131.8, 152.7, 162.1 (dos carbonos), 162.5, 181.2, 185.6 ppm.

c) P.F.: 237-9°C

UV (MeOH): 216, 284, 406 nm.

IR (KBr): 3400, 2945, 1660, 1627, 1588, 1495, 1465, 1430, 1365, 1315, 1297, 1275, 1235, 1200, 1130, 1100, 1070, 1025, 1002, 917, 860, 740, 620 cm^{-1} .

EM-FAB: 331 (M+H, 78%), 330 (22), 315 (100), 299 (65), 285 (33), 264 (28), 235 (18), 223 (43), 205 (31), 193 (24), 181 (15), 164 (22), 151 (56), 137 (55), 115 (79).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 3.80 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.62 (s, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.64 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.82 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 12.94 (s, 1H).

RMN-¹³C/DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): 56.1c, 57.3t, 60.5c, 105.8d, 114.2s, 118.2d, 121.0s, 124.7s, 132.6s, 133.2d, 136.7s, 147.8s, 148.3s, 152.4s, 157.8s, 180.3s, 187.4s.

d) P.F.: 244-6°C

UV (MeOH): 209, 245h, 284 nm

IR (KBr): 3370, 2925, 1700, 1664, 1592, 1560, 1498, 1381, 1342, 1283, 1140, 1085, 983, 880, 800, 720 cm^{-1} .

EMIE: 328 (47), 310 (34), 281 (28), 252 (13), 214 (25), 181 (42), 152 (12), 123 (56), 91 (32), 69 (100).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 3.81 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 7.55 (s, 1H), 8.13 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.27 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.59 (s, 1H).

RMN-¹³C/DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): 56.5c, 61.0c, 106.3d, 121.0s, 126.2d, 126.7s, 127.5d, 134.0d, 134.3s (dos carbonos), 139.0s, 147.0s, 148.2s, 152.8s, 167.0s, 181.0s, 181.7s.

Determine las estructuras más probables para estas sustancias. Emule los espectros RMN y compárelos con los datos experimentales.

13. De las raíces de *Morinda elliptica* se aisló una sustancia con las siguientes características:

Cristales de color naranja, PF 183-185°C (CHCl₃)

UV (EtOH): 229, 278, 331, 407 nm

UV (EtOH+NaOH): 229, 280, 308, 531 nm

IR (KBr): 3448, 1696, 1676, 1638, 1592, etc.

EMIE: m/z 252 (57%), 224 (100), 196 (11), 168 (30), etc.

RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz): 13.26 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.32 (m, 1H), 8.23 (d, 1H, J=8 hz), 7.89 (1H, d, J=8 hz), 7.88 (2H, m).

RMN-¹³C (CDCl₃, 125 MHz): 164.5, 128.4, 135.4, 118.7, 127.7, 134.7, 135.3, 127.1, 188.9, 181.8, 133.3, 134.8, 117.4, 137.2, 188.0 ppm.

Determine la estructura más probable para esta sustancia vegetal.

14. De la madera de un árbol, se aisló una sustancia con las siguientes características espectrales:

UV (EtOH): 220, 230, 275, 370h, 430 nm

IR (KBr): 3200-3150, 1.670, 1630 cm⁻¹

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ13.00 (s, 1H), 8.10 (d, 10Hz, 1H), 8.00 (d, 10Hz, 1H), 7.15 (d, 10Hz, 1H), 6.80 (d, 10Hz, 1H), 4.00 y 3.80 (s, 6H), 2.40 (s, 3H)

MS m/z (rel. int.): 298 (70), 283 (85), 281 (85), 280 (60), 270 (35), 269 (20), 242 (100), 186 (90), 165 (30), 137 (15), 136 (70) y 108 (20%)

Con anhídrido acético y piridina produce un derivado acetato (PF 138-140°C), con dimetilsulfato produce un derivado metiléter (PF 122-4°C, desde éter). La oxidación crómica produce ácido 3,4-dimetoxiftálico (PF 172-73°C).

Determine la estructura más probable para esta sustancia.

15. De la madera de un árbol, se aisló una sustancia con las siguientes características espectrales:

UV (EtOH) 255, 282h, 415 nm

IR (KBr) 3210-3180, 1675 cm^{-1}

RMN- ^1H (DMSO- d_6): δ 9.90 (bs, 1H), 8.06 (d, 8 Hz, 1H), 7.58 (d, 2 Hz, 1H), 7.44 (d, 3 Hz, 1H), 7.12 (dd, 8 y 3 Hz, 1H), 7.08 (d, 3Hz, 1H), 4.03 (s, 3H) y 2.49 (s, 3H)

MS m/z (rel. int.): 268 (100), 253 (70), 251 (1.5), 250 (50), 240 (10), 239 (20), 212 (80), 156 (85), 149 (55), 112 (18), 121 (27) y 93 (10%). Con anhídrido acético y piridina produce un derivado acetato (PF 147-8°C), con dimetilsulfato produce un derivado metiléter (PF 160-3°C). La oxidación crómica produce ácido 4-hidroxiftálico (PF 203-4°C). Determine la estructura más probable para esta sustancia.

Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien les denominó como "vitamina P". El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren colores amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente. Cuando usted amigo lector está observando una rosa roja, además de disfrutar la gracia artística de su diseño, está disfrutando de su color, ese color es debido a los flavonoides; cuando se observa una fresa jugosa, una uva roja ó morada, una flor amarilla, se está observando ni más ni menos a sustancias flavonoides. Esos colores que disfruta nuestro cerebro al percibirlos son en su gran mayoría debidos a los flavonoides.

Aspectos químicos y de actividad biológica de las diferentes clases de flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida, como se muestra en la figura 2.23. Puede observarse que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$. La Figura 2.25 muestra la estructura química de uno de los flavonoides más comunes: La quercetina.

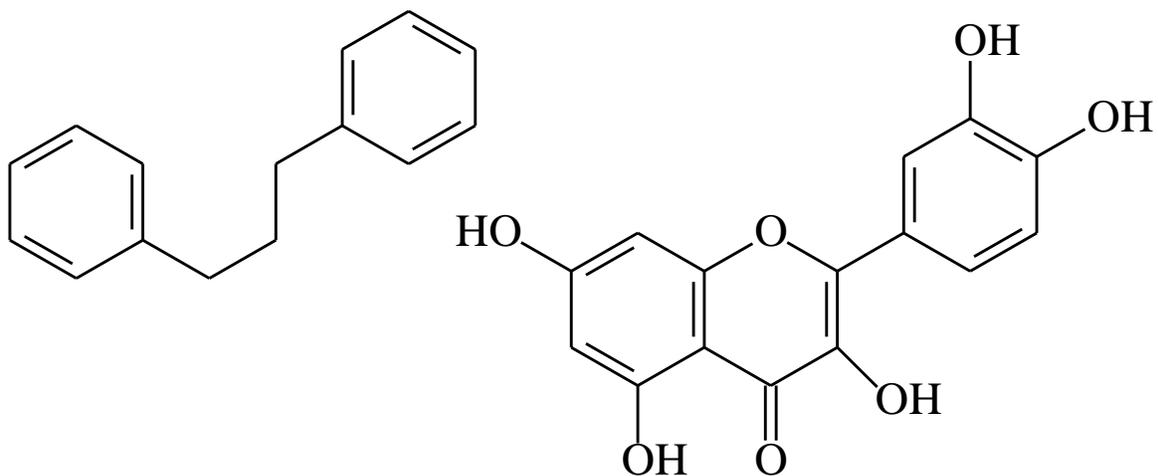


Figura 2.25. Estructura básica de los flavonoides y estructura del flavonoide quercetina a la derecha.

La Figura 2.25 muestra una de las maneras más utilizadas por los químicos para representar las moléculas de los flavonoides en dos dimensiones, sin embargo, existen otras maneras de

representarlas de manera más real, esto es en tres dimensiones como se ilustra por ejemplo en la Figura 2.26.

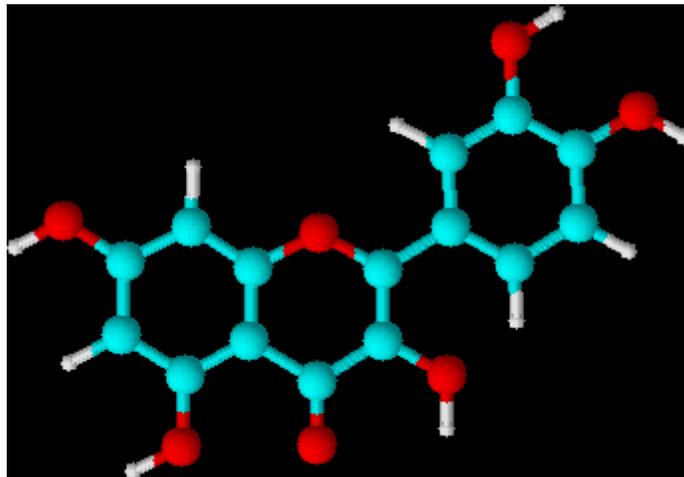


Figura 2.26. Estructura química en tres dimensiones del flavonoide quercetina. Representación en esferas: átomos de carbono de color azul, átomos de oxígeno en color rojo y átomos de hidrógeno en color blanco.

Para su estudio sistemático los más de 9000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C_3 (Figura 2.27). De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, flavolignanós, etc.

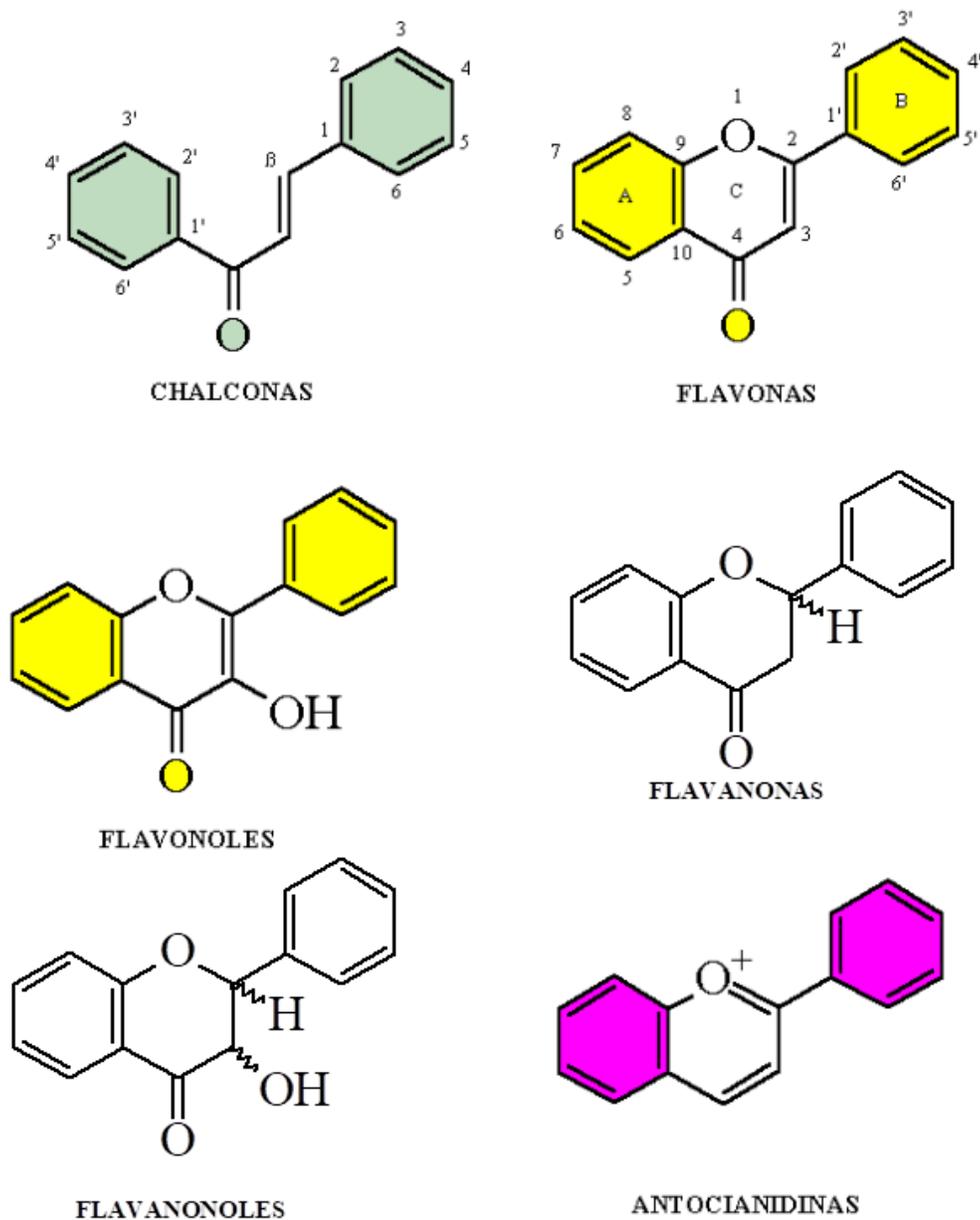


Figura 2.27. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides. El color es para enfatizar que compuestos como los flavonoles son generalmente de coloración amarilla, mientras que las antocianinas son de coloraciones rojo, violeta o azul.

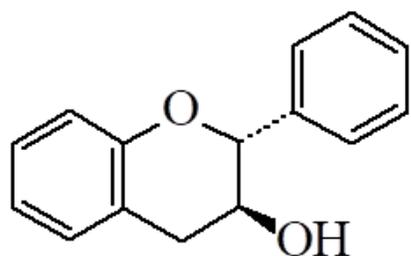
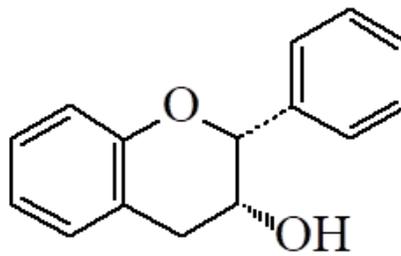
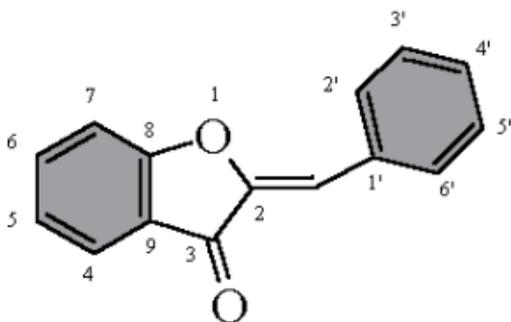
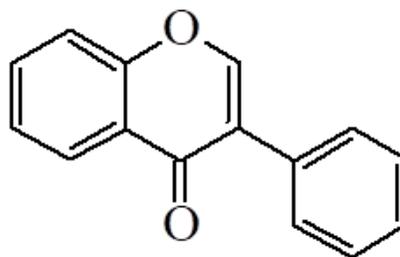
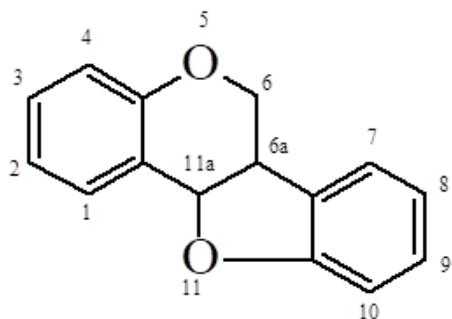
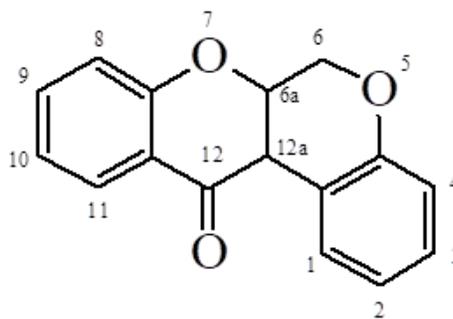
**(+)-CATEQUINAS****(-)-EPICATEQUINAS****AURONAS****ISOFLAVONAS****PTEROCARPANOS****ROTENOIDES**

Figura 2.27. (Cont.) Estructuras básicas de varias clases de flavonoides. El color es para enfatizar que los flavonoles son generalmente de coloración amarilla, mientras que las antocianinas son de coloraciones rojo, violeta o azul.

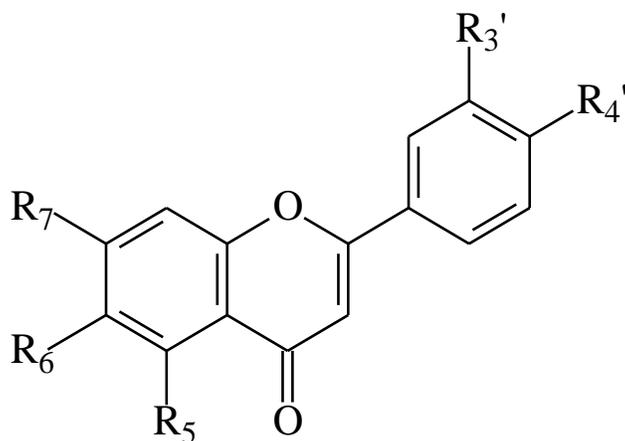
La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con la terminación INA, OL ú ÓSIDO. Estos nombres les han sido asignados por los investigadores que los han ido descubriendo uno a uno en la naturaleza. Por ejemplo, la acetina (Figura 2.26) se identificó por primera vez en una planta del género *Acacia* y se clasifica como una flavona. La quercetina es un

flavonol identificado inicialmente en una planta del género *Quercus*. La naringenina es una flavanona aislada inicialmente en la naranja. El eriodictiol es una flavanona y se aisló inicialmente en una planta del género *Eriodictyon*. Sin embargo, esta clase de nombres no es muy útil cuando se requiere información sistemática de estas sustancias, por lo cual los químicos han convenido llamarlos con nombres que representen su estructura química. Así por ejemplo la acacetina corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona; la quercetina al 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol; la naringenina a la 5,7,4'-trihidroxiflavanona, etc.

Hasta ahora hemos visto aspectos relacionados con la estructura simple de los flavonoides, sin embargo, dentro de las plantas los estudios han mostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina GLICOSIDOS, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina AGLICONAS FLAVONOIDES. Por ejemplo, los que mencionamos anteriormente (acacetina, eriodictiol, quercetina, naringenina, etc.) son agliconas flavonoides. Un ejemplo de glicósido es la vitexina que corresponde al 8-C- β -D-glucopiranosido de apigenina. En este caso una forma de nomenclatura sistemática sencilla para la vitexina es denominarla apigenina-8-C-glucósido.

Las diferentes clases de flavonoides encontradas en la naturaleza son objeto de investigación por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti-cáncer, anti diabetes, contra la enfermedad de Alzheimer, antibacterianas, etc.

La figura 2.28. muestra las estructuras de varias flavonas naturales. La flavona chrisina se encuentra en plantas como *Passiflora caerulea*, en la miel y en propóleos. Se ha reportado su acción preventiva de tumores en ensayos preclínicos y su capacidad para aumentar la potencia de los quimioterapéuticos en líneas tumorales tanto resistentes como no-resistentes. También se ha reportado su potencial uso para disminuir la generación de cataratas inducida por diabetes.



NOMBRE TRIVIAL	R _{3'}	R _{4'}	R ₅	R ₆	R ₇	Fuente
Crisina	-	-	OH	-	OH	<i>Populus</i>
Baicaleína	-	-	OH	OH	OH	<i>Scutellaria</i>
Apigenina	-	OH	OH	-	OH	<i>Petroselinum</i>
Acacetina	-	OMe	OH	-	OH	<i>Robinia</i>
Escutelarína	-	OH	OH	OH	OH	<i>Scutellaria</i>
Hispidulina	-	OMe	OH	OH	OH	<i>Ambrosia</i>
Luteolina	OH	OH	OH	-	OH	<i>Reseda</i>
Crisoeriol	OMe	OH	OH	-	OH	<i>Eriodictyon</i>
Diosmetina	OH	OMe	OH	-	OH	<i>Diosma</i>

Figura 2.28. Estructuras químicas y fuentes naturales de varias flavonas naturales.

La baicaleina (5,6,7-trihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona) se encuentra en raíces de *Scutellaria baicalensis*. Se ha utilizado en terapias como antioxidante, antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio y antialérgico. Más recientemente la baicaleina ha sido reportada de poseer actividad contra una de las formas de cáncer más prevalentes y fatales como el carcinoma hepatocelular y contra virus como el chikunguya.

La apigenina (4', 5, 7-trihidroxiflavona) se encuentra en diferentes plantas y constituye la aglicona de muchos glicósidos como apigetrina, vitexina e isovitexina. Muchas frutas y verduras son ricas en apigenina como el perejil, apio y manzanilla, en los cuales la apigenina equivale al 68% de los flavonoides totales. Se ha reportado que los efectos benéficos para la salud se deben a sus efectos antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriano, antiviral, antimicótica, cardio protectora y anti cáncer. Entre sus propiedades anti-cáncer se incluye su efecto contra células de cánceres de hígado, páncreas, colorrectal, sanguíneo, de próstata, de seno, de pulmón, de tiroides, de la piel, del cuello, de la cabeza y de los huesos. También se ha reportado que las mezclas de varios C-glicósidos relacionados con la apigenina, tienen utilidad potencial para tratar hepatomas.

La apigenina, junto con otros flavonoides como luteolina, quercetina y chrisina, son estudiados por su potencial para el mantenimiento del genoma y en quimio prevención.

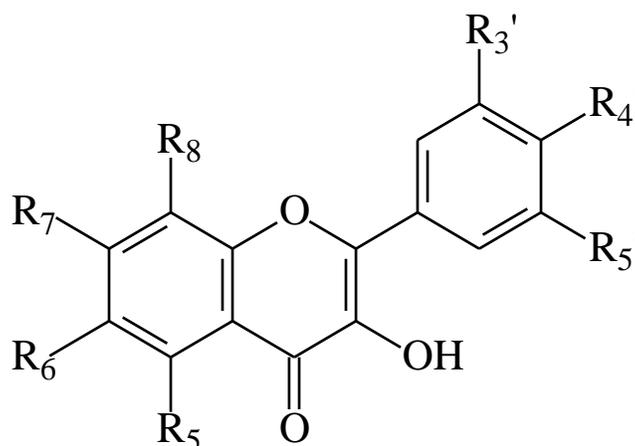
La luteolina se encuentra en plantas como apio, perejil, pimienta y orégano. Muchos estudios preclínicos han reportado que esta sustancia tiene diversas actividades biológicas que incluyen actividad antioxidante, anti-cáncer y antiinflamatoria. También se la considera con potencial para la terapia de la enfermedad de Alzheimer, con potencial para terapia de cáncer y como inhibidora de metástasis de tumores.

La hispidulina (4', 5, 7-trihidroxi-6-metoxiflavona) es una flavona natural hallada en diferentes materiales vegetales como *Saussurea involucreta* Kar. et Kir., una droga tradicional China poco conocida. También está presente en varias especies de los géneros *Artemisia* y *Salvia*. Varios estudios *in vitro* han mostrado sus propiedades potentes como antioxidante, antiinflamatoria, anti mutagénica y anti neoplásica. También se ha identificado como un ligando potente de receptores de la benzodiazepina, es capaz de penetrar la barrera hemato-encefálica y posee actividad anticonvulsivante en el sistema nervioso central. Además, se reportan propiedades anti micobacterianas, anti-asma, antimicrobianas, anti proliferativas y larvicidas. Se reporta que es cien veces más potente que la teofilina en su capacidad de inhibir la agregación plaquetaria.

La escutelarina ha sido reportada para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, fibrosis miocárdica, y ha mostrado actividad contra células de carcinoma hepático. Por esto se han preparado y evaluado derivados con potencial uso contra este tipo de cáncer.

La figura 2.29. muestra la estructura química y las fuentes de varios flavonoles naturales.

La fisetina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) puede aislar de plantas como *Rhus verniciflua*, y de frutas y verduras como fresas, manzanas, uvas, cebolla y pepino cohombro. Se reportan estudios que muestran sus actividades anti-cáncer, antioxidante y antiinflamatoria. También presenta reportes de uso potencial para el tratamiento de artritis ósea, y actividad senolítica, la cual está relacionada con el envejecimiento y procesos asociados como la osteoporosis, la fragilidad y enfermedades cardiovasculares.



NOMBRE TRIVIAL	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	Fuente
Galangina	-	-	-	OH	-	OH	-	<i>Alpinia</i>
Fisetina	OH	OH	-	-	-	OH	-	<i>Rhus</i>
Kaemferol	-	OH	-	OH	-	OH	-	<i>Delphinium</i>
Herbacetina	-	OH	-	OH	-	OH	OH	<i>Gossypium</i>
Quercetina	OH	OH	-	OH	-	OH	-	<i>Quercus</i>
Ramnetina	OH	OH	-	OH	-	OMe	-	<i>Rhamnus</i>
Quercetagetina	OH	OH	-	OH	OH	OH	-	<i>Tagetes</i>
Gossipetina	OMe	OH	-	OH	-	OH	OH	<i>Gossypium</i>
Isorramnetina	OH	OMe	-	OH	-	OH	-	<i>Cheiranthus</i>
Miricetina	OH	OH	OH	OH	-	OH	-	<i>Vitis</i>

Figura 2.29. Estructuras químicas y fuentes de varios flavonoles naturales.

La quercetina es un flavonol ampliamente distribuido en diferentes plantas. Es uno de los compuestos naturales más investigados por su potencial contra diferentes enfermedades. En la cebolla es el flavonoide más abundante representando el 10% de los flavonoides presentes, presenta potencial para la prevención del cáncer colorrectal.

El kaempferol (KMF), está presente en plantas alimenticias como el brocoli, repollo, tomate, arvejas, fresas, manzanas y col rizada. Se ha reportado que tiene potencial contra enfermedades como el cáncer de ovarios.

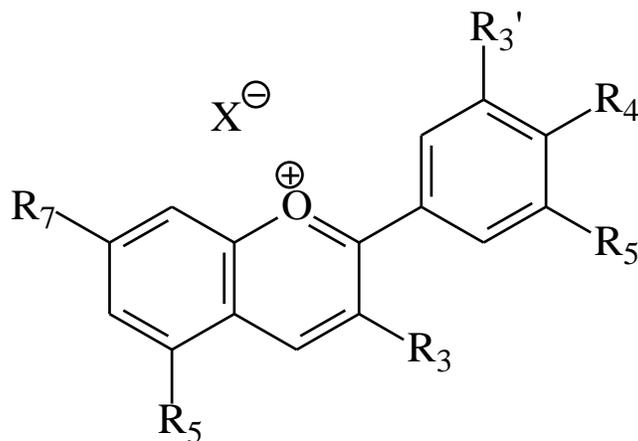
La miricetina es un flavonol presente en diferentes frutas, verduras, tés, cerezas y vinos. Se ha reportado que, junto a otros flavonoides como quercetina, kaemferol y luteolina, muestra interesantes propiedades biológicas como su potencial contra la enfermedad de Alzheimer. La presencia del grupo hidroxilo en C-3, ha sido relacionada con su potencial para inhibir gliomas malignos. La miricetina ha sido reportada como un inhibidor potente de la endonucleasa 1 por lo cual puede tener potencial contra células de cáncer de colon HT-29.

La Figura 2.30. muestra las estructuras de varias antocianidinas y algunas de sus fuentes naturales. Es de tener en cuenta que cuando se trata de las agliconas se las denomina antocianidinas, y cuando se trata de los glicósidos se las nombra como antocianinas.

Estas sustancias están presentes en los tejidos de coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul, de muchas plantas, especialmente en sus flores y frutos. Son sales solubles en agua, y cambian su color de acuerdo al pH, lo que las hace ser indicadores de pH naturales lo que a su vez ha llevado a considerar su utilidad como indicadores en empaques para alimentos. Por su solubilidad en agua, y su inestabilidad, se trabaja también en la obtención de derivados más liposolubles, como es el caso con las antocianinas de la flor de Jamaica.

Las antocianinas son reconocidas por su actividad antioxidante, pero también se están evaluando sus usos potenciales en enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias y también con potencial inmuno modulatorio.

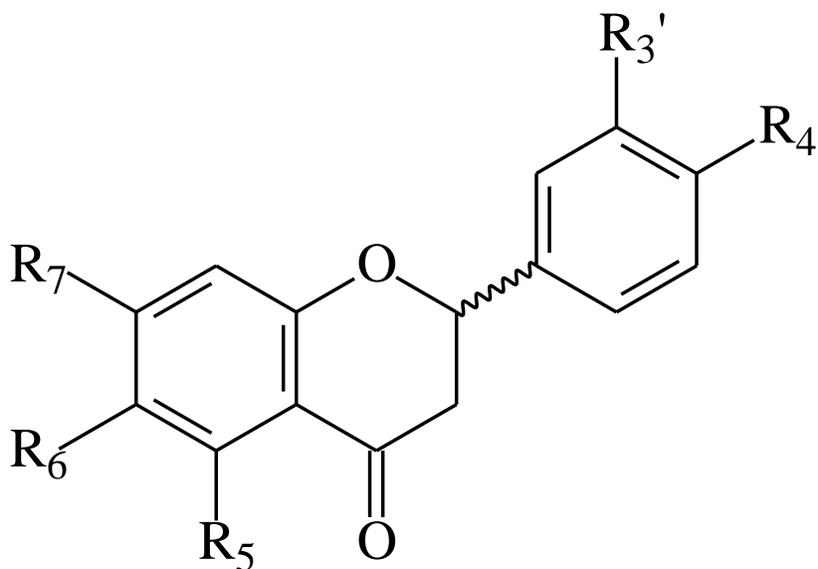
Las antocianinas están siendo consideradas como compuestos de interés dietario además se evalúa su potencial en la terapia de diabetes y como cardio protector.



NOMBRE TRIVIAL	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	R ₃	R ₅	R ₇	Fuente
Apigenidina	-	OH	OH	-	OH	-	<i>Rechsteineria</i>
Luteolinidina	OH	OH	OH	-	OH	-	<i>Rechsteineria</i>
Pelargonidina	-	OH	OH	OH	OH	-	<i>Pelargonium</i>
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	-	<i>Centaurea</i>
Peonidina	OMe	OH	OH	OH	OH	-	<i>Paeonia</i>
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	<i>Delphinium</i>
Petunidina	OMe	OH	OH	OH	OH	OH	<i>Petunia</i>
Malvidina	OMe	OH	OMe	OH	OH	OHe	<i>Malva</i>

Figura 2.30. Estructuras y algunas fuentes de varias antocianidinas naturales.

La figura 2.31. muestra las estructuras y algunas fuentes de flavanonas naturales.



NOMBRE TRIVIAL	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Fuente
Pinocebrina	-	-	OH	-	OH	<i>Pinus</i>
Liquiritigenina	-	OH	-	-	OH	<i>Glycyrrhiza</i>
Naringenina	-	OH	OH	-	OH	<i>Prunus</i>
Sakuranetina	-	OH	OH	-	OMe	<i>Prunus</i>
Eriodictiol	OH	OH	OH	-	OH	<i>Eriodictyon</i>
Hesperetina	OH	OMe	OH	-	OH	<i>Prunus</i>

Figura 2.31. Estructuras químicas y algunas fuentes de flavanonas naturales.

La naringenina, es la aglicona de la naringina presente en diferentes plantas, esta sustancia ha presentado resultados importantes contra la nefrotoxicidad inducida por terapias con cisplatino. La sakuranetina ha mostrado potencial actividad contra diabetes.

La hesperetina, se encuentra en frutos cítricos. En forma de glicósido se denomina hesperidina. Presenta varias actividades las cuales incluyen su acción captadora de radicales libres, así como efectos antioxidantes, neuro protectores, anti-Alzheimer, neuro farmacológicos, antiinflamatorios, en la prevención de enfermedades cardio vasculares y antidepresivos. Por su capacidad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, se considera potencialmente útil para la terapia de diabetes tipo 2.

Es importante anotar que varias clases de flavonoides contienen en su estructura el núcleo cromona, que está presente en muchos compuestos naturales bioactivos, y que se ha sugerido como una estructura clave en el estudio y desarrollo de nuevos compuestos biológicamente activos.

Otros flavonoides como la puerarina, un isoflavonoide, se ha reportado como un compuesto con potencial uso en terapia del cáncer de seno. Un éster de la isoorientina y ácido cafeico presenta potentes actividades antioxidante e inhibidora de la enzima α -glucosidasa, lo que sugiere su potencial para prevenir y tratar enfermedades como diabetes mellitus.

La dihidromiricetina es un flavonoide de las hojas de *Ampelopsis grossedentata*, que presenta efectos protectores antioxidantes y antiinflamatorios. Además, se reportan actividades anti-cáncer, mejora de la sensibilidad a la insulina y reducción de la pérdida neuronal dopaminérgica de la enfermedad de Alzheimer, y contra isquemias cerebrales. Otros flavonoides, como los flavolignanós del ginkgo, también muestran potencial contra este tipo de enfermedades.

Un glicósido flavonoide que se encuentra en muchas plantas es la rutina, para esta sustancia se han reportado propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Además, la rutina reduce también la fragilidad capilar, previene la aterogénesis, y alivia la citotoxicidad del colesterol-LDL oxidado. También se ha reportado que puede reducir de manera significativa los triglicéridos hepáticos y los niveles de colesterol en animales con dietas altas en grasas.

Otras actividades reportadas para los flavonoides incluyen su acción antidepresiva y anti genotóxica.

Es también interesante mencionar, la consideración de los flavonoides como componentes de la dieta, en especial por las propiedades que se les atribuyen por diferentes autores, sobre el envejecimiento del cerebro y la pérdida de la memoria. Aunque el índice terapéutico de los flavonoides no está bien definido, algunos autores mencionan valores de ingesta diaria en la dieta de 250 a 400 mg/día.

Además de las clases de flavonoides mencionadas anteriormente, se encuentran en algunas plantas unas sustancias denominadas flavolignanos. Para definir estos flavolignanos, es importante aclarar primero lo que son los lignanos. Estas sustancias son otra gran clase de compuestos fenólicos naturales derivados biosintéticamente del ácido shikímico, y que poseen una estructura básica $(C_6C_3)_2$. Es decir, tienen dos anillos aromáticos y dos cadenas de 3 átomos de carbono. Existen dos grandes grupos, los lignanos propiamente dichos, como se muestra en la 2.32, y los neolignanos. Son ejemplos de ellos la podofilotoxina y la eusiderina (Figura 2.33).

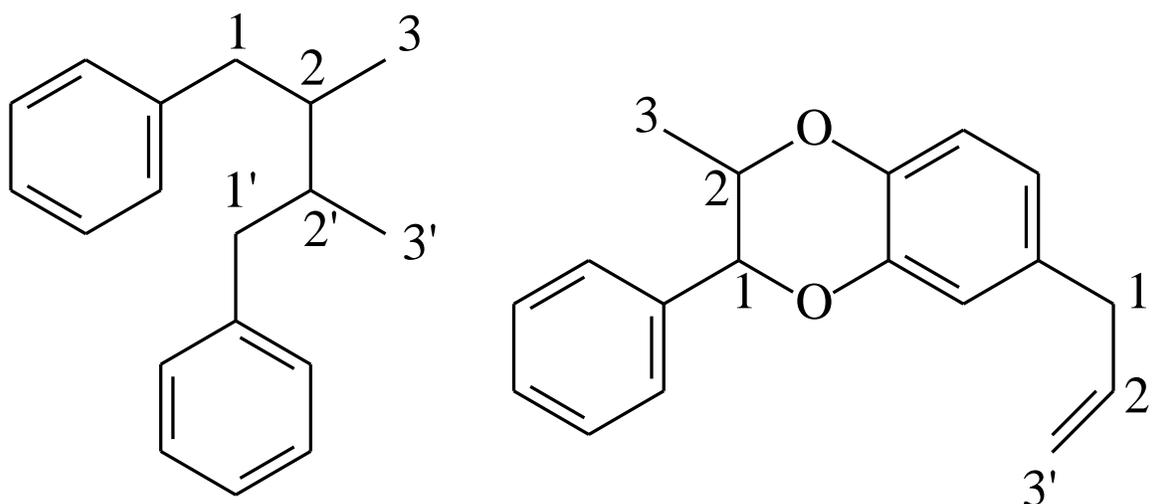
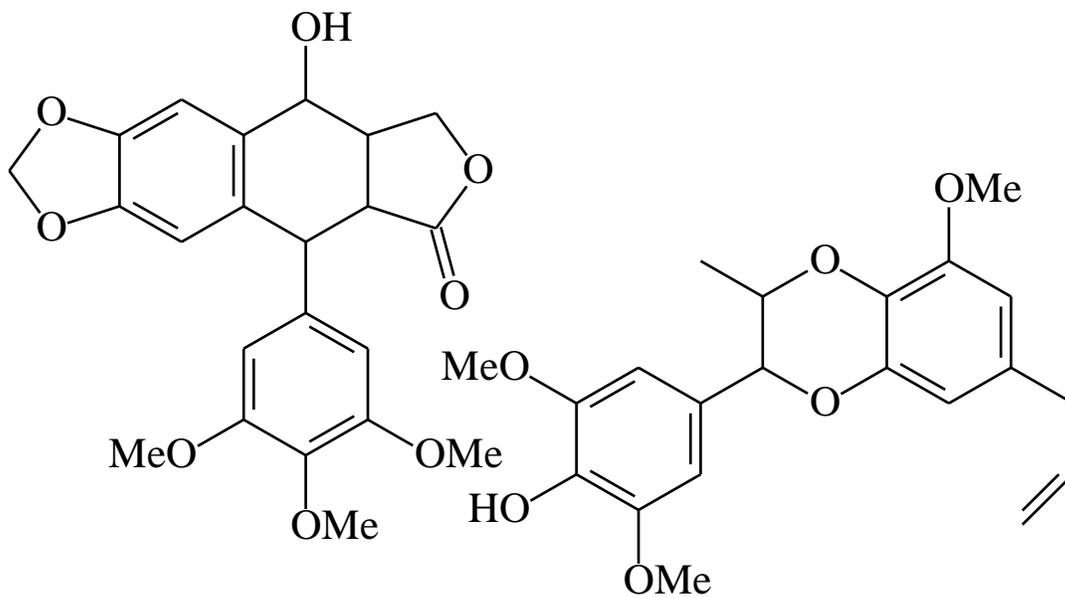


Figura 2.32. Estructuras básicas de algunos lignanos y neolignanos. En los lignanos (imagen de la izquierda), la unión de las dos unidades C_6C_3 se dá a través de la cadena propanoide, y en los neolignanos las dos unidades C_6C_3 se unen a través de la cadena propanoide de una y el anillo aromático de la otra.

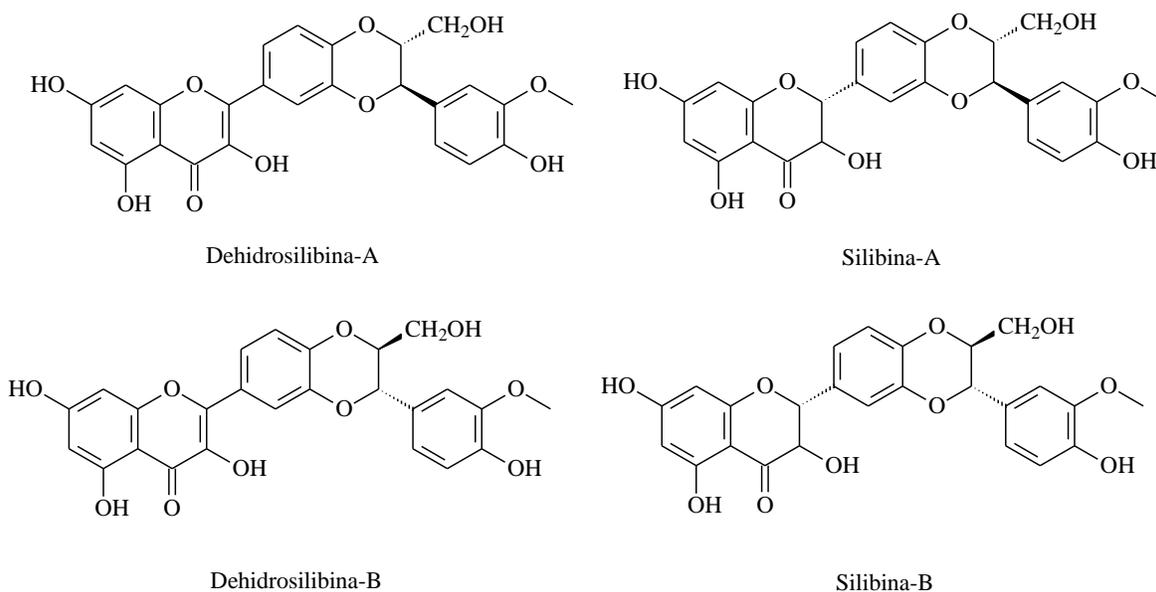


Podofilotoxina

Eusiderina

Figura 2.33. Estructuras químicas de la podofiloxina (un lignano) y la eusiderina (un neolignano).

Las estructuras químicas de algunos flavolignanos se presentan en la 2.34. Puede observarse el núcleo característico de los flavonoides hacia la izquierda, y la cadena propanoide adicional en la posición superior derecha.



Dehidrosilibina-A

Silibina-A

Dehidrosilibina-B

Silibina-B

Figura 2.34. Estructuras químicas de flavolignanos presentes en la silimarina, un extracto de *Silybum marianum*.

La planta *Sylibum marianum*, es conocida como la fuente de una droga natural con propiedades hepatoprotectoras. La droga es un extracto de la planta que contiene varios flavolignanicos como los mostrados en la figura 2.34, además de flavonoides como la quercetina y la taxifolina. Además de sus propiedades antimicrobianas y anti cancer. En experimentos con animales se ha observado que esta droga puede proteger además el corazón, el cerebro y los riñones contra isquemias.

Distribución y estado natural

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. En el medio marino se han reportado hasta ahora unos cien flavonoides, especialmente tipo flavonas y flavonoles. En este caso se trata de plantas acuáticas que incluyen las familias hidrocaritáceas, zosteráceas, rhodomeláceas, juncáceas y tamaricáceas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las flores, frutos, hojas y tallos; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos, clorados e incluso nitrogenados en plantas marinas. Algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar. Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul.

Propiedades físicas

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo, las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema de enlaces dobles C=C conjugados que contienen, son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el anaranjado. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su dilucidación estructural.

Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos.

Biogénesis

Como se mencionó anteriormente los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C₃ provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A sea *meta*-dioxigenado, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA; y, por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es *orto*-dioxigenado. La figura 2.35 describe la biogénesis de las chalconas, las cuales a su vez dan origen a los demás flavonoides.

Para el caso de la biosíntesis de los isoflavonoides los experimentos realizados por diversos investigadores sugieren que hay rutas alternativas, pero que de todas maneras involucran al ácido shikímico y la malonilcoenzima-A, como precursores.

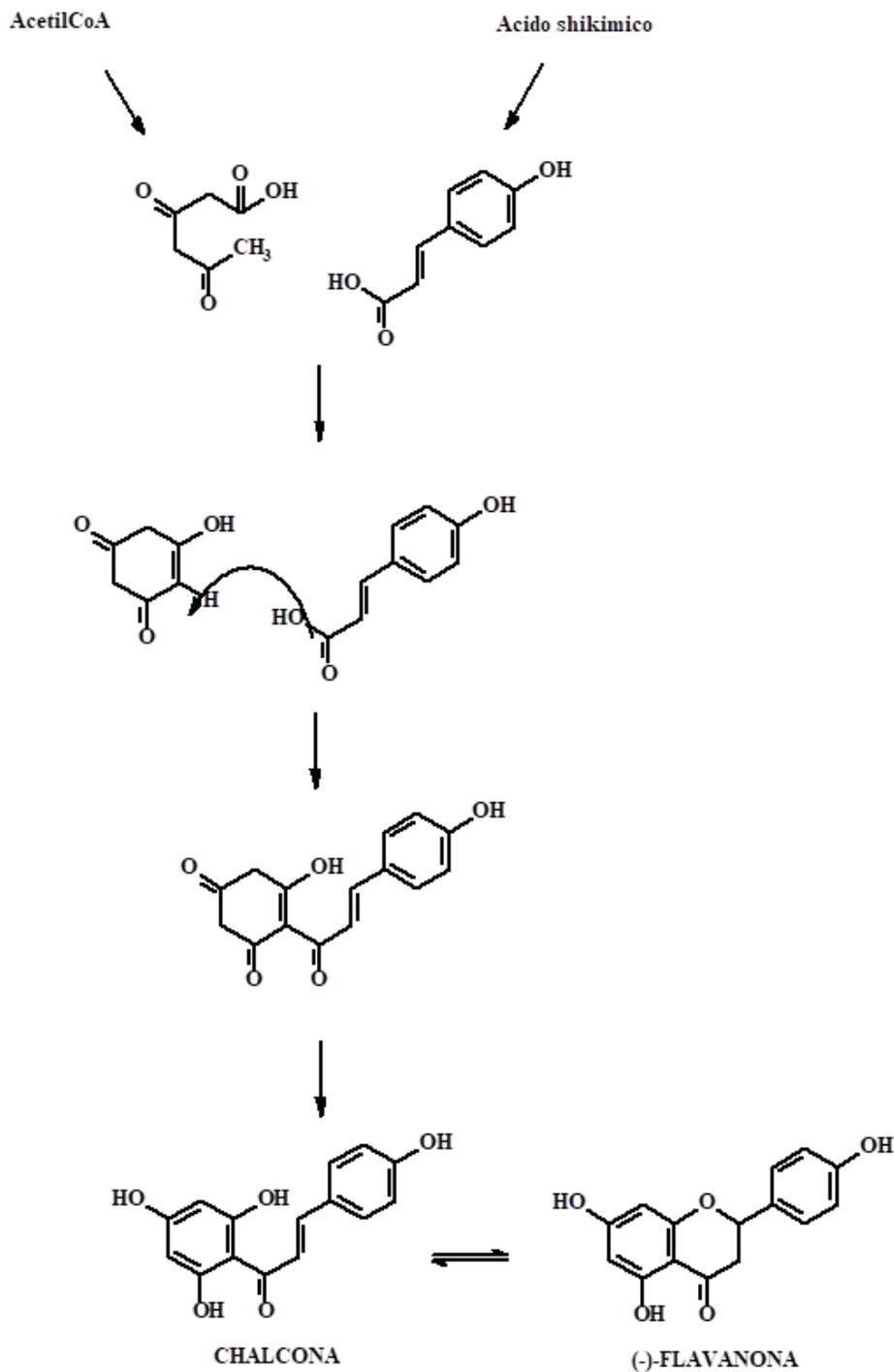


Figura 2.35. Esquema de la biogénesis de flavonoides a partir de ácido shikímico y acetilcoenzima-A.

Extracción y aislamiento

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas. La muestra se desengrasa inicialmente con éter de petróleo ó n-hexano, y el marco se extrae con etanol puro o del 70%. Este último es recomendado para garantizar la extracción de los más polares. El

extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en el n-butanol. Cada una de estas tres fracciones se puede analizar por cromatografía en capa fina (CCF) y HPLC en fase reversa.

Actualmente se están desarrollando nuevas alternativas de extracción más eficientes, menos costosas en tiempo y materiales, y especialmente con menores efectos contaminantes del medio ambiente. Estas técnicas incluyen el uso de sistemas de microondas, y ultrasonido. La comparación de los métodos clásicos de extracción con técnicas como la asistida con ultrasonido presenta las ventajas mencionadas, y es útil en general para diferentes clases de metabolitos secundarios, incluidos los flavonoides. También se ensayan otras mezclas extractoras como Tritón X100-NaCl-HCl que permiten obtener rápidamente las fracciones de alcaloides y flavonoides de muestras vegetales. Como se anotó en el capítulo 1, la utilización de solventes eutécticos viscosos (DES), es una de las técnicas más utilizadas actualmente para extraer compuestos fenólicos como los flavonoides, por las ventajas sobre el uso de los solventes orgánicos convencionales.

Para el análisis por CCF de las agliconas se utilizan mezclas n-hexano/acetato de etilo en diferentes proporciones, estas pueden ser alternativas menos contaminantes que por ejemplo la mezcla cloroformo/acetato de etilo 60:40 utilizada por diferentes autores para el análisis de drogas vegetales.

Para el análisis por HPLC de los glicósidos pueden utilizarse columnas RP-18, detectando a 254 nm y eluyendo con mezclas con ácido acético o fórmico diluidos, un alcohol, acetonitrilo y agua en diferentes proporciones. El ácido previene la formación de picos asimétricos en el cromatograma. Para el análisis cuantitativo HPLC de las agliconas también se usan columnas RP-18, detección a 254 nm y elución con mezclas de acetonitrilo/agua con ácido acético al 1%. Utilizando estas condiciones cromatográficas y UHPLC con columna C-18 y acoplada con RMN, se pueden identificar de manera eficiente muchas flavonas y flavonoles comunes. Aunque como en muchas plantas los flavonoides se encuentran en mezclas con otros metabolitos, se vienen desarrollando técnicas que combinan la cromatografía en contra corriente CCC, y la resonancia magnética de carbono-13, para su análisis cualitativo y cuantitativo.

En el caso de las antocianinas, estas se pueden extraer de las muestras vegetales con etanol 55.10% acuoso y asistido con ultrasonido a 70°C. El extracto se puede separar por HPLC con detector de arreglo de diodos DAD, utilizando columnas de fase reversa C-18, y eluyendo con mezclas de etanol y ácido fórmico al 5% 20:80. Esta constituye una metodología rápida, confiable y amigable con el medio ambiente.

Cuantificación de flavonoides totales

Aunque los flavonoides presentes en las plantas y drogas vegetales en general están mezclados con diferentes metabolitos, y pueden ser de diferentes clases, no existe un método exacto para su cuantificación. Una aproximación es el método de Chang. En este método colorimétrico. El extracto alcohólico de la muestra con flavonoides se mezcla con etanol al 75%, con cloruro de aluminio en solución y con una sal como acetato de potasio. La reacción produce un complejo coloreado que se puede leer a 415 nm, y se utiliza como referencia una curva estándar de quercetina. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina. Otro método similar utiliza nitrito de sodio NaNO_2 , y cloruro de aluminio AlCl_3 , también con lectura espectrofotométrica a 415 nm y utilizando como sustancia de referencia la quercetina.

El contenido de flavonoides y fenoles totales se puede determinar colorimétricamente mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como marcador de referencia.

Ensayo de Shinoda

Los flavonoides con el núcleo benzopirona o 4-cromenona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos. Es importante tener en cuenta que varias clases de flavonoides como las auronas y las chalconas, no dan resultados positivos con esta prueba, debido a que no contienen el sistema anular benzopirona o 4-cromenona, y que otras sustancias diferentes a los flavonoides en cambio dan la prueba positiva, debido a que contienen el sistema benzopirona o 4-cromenona.

Reconocimiento de antocianinas

Las antocianinas se comportan como indicadores ácido-base debido al proceso mostrado en la figura 2.36. A pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules.

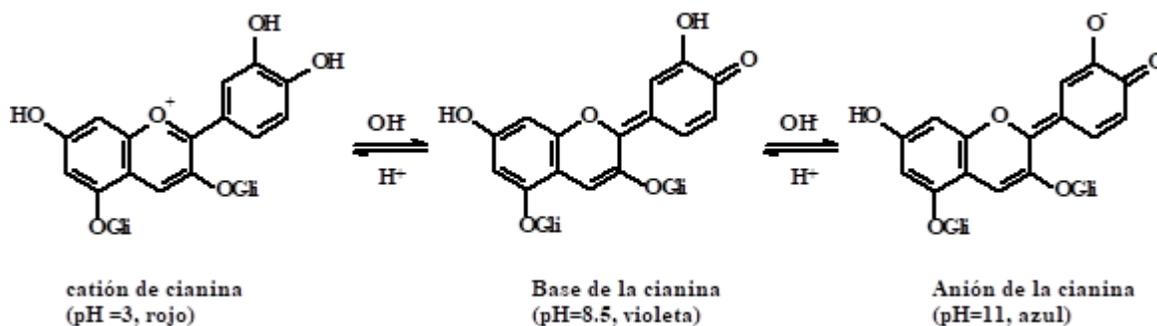


Figura 2.36. Estructuras químicas y cambio de color de la antocianina cianina con el pH.

Con esta prueba se pueden diferenciar entre las antocianinas y las betacianinas (pigmentos nitrogenados de colores rojos y violeta de plantas del orden Centrosperma, como p. ej. los pigmentos de la remolacha *Beta vulgaris*, Fam. quenopodiáceas y también presentes en otras plantas como la *Phytolacca americana*, Fam. Fitolacáceas). Las betacianinas, hacen parte de un grupo de sustancias nitrogenadas denominadas betalainas, y estas se dividen a su vez en dos grupos, las betacianinas de colores rojo al violeta, y las betaxantinas de color amarillo. Estas sustancias son de interés actualmente por ser pigmentos con potencial uso como colorantes de alimentos, y por sus propiedades antimicrobianas y antivirales (69).

Espectroscopia ultravioleta-visible

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. A continuación, se presenta información relacionada con la espectroscopia UV de flavonas y flavonoles.

Las flavonas y flavonoles en particular, muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-400 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 240-285 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 304-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 352-385 nm. A manera de ejemplo la quercetina muestra máximos de absorción en 371, 268h, 257 nm; la luteolina en 350, 267, 254 nm, y la 3-O-metilquercetina en 358, 253 nm.

Para el caso de las flavonas y flavonoles, la presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio (AlCl₃) con y sin HCl, y ácido bórico (H₃BO₃).

El NaOMe es una base fuerte que ioniza los hidroxilos fenólicos presentes en la molécula y particularmente permite reconocer la existencia de grupos hidroxilo en 3 y 4'. Las flavonas 4'-hidroxiladas y los flavonoles 3-O-sustituídos presentan desplazamiento batocrómico de 45-65 nm para la banda I al añadir NaOMe, y la intensidad de la banda no decrece. Los flavonoles (ó 3-hidroxi flavonas) sin hidroxilo en 4', también presentan el mismo desplazamiento batocrómico de 45-65 nm, pero la intensidad de la banda se ve disminuida. En los flavonoles 3,4'-dihidroxiados, orto-dihidroxiados y diorto-trihidroxiados, el espectro se descompone en pocos minutos luego de añadir el NaOMe. La aparición de una banda alrededor de 330 nm (banda III) es característica de flavonas 7-hidroxiadas.

El NaOAc es una base más débil que el NaOMe, y ioniza solo los hidroxilos fenólicos más ácidos: 3, 4' y 7. La ionización del hidroxilo en 7 afecta la banda II y por lo tanto el NaOAc es un reactivo útil para determinar la presencia de dicho hidroxilo. Si al añadir el NaOAc se observa un desplazamiento batocrómico de 5-20 nm en la banda II se trata de una flavona o flavonol 7-hidroxiado. Las flavanonas 5-hidroxiadas presentan un desplazamiento batocrómico de 35 nm. Los flavonoles (sin 5-OH) presentan un desplazamiento batocrómico de 60 nm. Sin embargo, Heinz y col. han reportado que se debe tener precaución en la obtención del espectro con NaOAc.

El H_3BO_3 en medio alcalino forma quelatos con hidroxilos fenólicos en posición relativa orto (Figura 2.37).

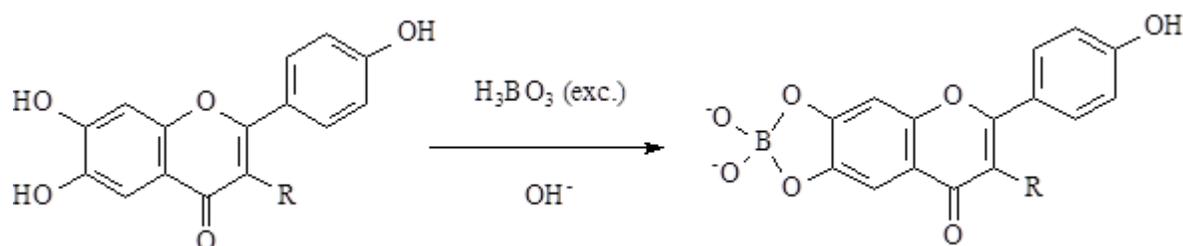


Figura 2.37. Reacción de formación de quelato entre grupos hidroxilos en posición *orto* y el ácido bórico. La reacción ocurre en medio alcalino.

La formación del quelato produce desplazamiento batocrómico en la banda I. Si el desplazamiento es de 12-36 nm se trata de un flavonoide (flavona, flavonol, aurona o chalcona) orto-dihidroxiado en el anillo B, pero si el desplazamiento batocrómico es menor es un flavonoide orto-dihidroxiado en el anillo A. Las isoflavonas, flavanonas y flavonoles orto-dihidroxiadas en el anillo A muestran desplazamiento batocrómico de 10-15 nm, pero en la banda II.

El $AlCl_3$ anhidro también forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados (hidroxilos *peri*). En el caso de los orto-dihidroxiados el quelato es inestable

a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxilados son estables. La figura 2.38. esquematiza el proceso químico que ocurre.

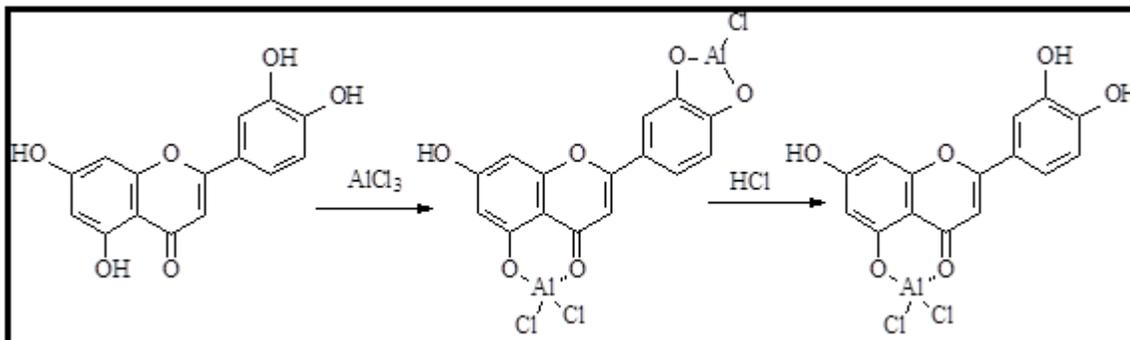


Figura 2.38. Reacción de formación de quelatos entre el cloruro de aluminio y grupos hidroxilo *peri* y *orto* de flavonoides.

Por lo anterior, si al determinar el espectro con AlCl_3 y HCl se mantiene un desplazamiento batocrómico de 35-55 nm en la banda I (comparando con el espectro metanólico) se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxilado. Si el desplazamiento es de 17-20 nm se puede tratar de una flavona o un flavonol 5-hidroxilado y 6-oxigenado. Si el desplazamiento es de 50-60 nm se trata de una flavona o un flavonol 3-hidroxilado (con o sin 5-OH).

En el caso de flavonoides (flavonas y flavonoles) orto-dihidroxilados en el anillo B (sin 3-OH ni 5-OH) al añadir el cloruro de aluminio se obtiene un desplazamiento batocrómico de la banda I de 30-40 nm, el cual se pierde al añadir el HCl . Los orto-dihidroxilados en A (sin 3-OH ni 5-OH) muestran un desplazamiento de la misma banda de 20-25 nm, el cual se pierde también al añadir el HCl .

Otros flavonoides como las flavanonas, isoflavonas y flavanonoles presentan desplazamientos batocrómicos, pero en la banda II. Las auronas, chalconas y antocianidinas también presentan desplazamientos batocrómicos en la banda I.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

El desarrollo de las técnicas como espectrometría de masas y, especialmente la resonancia magnética nuclear, facilita la asignación estructural de las diferentes clases de flavonoides. El espectro de RMN^{-1}H de los flavonoides permite reconocer características estructurales importantes. Un resumen de los desplazamientos químicos observados para los tipos de protones más comúnmente hallados se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de varias clases de protones presentes en los flavonoides.

δ (ppm)	Tipos de protones
0.0	Tetrametilsilano
0.0-0.5	Trimetilsililo
1.0-1.2	Metilo de la ramnosa (doblete ancho)
1.7	Metilos del grupo isopentenilo
1.9-2.0	Metilos de acetatos alifáticos (de azúcares)
2.2-2.4	Metilos de acetatos aromáticos
2.7-3.1	H-3 de flavanonas (multiplete)
3.0-4.8	Protones de carbohidratos
3.5	Metileno del grupo isopentenilo
3.7-4.1	Metoxilos aromáticos
4.1-4.6	Protones 2 y 3 de isoflavanonas
4.2-6.0	Protón 1 de carbohidratos, protón 2 de flavanoles y flavanonas (doble doblete)
5.4	Protón 2 de flavanoles y flavanonas (dd)
6.0-6.8	Protones 3, 6 y 8 de flavonas
6.8-8.0	Protones aromáticos del anillo B
7.5-8.0	Protón 2 de isoflavonas
8.9	Protón 4 de antocianinas
12.0-14.0	Protón del hidroxilo 5 (hidroxilo <i>peri</i>)

Las antocianinas se pueden reconocer en sus espectros RMN-¹H por la señal alrededor de δ 9 (s, H-4) y las señales características de otros protones aromáticos como en los glicósidos de la delfinidina.

Las flavanonas se reconocen por las señales dd en δ 5.4-6.0 (H-2, J=13 y 2-3 Hz), 3.1-3.3 (H-3_{eq}, J=13 y 17 Hz) y 2.7-2.8 (H-3_{ax}, J=17 y 2-3 Hz).

Las isoflavanonas se pueden reconocer por RMN-¹H por las señales: δ 4.6 (H-2a, dt), 4.5 (H-2b, dd) y 4.3 (H-3, dd).

Los protones de los grupos hidroxilos generalmente no se observan en los espectros cuando estos se determinan en solventes próticos, pero algunas veces se observa la señal del hidroxilo en C-5, entre 12.0 y 14.0 ppm, en forma de un singlete ancho.

En el espectro de RMN-¹³C se pueden reconocer varios tipos de carbonos, en la Tabla 4 se presentan los rangos de desplazamiento químico para varios de ellos.

Tabla 4. Desplazamientos químicos de varios tipos de carbonos de flavonoides.

δ (ppm)	Tipos de carbonos
18	C-6 de ramnosa
30	C-4 de flavan-3-oles
42-46	C-3 de flavanonas
56-61	Metoxilos
60-80	C-OH de carbohidratos
70-75	C-3 de flavanonoles
80	C-2 de flavanonas
85	C-2 de flavanonoles
100-115	C-3 de flavonas, C-1 de carbohidratos, C-10 de flavonas 5-hidroxiladas
115-128	C aromáticos con H
130-140	C aromáticos sulfatados
145	C-3 de flavonoles, C-5 de flavonas 5-hidroxiladas, C-3 y C-4 de antocianinas
150-165	C aromáticos hidroxilados y metoxilados, C-1a de flavonas, C-2 de antocianinas, C-2 de flavonas, C-4' oxigenado, C-9 de flavonas
175-178	carbonilo C-4 sin OH en C-5 en flavonas, C-4 de flavonoles
182	carbonilo C-4 con OH en C-5 de flavonas
190-196	carbonilo C-4 de flavanonas
197-200	carbonilo C-4 de flavanonoles

Es posible también diferenciar entre un C-glicósido flavonoide y un O-glicósido flavonoide. En los O-glicósidos, el C-1 resuena alrededor de 100 ppm para los carbohidratos más comunes, mientras que en los C-glicósidos resuena alrededor de 75 ppm.

A manera de ejemplo, y con el fin de ilustrar la utilidad de la RMN y herramientas informáticas disponibles para la asignación estructural de flavonoides, a continuación, se comparan los espectros RMN reportado y calculado para la quercetina.

La Tabla 5, presenta los desplazamientos químicos y las multiplicidades de las señales de protones y carbonos de la quercetina. Los valores calculados se obtuvieron al utilizar la herramienta en línea de la página <http://www.nmrdb.org>

Tabla 5. Señales de protones y carbonos observadas en espectros de RMN-1H y RMN-13C, reportadas y calculadas para la quercetina. *La herramienta en línea predice dd, debido a los acoplamientos *meta* y *para*, este último a nivel práctico no se observa generalmente.

C/H	Señales de protones, reportadas	Señales de protones, calculadas	Señales de carbonos reportadas	Señales de carbonos, calculadas
2	-	-	156.8	144.2
3	-	-	135.8	136.8
4	-	-	175.9	175.0
5	-	-	161.1	161.8
6	6.21, d, J = 2.0 Hz	6.27, d, J = 1.9 Hz	97.8	97.8
7	-	-	164.2	164.6
8	6.41, d, J = 2.0 Hz	6.44, d, J = 1.9 Hz	93.0	94.7
9	-	-	147.4	157.1
10	-	-	103.1	105.1
1'	-	-	122.7	123.8
2'	7.76, d, J = 2.2 Hz	7.40, d, J = 1.8 Hz*	114.8	115.7
3'	-	-	144.8	145.6
4'	-	-	146.6	146.6
5'	6.91, d, J = 8.5 Hz	6.74, d, J = 8.4 Hz*	114.6	115.9
6'	7.66, dd, J = 2.2 y 8.5 Hz	7.69, dd, J = 1.8 y 8.4 Hz	120.2	122.6

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas, acoplada a técnicas de separación como HPLC, es una combinación de técnicas muy utilizada para la separación e identificación de flavonoides y en general de metabolitos secundarios en muestras vegetales. A continuación, se mencionan algunos elementos de la espectrometría de masas clásica de agliconas.

Las agliconas flavonoides presentan fragmentos característicos en su espectro de masas de impacto electrónico IE. Por ejemplo, las flavonas y flavonoles presentan generalmente los fragmentos M^+ , $[M-H]^+$, y $[M-CO]^+$; uno o varios de los fragmentos A_1^+ , $[A_1+H]^+$, B_1^+ y B_2^+ los que se originan por rompimientos Retro-Diels-Alder, como lo ilustra la figura 2.39.

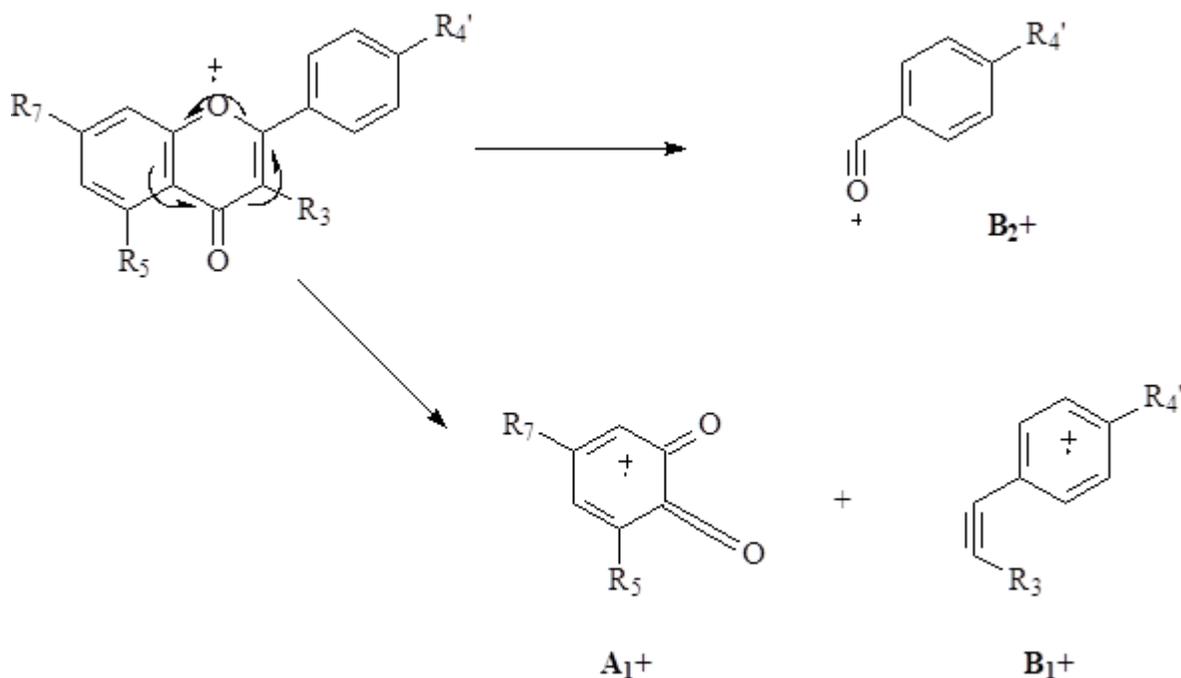


Figura 2.39. Esquema general de la fragmentación por espectrometría de masas clásica de flavonas y flavonoles.

Las flavonas e isoflavonas generalmente muestran los fragmentos A_1^+ , $[A_1+H]^+$, B_1^+ y B_2^+ . Los flavonoles muestran $[A_1+H]^+$ y B_2^+ ; además el fragmento $[M-CHO]^+$. Las 3-metoxiflavonas muestran A_1^+ , $[A_1+H]^+$ y B_1^+ . Además, se observa el fragmento $[M-CO-Me]^+$.

Las flavanonas muestran A_1^+ , $[A_1+H]^+$, $[B_1+2H]^+$ y los fragmentos $[M-\text{anillo B}]^+$ y B_3^+ , formados mediante esquemas como se ilustra en la figura 2.40.

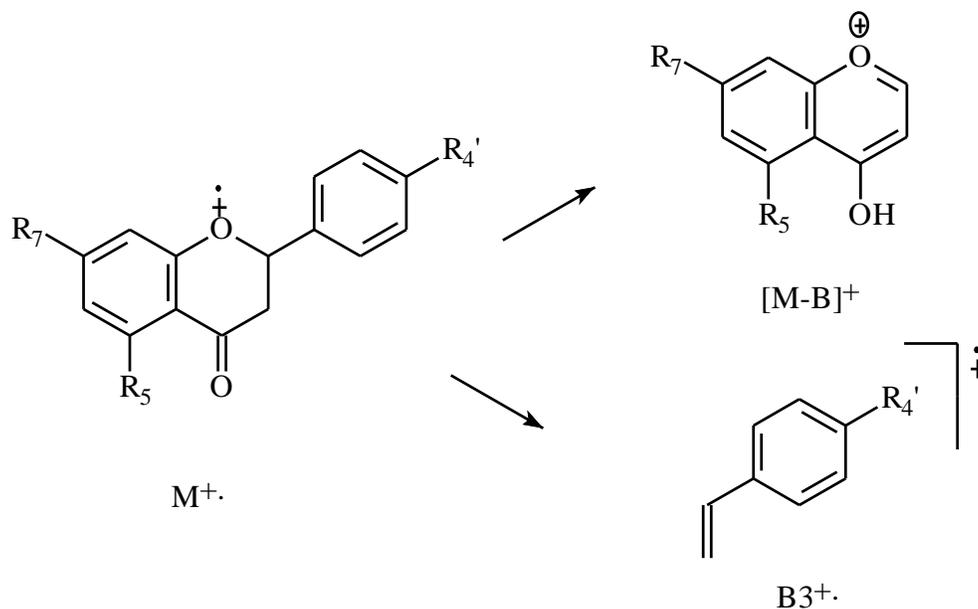


Figura 2.40. Esquema para la formación de fragmentos característicos en espectrometría de masas de impacto electrónico de flavanonas.

Los flavanonoles muestran $A_1^{+\bullet}$ y los fragmentos mostrados en la figura 2.41.

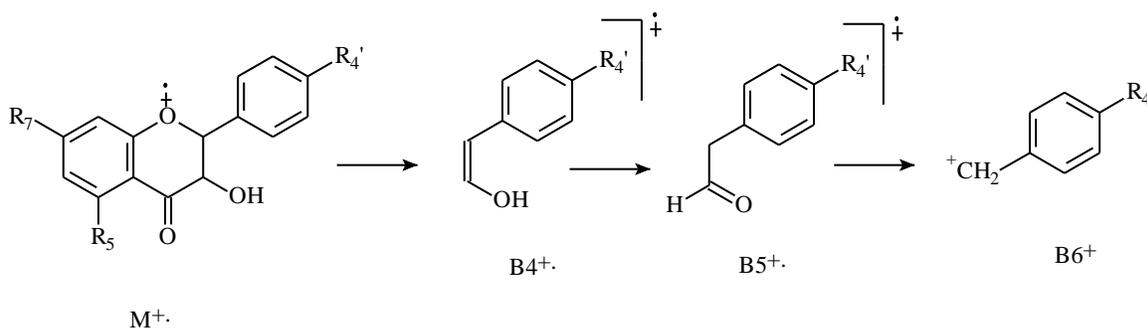


Figura 2.41. Esquema para la formación de fragmentos característicos en espectrometría de masas de flavanonoles.

Las chalconas tienden a producir fragmentos originados por ruptura a cada lado del carbonilo. La figura 2.42 esquematiza el proceso de fragmentación y formación de algunos iones observados.

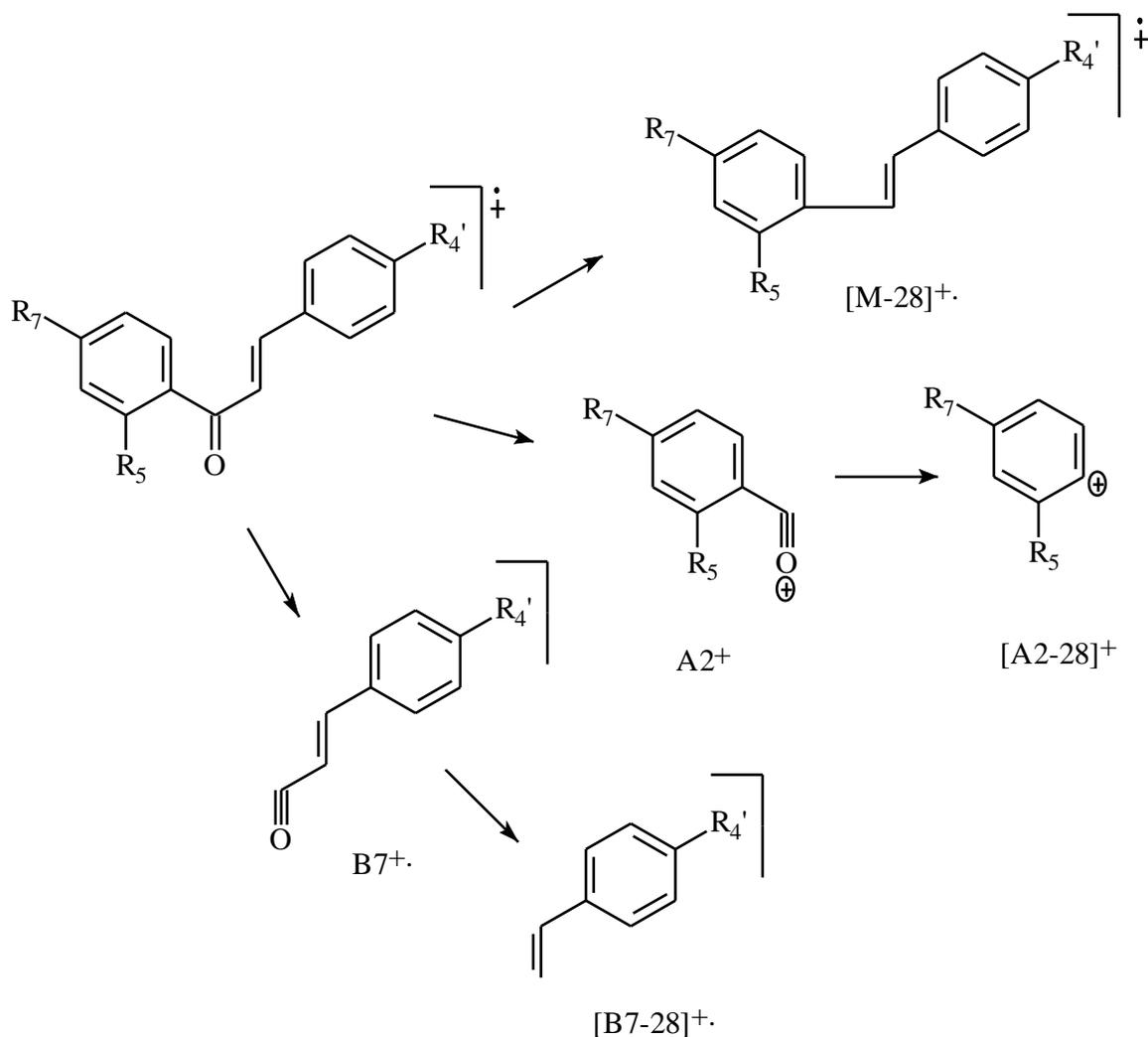


Figura 2.42. Esquema para la formación de fragmentos característicos en espectrometría de masas de chalconas.

Las 2'-hidroxichalconas pueden isomerizarse a flavanonas y generar los fragmentos característicos de estas.

En general las agliconas flavonoides con uno o varios grupos metoxilo presentan el fragmento $[M-Me]^+$, el cual es especialmente intenso en flavonoides 6- y 8-metoxilados.

En los flavonoides 2'-hidroxilados también se aprecia a veces el fragmento $[M-OH]^+$, mientras que los 2'-metoxilados presentan el fragmento $[M-OMe]^+$.

El fragmento $[M-agua]^+$ es común en flavonoles, flavan-3,4-dioles y C-glicósidos.

El fragmento $[M-55]^+$ o $[M-56]^+$ indica la presencia de un sustituyente isopentenilo.

Es importante anotar que algunos autores reportaron que es posible diferenciar 5-hidroxi-, 6,7-dimetoxi-, 7,8-dimetoxi-, 5,6,7-trimetoxi- o 5,7,8-trimetoxiflavonas con base en las intensidades relativas de los iones M y M-15.

Como actualmente, se utilizan técnicas acopladas como HPLC y uHPLC con detectores de masas, es interesante anotar como en estudios de fragmentaciones MS/MS fragmentos como los descritos A_1^+ , B_1^+ , y B_2^+ , de flavonas y flavonoles, también se observan utilizando espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), como en el caso de la quercetina, en la cual se observan los iones relacionados m/z 151, 149 y 137. La fragmentación por espectrometría de masas tándem MS/MS ha sido descrita por diferentes autores.

La tabla 6 resume los fragmentos característicos en espectrometría de masas clásica de agliconas de flavonas y flavonoles y su interpretación respecto al número de sustituyentes hidroxilos y metoxilos en los anillos A y B:

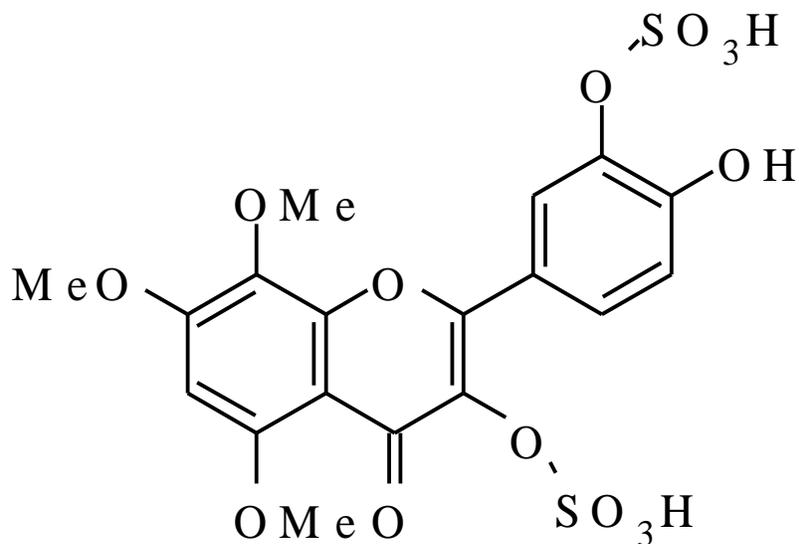
Tabla 6. Valores m/z de fragmentos obtenidos a partir de rupturas de las moléculas de flavonas y flavonoles.

m/z	Número de sustituyentes en el ANILLO A			Número de sustituyentes en el ANILLO B		
	OH	H	OMe	OH	H	OMe
105	-	-	-	0	5	0
120	0	4	0	-	-	-
121	0	4	0	1	4	0
135	-	-	-	0	4	1
136	1	3	0	-	-	-
137	1	3	0	2	3	0
150	0	3	1	-	-	-
151	0	3	1	1	3	1
152	2	2	0	-	-	-
153	2	2	0	3	2	0
165	-	-	-	0	3	2
166	1	2	1	-	-	-
167	1	2	1	2	2	1
168	3	1	0	-	-	-
169	3	1	0	4	1	0

m/z	Número de sustituyentes en el ANILLO A			Número de sustituyentes en el ANILLO B		
180	0	2	2	-	-	-
181	0	2	2	1	2	2
182	2	1	1	-	-	-
183	2	1	1	3	1	1
184	4	0	0	-	-	-
185	4	0	0	5	0	0
195	-	-	-	0	2	3
196	1	1	2	-	-	-
197	1	1	2	2	1	2
198	3	0	1	-	-	-
199	3	0	1	4	0	1
210	0	1	3	-	-	-
211	0	1	3	1	1	3
212	2	0	2	-	-	-
213	2	0	2	3	0	2
226	1	0	3	-	-	-
227	1	0	3	2	0	3
240	0	0	4	-	-	-
241	0	0	4	1	0	4
255	-	-	-	0	0	5

Para los glicósidos y flavonoides sulfatados, aunque inicialmente se obtenían los espectros de masas a partir de sus derivados permetilados, y trimetilsililéteres, posteriormente se utilizaron las técnicas de espectrometría de masas de ionización suave, particularmente la denominada espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos, correspondiente a la sigla inglesa FAB “*fast atom bombardment*”. El espectro de masas FAB permite reconocer los flavonoides sulfatados ya que presentan además del ion pseudomolecular ($M+H^+$ en modo positivo, ó $M-H^-$ en modo negativo), pérdidas sucesivas de 80, 160, 240, etc. unidades de masa debidas a la pérdida de 1, 2, 3 ó más grupos sulfato. Por ejemplo, la figura 2.43, presenta la estructura de 3,3'-disulfato de gossipetina-7,8-dimetiléter. Se muestra el ion

pseudomolecular m/z 505 $(M-H)^+$, y los fragmentos m/z 425 y 345, correspondientes a las pérdidas de una y dos unidades de sulfato, respectivamente. En la actualidad la técnica FAB ha sido desplazada por la espectrometría de masas ESI.



3,3'-disulfato de gossipetina-7,8-dimetiléter

Figura 2.43. Estructura química de un flavonoide sulfatado.

Para el caso de las agliconas flavonoides los espectros de masas ESI, presentan fragmentos muy similares a los observados en los obtenidos en los espectros de impacto electrónico. En modo negativo se aprecian los iones $[M-H]^-$, y en modo positivo $[M+H]^+$. La figura 2.44. muestra un esquema que incluye los fragmentos que son característicos de la luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) tanto en el espectro de masas de impacto electrónico IE como en el espectro de masas ESI. Puede observarse que los tres fragmentos en la parte superior corresponden a fragmentos del espectro de masas de impacto electrónico m/z 134 y 152, que en el caso del espectro ESI se observan protonados, y corresponden en este caso a m/z 135 y 153.

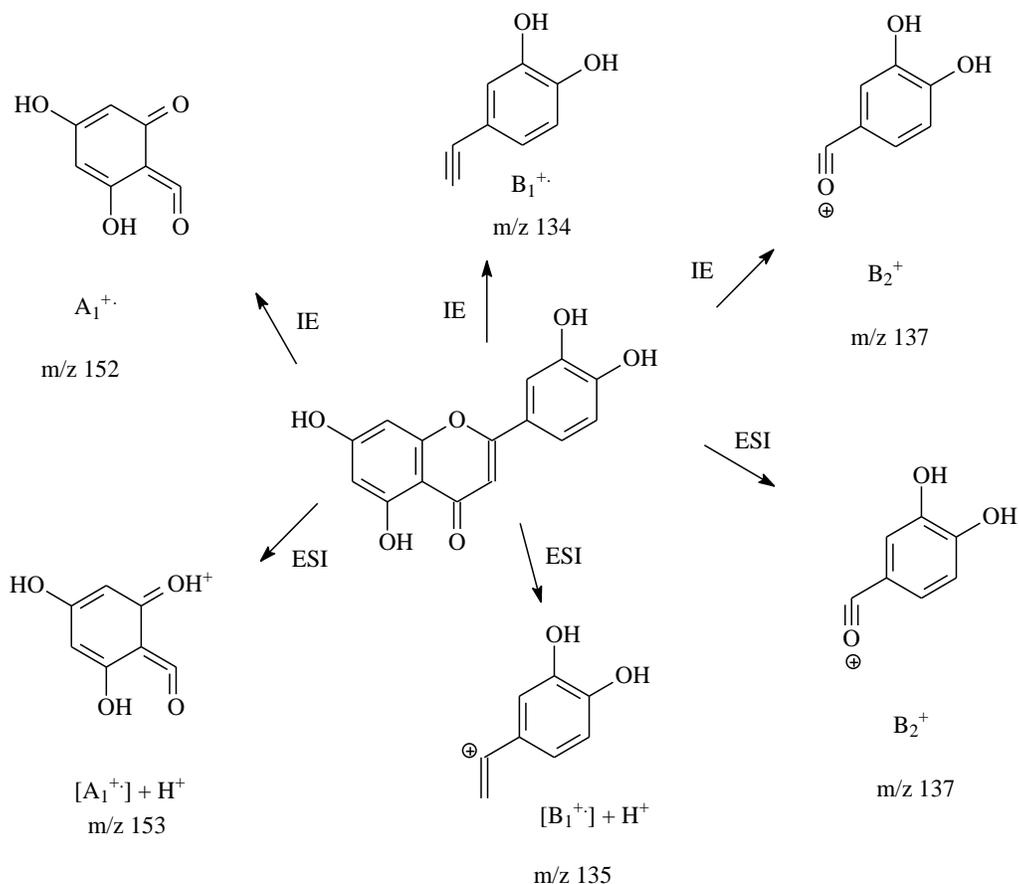


Figura 2.44. Esquema que muestra los fragmentos A_1^+ , B_1^+ y B_2^+ , característicos de la luteolina, una aglicona flavonoide, en espectrometría de masas de impacto electrónico (arriba) y espectrometría de masas ESI (abajo).

El espectro ESI MS/MS del kaemferol, muestra de manera similar los iones m/z 287 $[M+H]^+$, 153 $[A_1^++H]^+$ y 121 $[B_2+H]^+$.

En el caso de los espectros de masas ESI de glicósidos, estos ya permiten reconocer compuestos tales como C-glicósidos, por fragmentos característicos como la pérdida de $C_4H_8O_4$ (120 Da). Además, estos espectros ESI, muestran fragmentos de los O-glicósidos flavonoides como son las pérdidas de una o más unidades de carbohidratos ligados. Por ejemplo, el espectro de masas de la hesperidina muestra un pico ión cuasimolecular m/z 611 y los fragmentos m/z 465 $[M+H-146]$ y 303 $[M+H-308]^+$ por la pérdida de una unidad de ramnosa (146 Da) y una de rutinosa (308 Da) respectivamente. El espectro de masas ESI de la flavanona isosakuranetina-7-O-apiósido, muestra el ión cuasimolecular m/z 581 ($M + H^+$) y los fragmentos m/z 449 ($M - \text{pentosa}$), 419 ($M - \text{hexosa}$) y 287 ($M - \text{pentosa} - \text{hexosa}$).

Cuando se utilizan otras técnicas de ionización como la ionización química a presión atmosférica APICMS, junto con técnicas de separación HPLC y espectrometría de masas tándem MS/MS, se obtienen los iones $[M-H]^+$, y $[M - \text{azúcar} - \text{agua} - H]^+$. Por ejemplo, para la miricetina-3-O-galactósido, se obtienen los iones m/z 479 y 317, correspondientes a los iones $[M-H]^+$ y el peso de la correspondiente aglicona $[M - \text{galactosa} - \text{agua} - H]^+$. Para la quercetina-3-glucósido, se observan los iones m/z 463 y 301, correspondientes a los iones $[M-H]^+$ y el peso de la correspondiente aglicona $[M - \text{glucosa} - \text{agua} - H]^+$.

Para el caso de las antocianinas, la técnica ESI-MS/MS, permite también no solo la determinación del peso molecular sino la determinación de los carbohidratos ligados. Por ejemplo, en el espectro ESI-MS/MS de delfinidina-3-O-(2-O-glucopiranosil-arabinopiranosido), se observan el ión cuasimolecular m/z 599.1199 y el ion m/z 303.0431, correspondiente al peso de la sola aglicona. Además, estas modernas técnicas de espectrometría de masas permiten el análisis más rápido de las antocianinas en muestras vegetales.

Hidrólisis ácida y alcalina

Los O-glicósidos flavonoides se pueden hidrolizar en presencia de ácidos para liberar los carbohidratos ligados y la correspondiente aglicona flavonoide. En general se utiliza HCl 2N: metanol 1:1 refluendo durante 1 hora. Los O-glucurónidos flavonoides requieren condiciones más fuertes para su hidrólisis y ésta se realiza con HCl 2N refluendo a 100°C durante 2 horas. Los C-glicósidos no se hidrolizan en estas condiciones, pero pueden sufrir el reordenamiento de Wessley-Moser, como en el caso de la vitexina.

En condiciones alcalinas fuertes (p. ej. reflujo con NaOH 2N, 100°C, 1 hora) el núcleo flavonoide se rompe por el anillo central, liberando sustancias de menor peso molecular.

Relaciones Estructura-Actividad Biológica

Las diferentes actividades biológicas reportadas para las diferentes clases de flavonoides son tema de revisión permanente por diferentes autores. La presencia o ausencia de algunas características químicas determina la mayor o menor actividad biológica. De los estudios *in vitro*, se resume que en general, el enlace doble C=C entre los carbonos 2 y 3, el carbonilo en C-4 y los grupos hidroxilos en 3' y 4' (grupo catecol); son muy importantes para las actividades antiviral, antibacteriana, antioxidante, anti cáncer, antiinflamatoria, anti diabética, cardio protectora, anti neuropatológica, inhibidora de enzimas, etc. Otras características como la presencia de grupos metoxilos, la presencia de carbohidratos ligados y el número de hidroxilos presentan resultados variables en cuanto a las actividades biológicas mencionadas, especialmente la glicosilación, la cual lleva a la disminución de varias de estas actividades biológicas.

La presencia de grupos hidroxilos en C-5, C-7 muestra relación con la actividad inhibidora de enzimas como la carbonil reductasa-1 CBR1; que es un inconveniente en la quimioterapia del cáncer; contra la glutaminil ciclasa QC, importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer; y sobre peroxidasa, lo cual puede ser útil para enfermedades asociadas a la glándula tiroides.

Por otro lado, la presencia de grupos hidroxilos en C-3 y C-3' se ha asociado a la actividad cardíaca de algunos flavonoides como quercetina y fisetina.

Varios autores mencionan la presencia del sistema 4-cromenona (también denominado 4-benzopirona), como una característica común importante de no solo varios flavonoides, sino otros compuestos naturales, con actividad anti cáncer.

Para el caso particular de la actividad antioxidante, en la literatura científica se encuentran gran cantidad de procedimientos para medir esta actividad no solo en los flavonoides o las muestras que los contengan, sino para muchos otros compuestos naturales. No obstante, un ensayo inicial que sirve de indicio de la actividad antioxidante es el ensayo con el reactivo comúnmente denominado DPPH, que es la abreviatura del nombre inglés del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Este reactivo de color violáceo en solución alcohólica, cuando se pone en contacto con sustancias que captan radicales libres, se reduce y cambia a una coloración amarilla en solución. Por lo tanto, los cambios de la absorbancia pueden medirse con un espectrofotómetro UV-visible, y se puede determinar la mayor o menor actividad captadora de radicales libres, de extractos o sustancias de origen natural. La quercetina se utiliza generalmente como control positivo. La solución de DPPH se obtiene disolviendo 4 mg de DPPH en 50 ml de metanol. Se puede realizar un ensayo cualitativo, simplemente analizando las muestras por cromatografía en capa fina. Luego del desarrollo cromatográfico, se elimina la fase móvil, y se rocían las placas con la solución de DPPH al 0.1 % p/v en metanol en la oscuridad. Se dejan reposar durante 5 minutos, luego de lo cual las manchas de los componentes activos se observan de color blanco o amarillento, sobre un fondo de color violeta.

Para el ensayo cuantitativo, se prepara una solución patrón de los extractos crudos en metanol, a una concentración de 10 mg/mL. A partir de esta solución se preparan diluciones hasta obtener soluciones de concentraciones 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , 5×10^{-9} , 5×10^{-10} mg/mL. Las muestras y el estándar de referencia se preparan a una concentración de 10 mg/mL. 1.00 mL de cada muestra y solución estándar diluida, se mezcla con 1.00 ml de solución de DPPH, y se deja actuar durante 30 minutos. La absorbancia UV-visible de estas soluciones se lee a 517 nm.

Metabolismo

Aunque aún existen muy pocos estudios sobre el metabolismo en humanos de los flavonoides, se encuentran algunos reportes de estudios *in vivo* relacionados con el consumo de jugos de cítricos en Estados Unidos, Australia, Brasil y China. En este último caso se observa que después de 4-12 horas de su consumo, los flavonoides como hesperetina y naringenina se metabolizan en cerca de un 80%, y en la orina se observan unos 35 catabolitos. El estudio *Blue Mountains Eye*, realizado durante 14 años con la participación de 2349 personas, demuestra que el consumo moderado a alto de flavonoides naturales en la dieta, es benéfico para la salud.

Drogas aceptadas en Colombia y otras plantas que contienen flavonoides

La legislación colombiana, a través del Instituto para la Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Invima, tiene establecido un listado de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos. Este listado el cual es revisado periódicamente contiene una gran cantidad de plantas, que actualmente se saben que contienen dentro de sus metabolitos secundarios, a los flavonoides. A continuación, y a manera de ejemplo se citan solo algunas de ellas, y se mencionan otras que no están incluidas en el listado.

Abedul. Las hojas de *Betula sp.* (Betuláceas) contienen glicósidos de quercetina y miricetina.

Acacia. Las flores de *Robinia pseudoacacia* (Fabáceas) contienen robinina.

Árnica. Las flores de *Arnica montana* (asteráceas) contienen quercetina-3-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido y kaemferol-3-O-glucósido entre otros. Esta droga es de venta libre en Colombia y se usa como antiinflamatorio y analgésico de uso externo.

Bastoncillo dorado. *Solidago virgaurea* (Asteráceas) contiene glicósidos de quercetina y kaemferol.

Bodas de Plata. Corresponde a la *Potentilla anserina* (Rosáceas) que contiene glicósidos de quercetina y miricetina.

Cactus. Las flores de *Cereus grandiflorus* (Cactáceas) contienen glicósidos de iso-ramnetina y rutina.

Caléndula. Las flores de *Calendula officinalis* (Asteráceas) contienen glicósidos de iso-ramnetina y quercetina. En Colombia fue aprobada por el Ministerio de Salud para su uso medicinal como antiinflamatorio. El extracto alcohólico mostró efecto positivo en el tratamiento de úlceras varicosas y lesiones en la piel.

Cardo mariano. Los frutos de *Sylibum marianum* (Asteráceas) contienen flavolignanos, silibina, silicristina, silidianina, silimarina, etc. La silimarina es hepatoprotector y se utiliza en

el tratamiento de trastornos digestivos funcionales. En Colombia está aprobado como coadyuvante en cuadros de hepatotoxicidad e insuficiencia hepatobiliar.

Cidra (cáscara). El pericarpio del fruto de *Citrus medica* (Rutáceas) contiene eriocitrina, rutina, etc.

Cola de caballo. Las partes aéreas de *Equisetum arvense* (Equisetáceas) contienen glicósidos de luteolina, isoquercitrina y equisetrina. En Colombia están aprobadas las especies *Equisetum bogotense* y *Equisetum giganteum* L. para uso como diuréticos.

Endrino. Las flores de *Prunus spinosa* (Rosáceas) contienen glicósidos de quercetina y kaemferol.

Espino. La droga la constituyen las hojas, flores y frutos de *Crataegus sp.* (Rosáceas). Contiene glicósidos de quercetina y apigenina.

Herniaria. *Herniaria sp.* (Cariofiláceas) contiene rutina y narcisina.

Infusión madre. *Leonorus cardiaca* (Lamiáceas) contiene rutina.

Lespedeza. Corresponde a *Lespedeza capitata* (Leguminosas). El extracto alcohólico se usa como estimulante de la eliminación renal.

Limón (cáscara). Además del aceite esencial, el cual ha sido utilizado en la elaboración de diferentes fragancias y saborizantes, el pericarpio del fruto de *Citrus limon* (Rutáceas) contiene hesperidósido el cual se utiliza en el tratamiento de hemorroides.

Manzanilla Romana. Las flores de *Anthemis nobilis* (Asteráceas) contienen apigenina-7-O-glucósido y luteolina-7-O-glucósido.

Manzanilla. Las flores de *Matricaria chamomilla* (Asteráceas) contienen quercimeritrina, glicósidos de apigenina, luteolina y patuletina. Esta es una planta medicinal aprobada en Colombia y se usa para trastornos digestivos y en el tratamiento de inflamaciones e irritaciones de la piel y las mucosas.

Naranja amarga. El pericarpio del fruto de *Citrus aurantium* (Rutáceas) contiene eriocitrina, rutina, naringenina, naringina, etc.

Nogal. Las hojas de *Juglans regia* (Juglandáceas) contienen hiperósido y otros glicósidos flavonoides. En Colombia está aprobada *Juglans cinerea* (nogal blanco), cuyas hojas se usan como antidiarréico.

Ortosifonis. Las hojas de *Orthosiphon spicatus* (Lamiáceas) contienen sinensetina, escutelareína y eupatorina.

Pensamiento. Corresponde a *Viola tricolor* (Violáceas). Contiene glicósidos de quercetina. Es una planta medicinal aceptada en Colombia. Sus hojas y flores se usan como antitusivo.

Pie de gato. Las flores de *Helichrysum arenarium* (Asteráceas) contienen glicósidos de naringenina, kaemferol, apigenina y luteolina.

Primavera. Las flores de *Primula sp.* (Primuláceas) contienen glicósidos de quercetina, gossipetina y kaemferol.

Pycnogenol®. El pycnogenol es un extracto de la corteza del pino marino francés *Pinus maritima* Lamk. (Pináceas), que contiene bioflavonoides, catequina, ácidos fenólicos y procianidinas (también denominadas leucoantocianidinas). Entre sus efectos están la inhibición de la agregación plaquetaria y la inhibición de formación de trombos. Es comparativamente más activo contra los radicales libres, que el té verde y el ginkgo. Existen estudios sobre su acción benéfica en pacientes con insuficiencia venosa crónica, con manifestaciones como las venas várices.

Reina de los prados. Las flores de *Filipendula ulmaria* (Rosáceas) contienen espiracósido, hiperósido y avicularina.

Retama. *Sarothamnus scoparius* (Fabáceas) contiene escoparina y vitexina.

Ruda. *Ruta graveolens* (Rutáceas) contiene rutina. En Colombia está aprobado el uso de las partes aéreas como emenagogo.

Sauco. Las flores de *Sambucus niger* (Caprifoliáceas) contienen glicósidos de quercetina, rutina, hiperósido, etc. En Colombia se usan flores y frutos maduros como expectorante. Las hojas como laxante y coadyuvante en el tratamiento de estreñimiento.

Sofora. Las yemas de *Sophora japonica* (Fabáceas) contienen rutina (ca. 20%).

Tilo. Las flores de *Tilia sp.* (Tiliáceas) contienen glicósidos de quercetina, kaemferol y miricetina.

Trigo sarraceno. Las flores de *Fagopyrum sculentum* (Poligonáceas) están aprobadas en Colombia y se usan contra la fragilidad capilar.

Tusílago. Las flores de *Tussilago farfara* (Asteráceas) contienen glicósidos de quercetina.

Verónica. *Veronica officinalis* (Escrofulariáceas) contiene luteolina-7-O-glucósido y rutina.

Yerbasanta. Corresponde a *Eriodictyon glutinosum* (Hidrofiláceas). Contiene homoeridictiol, eriodictiol, etc.

Fuentes de antocianinas

Las antocianinas debido a sus propiedades como verdaderos pigmentos vegetales y a que son fácilmente degradados en el intestino, se utilizan principalmente como colorantes de medicamentos y alimentos. Se extraen de plantas comestibles como las uvas negras (*Vitis vinifera*, ampelidáceas), la mora, la fresa, el repollo morado, el pericarpio del rábano rojo, el

grosellero negro (*Ribes nigrum*, saxifragáceas), etc. Las antocianinas de los frutos y hojas del arándano, *Vaccinium myrtillus* L., ericáceas, presentan propiedades vasoprotectoras y contra desórdenes oftalmológicos, y se comercializa el extracto con el nombre de Myrtocyan®.

Problemas

1. Del extracto metanólico de la planta entera *Polanisia dodecandra*, se aisló por métodos cromatográficos una sustancia con actividad antimitótica potente y con las siguientes características:

Prismas amarillos P.F. 176-7°C

UV (MeOH): 257, 278, 345 nm

UV (MeOH+NaOMe): 280, 396 nm

EMIE: 404.1110 (74%), 389 (100), 371 (8), 359 (10), 331 (12), 303 (8), 275 (9), 211 (14), 202 (8), 183 (13), 164 (10), 151 (17), 123 (5).

RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.88 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 4.11 (s, 3H), 7.00 (d, 1H, J=7.0 Hz), 7.77 (d, 1H, J=2.2 Hz), 7.78 (dd, 1H, J=2.2 y 7.0 Hz), 12.40 (s, 1H).

RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 56.1, 60.1, 61.2, 61.7, 62.1, 107.5, 110.5, 114.6, 121.6, 123.7, 132.9, 136.2, 138.9, 144.9, 145.6, 149.0, 149.1, 152.9, 155.8, 179.4 ppm.

Determine la estructura más probable para esta sustancia. Simule sus espectros RMN y compárelos. Compare la potencial actividad antioxidante de esta sustancia y la de la quercetina.

2. De la fracción soluble en n-butanol del extracto metanólico de las partes aéreas de *Lysionotus pauciflorus* (Gesneriáceas) se aisló la nevadensina una sustancia que ha sido reportada como poseedora de actividad antiinflamatoria e hipotensora. Sus características son las siguientes:

P.F. 198-199°C

UV(metanol): 283, 330 nm

UV (AlCl₃): 210, 352 nm

UV (AlCl₃/HCl): 308, 351 nm

UV (NaOAc): 283, 273 nm

UV (H₃BO₃/NaOAc): 283, 321 nm

EMIE: m/z 344, 329, 277, 197, 169, 133

RMN- ^1H (CDCl_3 , 360 MHz) δ 3.90 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 6.59 (s, 1H), 7.03 (2H, d, $J=8.9$ Hz), 7.89 (2H, d, $J=8.9$ Hz), 11.82 (s, 1H).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 90 MHz) δ 55.6, 60.2, 61.2, 103.0, 103.1, 114.7, 123.0, 128.0, 128.2, 131.6, 145.4, 148.4, 150.9, 162.4, 163.1, 182.3 ppm.

Determine la estructura más probable y el nombre sistemático de esta sustancia. Compare su potencial actividad antitumoral con la del kaempferol.

3. Una sustancia vegetal presenta las siguientes características espectrales:

Espectro de masas de impacto electrónico:

m/z = 300 (100%), 299 (12), 272 (4), 257 (10), 155 (3), 121 (13), 93 (4).

Espectro de RMN- ^1H (60 MHz, CCl_4): δ 3.83 (3H, s); 6.18 (d, 1H, $J=2$ Hz); 6.47 (d, 1H, $J=2$ Hz); 6.85 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.00 (d, 2H, $J=8$ Hz).

Espectros UV: MeOH: 366, 266 nm; NaOMe: 418 nm (desc.); AlCl_3 : 423, 270 nm; AlCl_3/HCl : 426, 267 nm; NaOAc: 369, 265 nm; $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOAc}$: 366, 265 nm

Determine la estructura más probable para esta sustancia, asigne las señales de RMN y el correspondiente nombre sistemático. Simule su espectro RMN y compare con el dado en el problema.

4. Una sustancia vegetal presenta las siguientes características espectrales:

Espectro de masas de impacto electrónico: m/z = 316 (100%), 301 (24), 288 (19), 285 (27), 273 (28), 271 (28), 166 (5), 137 (15), 109 (11).

Espectro de RMN- ^1H (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 3.90 (3H, s); 6.33 (d, 1H, $J=2$ Hz); 6.65 (d, 1H, $J=2$ Hz), 6.85 (d, 1H, $J=8$ Hz); 7.62 (dd, 1H, $J=8$ y 2 Hz); 7.58 (d, 1H, $J=2$ Hz); 12.45 (s, 1H).

Espectros UV: MeOH: 372, 255 nm; NaOMe: 418, 294 nm; AlCl_3 : 455, 275 nm; AlCl_3/HCl : 425, 268 nm; $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOAc}$: 386, 259 nm

Determine la estructura más probable para esta sustancia, asigne las señales de RMN y el correspondiente nombre sistemático. Compare su actividad anticáncer de seno potencial contra la fisetina.

5. Del extracto de la corteza de *Colebrookea oppositifolia* (Labiadas), usada en China para el tratamiento de fracturas, heridas y artritis reumatoide, se aislaron dos compuestos con las siguientes características:

Compuesto A:

Polvo amarillo, $[\alpha]_D^{25} = -27^\circ$ (DMSO, c 0.48).

IR (KBr): 3270, 1650, 1600, 1580, 1485, 1441, 1350, 1290, 1196, 1112, 1065, 1045, 840, 800, 765, 680 cm^{-1} .

EM-FAB: m/z 447 [M+H].

EMIE: m/z 284 (100), 266 (41), 238 (44), 181 (15), 153 (35), 139 (32), 102 (48).

RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.89 (s, 1H), 8.10 (2H, dd, J=7.6 y 1.6 Hz), 7.60 (3H, m), 6.98 (1H, s), 7.03 (1H, s), 5.05 (1H, d, J=7.6 Hz), 3.90 (s, 3H).

RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 56.56, 60.91, 69.95, 74.13, 76.54, 77.21, 91.77, 102.05, 104.93, 105.16, 126.35 (dos carbonos), 128.31, 129.05 (dos carbonos), 130.62, 132.01, 151.60, 152.75, 158.99, 163.39, 182.31 ppm.

Compuesto B:

Polvo amarillo, $[\alpha]_D^{25} = -48^\circ$ (DMSO, c 0.36).

IR (KBr): 3430-3240, 1650, 1610, 1560, 1500, 1442, 1350, 1280, 1240, 1162, 1075, 1040, 850, 830, 751, 740 cm^{-1} .

EM-FAB: m/z 432 [M $^+$].

EMIE: m/z 432, 280, 270, 242, 152, 124, 118.

RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.88 (s, 1H), 7.87 (1H, d, J=8.1 Hz), 7.53 (1H, dd, J=8.4 y 7.4 Hz), 7.33 (1H, d, J=8.4 Hz), 7.20 (1H, dd, J=7.5 y 7.8 Hz), 7.00 (1H, s), 6.45 (1H, s), 6.20 (1H, s), 5.10 (1H, d, J=8 Hz).

RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 60.63, 69.62, 73.28, 76.73, 77.12, 93.69, 98.76, 100.26, 103.77, 110.19, 115.53, 120.32, 121.91, 129.00, 132.73, 155.35, 157.64, 160.76, 161.36, 164.30, 181.79 ppm.

Determine las estructuras más probables para estas dos sustancias. Asígneles el nombre sistemático y compare su potencial actividad antioxidante.

6. Prediga, simule y compare los espectros RMN-¹H de los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, vainillina, anetol, podofilotoxina, 3,5,7,3',4'-pentehidroxi-6-metilflavona, 3,5,7,3',4'-pentametoxi-6-metilflavona, 4,5,7-trihidroxi-2-metilntraquinona, 4,5,7-trimetoxi-2-metilntraquinona.

Cannabis

La marihuana corresponde a la especie vegetal *Cannabis sativa*. El uso terapéutico de esta planta se ha incrementado recientemente, y a diferencia de muchos medicamentos actuales no surgió de un desarrollo científico, sino que es usado por muchas personas con propósitos recreativos, en vaporizaciones, en tés, e inclusive en galletas y otros alimentos.

Se tienen registros físicos del uso de la marihuana desde el año 2727 AC, en ellos se describe su uso psicoactivo y medicinal. Fue utilizada durante muchos años en Asia y Europa, y fue traída a América en 1619 para uso en la industria textil. A principios del siglo 19, era común encontrar en las farmacias norteamericanas las tinturas de marihuana, y en la farmacopea americana se describía su uso contra la migraña, la depresión y el dolor; pero en 1937 se prohibió su venta y uso en los Estados Unidos. En 1970 se incluyó en la lista de sustancias controladas del Departamento de Control de Drogas y Estupefacientes de los Estados Unidos (DEA), por considerarla una sustancia altamente peligrosa y muy adictiva. En 1996 el estado de California fue el primero en legalizar el uso de la marihuana para fines medicinales.

Dentro de las casi 500 sustancias reportadas en la droga (incluyendo terpenos, aminoácidos, ácidos grasos, hidrocarburos, flavonoides, carbohidratos, etc.); están unos 70 compuestos C₂₁ que son a la vez terpenos y compuestos fenólicos denominados cannabinoides. Los más conocidos y estudiados, son los compuestos tetrahidrocannabinol THC, el cual es un compuesto psicoactivo, y el cannabidiol CBD, al cual se le atribuyen propiedades benéficas para la salud. El contenido de THC se utiliza para clasificar las plantas de marihuana en dos variedades: como droga y como planta fibrosa. Si el contenido de THC es menor del 0.2% se la considera como variedad fibrosa, y si es mayor se la considera variedad como droga.

Es interesante anotar que a pesar de que ya se vende comercialmente una versión sintética del tetrahidrocannabinol THC, esta presenta mayores efectos colaterales indeseables, que el obtenido por extracción de la planta. La droga es usada para reducir el vómito en los tratamientos de quimioterapia del cáncer, para mejorar el apetito en personas con sida, para el tratamiento del dolor crónico, contra la epilepsia y para los espasmos musculares.

Los cannabinoides se extraen a partir de la droga con diferentes solventes que incluyen el alcohol (metanol o etanol), cloroformo, butano, hexano, etc.; pero más recientemente se utilizan métodos como la extracción con fluidos supercríticos con dióxido de carbono y etanol, con rendimientos hasta del 92%. También con solventes eutécticos (DES), se

encuentra que la mezcla 1:1 de cloruro de colina y tartrato de dietilo se obtienen buenos rendimientos para la extracción del CBD, con condiciones de temperatura de extracción de 48°C y tiempo de extracción de 55 minutos. Siendo esta última técnica recomendable por los beneficios en cuanto a rendimiento, los costos bajos y la poca contaminación ambiental, que se generan.

Los cannabinoides se pueden analizar mediante técnicas como la cromatografía de gases y HPLC acopladas a espectrometría de masas.

Para los análisis mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se preparan los derivados trimetilsililados (TMS). En el caso de algunos cannabinoides que contienen el grupo carboxilo, los espectros de masas de los derivados trimetilsililados presentan fragmentaciones características. Por ejemplo, el espectro de masas del derivado TMS del ácido cannabigerólico (CBGA), muestra los iones m/z 576 (M^+), 561 ($M^+ - \text{metilo}$, muy intenso), 486 ($M^+ - \text{TMSOH}$), 453 ($M^+ - 123$), 417 ($M^+ - 159$), 147, 73 (TMS^+), entre otros. El espectro de masas del derivado TMS del ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) muestra los iones m/z 502 (M^+), 487 ($M^+ - \text{metilo}$, muy intenso), 413 ($M^+ - \text{TMSO}$), 147, 73 (TMS^+). La figura 2.45. esquematiza la formación de algunos de estos iones.

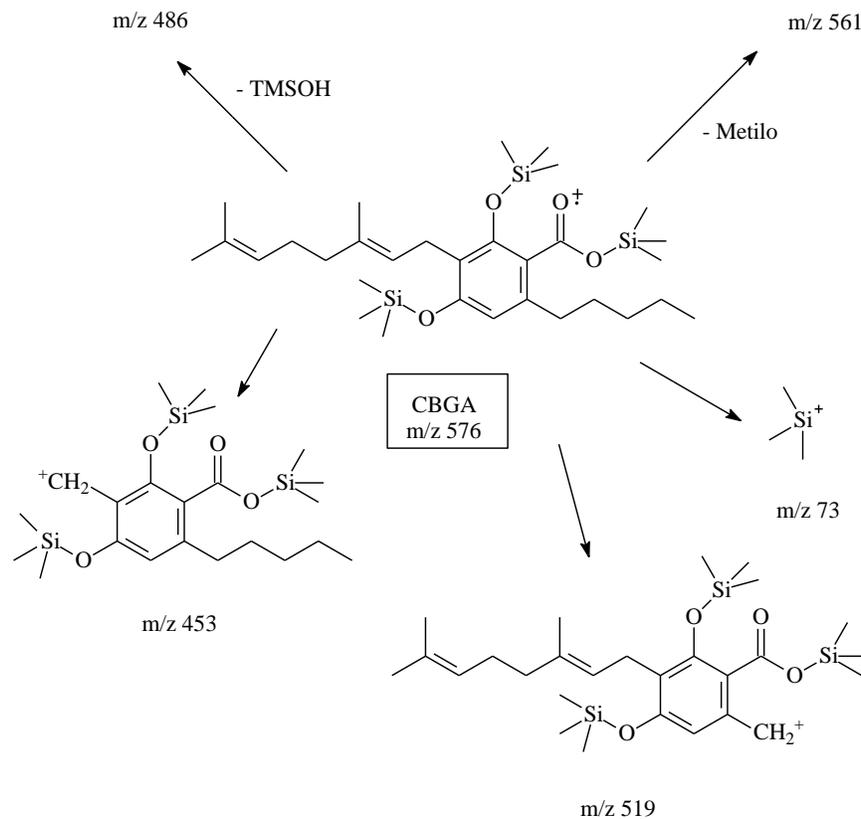
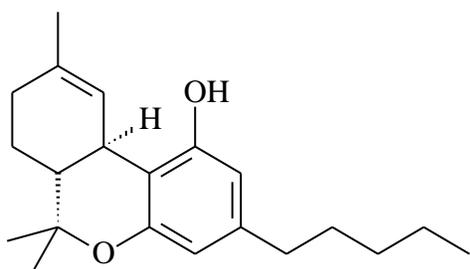


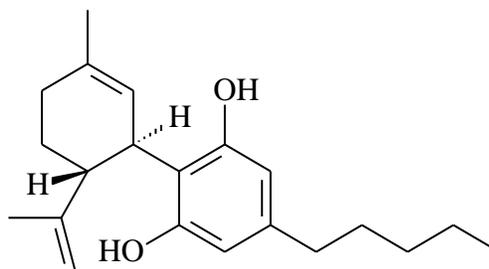
Figura 2.45. Esquema de la formación de algunos iones en espectrometría de masas de impacto electrónico del ácido cannabigerólico (CBGA).

Mediante el uso de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización electrónica, desarrollada recientemente, es posible obtener espectros de masas bien definidos del cannabinol CBN, el cannabidiol y el tetrahidrocannabinol. También se pueden analizar los cannabinoides mediante HPLC con un detector de arreglo de diodos

Los espectros ultravioletas de compuestos con el cromóforo tipo meta-dihidroxibenceno, como el cannabidiol, muestran máximos de absorción en 210, 230i, 275 nm. Mientras los que tienen cromóforos tipo ácido 2,4-dihidroxibenzoico, como es el caso del ácido cannabigerólico, muestran máximos de absorción alrededor de 225, 270 y 305 nm.



Tetrahidrocannabinol (THC)



Cannabidiol (CBD)

Desde el punto de vista biogénico, teniendo en cuenta la estructura química de estas sustancias, se reconocen dos partes, a la izquierda se puede apreciar un monoterpeneo, y la parte derecha de la molécula es derivada de una cadena policetídica, lo que permite establecer que se trata de sustancias originadas desde la acetilcoenzima-A, a través de dos vías: la del ácido mevalónico y la de la malonilcoenzima-A a través de las cadenas policetídicas. La figura 2.46, muestra un esquema propuesto para la biogénesis de ambos compuestos.

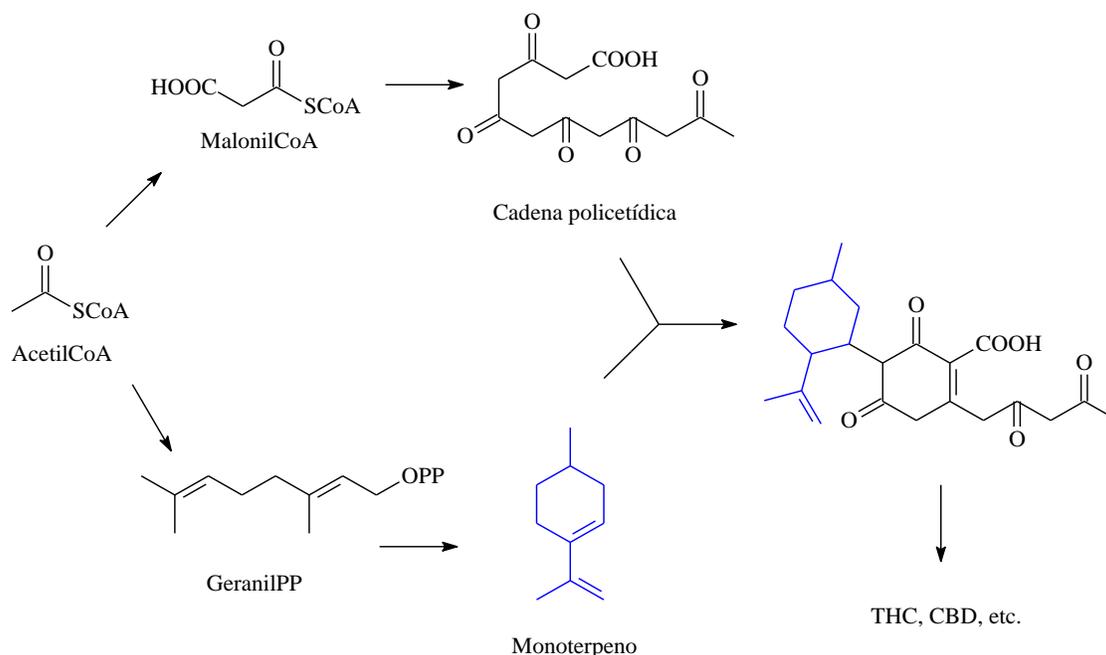


Figura 2.46. Esquema biogénico que explica la formación de los cannabinoides a partir de acetilcoenzima-A.

Referencias bibliográficas

1. Jiang M, Zhang H. Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 42:1–6.
2. Yang L, Yang C, Li C, Zhao Q, Liu L, Fang X, Chen XY. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. *Sci. Bull.* 2016; 61(1): 3–17.
3. Ma D, Sun D, Wang C, Li Y, Guo T. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2014; 80: 60-66.
4. Tzin V, Galili G. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Mol. Plant* 2010; 3(6): 956–972.
5. Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. Research Advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review *Ind. Crops Prod.* 2016; 94: 812–833.
6. Blatt S, Rickl V. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* 2nd ed. 1996. 2nd printing 2009 Edition, Springer. Chapter 2.
7. Schripsema J, Dagnino D. Elucidation of the substitution pattern of 9,10-anthraquinones through the chemical shifts of perihydroxyl protons. *Phytochemistry* 1996; 42: 177-184.
8. El-Kashak WA, Elshamy AI, Mohamed TA, Abd El-Nasser GEG, Saleh IA, Umeyama A. Rumpictuside A: Unusual 9,10-anthraquinone glucoside from *Rumex pictus* Forssk *Carboh. Res.* 2017; 448: 74-78.

9. Dimmer JA, Núñez Montoya SC, Mendoza CS, Cabrera JL. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae) Phytochemistry 2017; 137: 94-100.
10. Dimmer JA, Cabral FV, Sabino CP, Ramos Silva C, Nuñez-Montoya SC, Cabrera JL, Ribeiro MS, Natural anthraquinones as novel photosensitizers for antiparasitic photodynamic inactivation. Phytomedicine 2019; 61: 152894.
11. Li P, Lu Q, Jiang W, Pei X, Sun Y, Hao H, Hao K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rhubarb anthraquinones extract in normal and Disease rats. Biomed. Pharmacother. 2017; 91: 425–435.
12. Zhang J, Fub Y, Li L, Liu Y, Zhang C, Yu D, Ma Y, Xiao Y. Pharmacokinetic comparisons of major bioactive components after oral administration of raw and steamed rhubarb by UPLC-MS/MS. J. Pharm. Biomed. Anal. 2019; 171: 43–51.
13. Samavati R, Ducza E, Hajagos-Tóth J, Gaspar R. Herbal laxatives and antiemetics in pregnancy. Reprod. Toxicol. 2017; 72: 153–158.
14. Khan S, Jabeen Mirza KJ, Al-Qurainy F, Zainul Abidin MZ. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. Saudi J. Biol. Sci. 2011; 18: 287–292.
15. Brkana SR, Geric M, Gajski G, Vujcic V, Garaj-Vrhovac V, Kremer D, Domijan AM. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2013; 73: 923-929.
16. Kosalec I, Kremer D, Locatelli M, Epifano F, Genovese S, Carlucci G, Randic M, Zovko Konci M. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. Food Chem. 2013; 136: 335–341.
17. Zhang Y, Zhou L, Ma W, Shi X, Zhang H, Shi X. Bidirectional solid fermentation using *Trametes robiniophila* Murr. for enhancing efficacy and reducing toxicity of rhubarb (*Rheum palmatum* L.). J. Tradit. Chin. Med. Sci. 2017; 4: 306-313.
18. Furkan M, Alam MT, Rizvi A, Khan K, Shamsuzzaman AA, Naeem A. Aloe emodin, an anthraquinone from *Aloe vera* acts as an anti-aggregatory agent to the thermally aggregated hemoglobin. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2017; 179: 188–193.
19. Sanchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Sendon R, Sanches-Silva A. *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. Trends Food Sci. Technol. 2017; 61: 94-102.
20. Parlati L, Voican CS, Perlemuter K, *Aloe vera*-induced acute liver injury: A case report and literature review. Clin. Res. Hepat. Gastroent. 2017; 41: e39—e42.
21. Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier PO, Sene D, Bergmann JF. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort? Pharmacol. Res. 2017; 118: 82–92.

22. Machatova Z, Barbierikova Z, Poliak P, Jancovicova V, Lukes V, Brezova V. Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. *Dyes Pigm.* 2016; 132: 79-93.
23. Stathopoulou K, Valianou L, Skaltsounis AL, Karapanagiotis I, Magiatis P. Structure elucidation and chromatographic identification of anthraquinone components of cochineal (*Dactylopius coccus*) detected in historical objects. *Anal. Chim. Acta* 2013; 804: 264–272.
24. Redaelli M, Mucignat-Caretta C, Isse AA, Gennaro A, Pezzani R, Pasquale R, Pavan V, Crisma M, Ribaldo G, Zagotto G. New naphthoquinone derivatives against glioma cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 96: 458-466.
25. Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 93: 218–229.
26. Gülden M, Appel D, Syska M, Uecker S, Wages F, Seibert H. Chrysin and silibinin sensitize human glioblastoma cells for arsenic trioxide. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 105: 486-497.
27. Patil KK, Meshram RJ, Dhole NA, Gacche RN. Role of dietary flavonoids in amelioration of sugar induced cataractogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016; 593: 1-11.
28. Bie B, Sun J, Guo Y, Li Y, Jiang W, Yang J, Huang C, Li Z. Baicalein: A review of its anti-cancer effects and mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 93: 1285–1291.
29. Lani R, Hassandarvish P, Shu MH, Phoon WH, Chu JJH, Higgs S, Vanlandingham D, Bakar SA, Zandi K. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antivir. Res.* 2016; 133: 50-61.
30. Salmani JMM, Zhang XP, Jacob JA, Chen BA. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future perspectives. *Chin. J. Nat. Med.* 2017; 15: 321-329.
31. Zhu Y, Di S, Hu W, Feng Y, Zhou Q, Gong B, *et al.*, A new flavonoid glycoside (APG) isolated from *Clematis tangutica* attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via activating PKC ϵ signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 2017; 1863: 701–711.
32. Feng CP, Tang HM, Huang S, Hou SZ, Liang J, Huang W, Lai XP. Evaluation of the effects of the water-soluble total flavonoids from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) H. Hara on apoptosis in HepG2 cell: Investigation of the most relevant mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* 2016; 188: 70–79.
33. George VC, Dellaire G, Rupasinghe V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J. Nutr. Biochem.* 2017; 45: 1–14.
34. Kwon Y. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2017; 95: 39–43.
35. Patel K, Patel DK. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. *J. Tradit. Complem.* 2017; 7: 360-366.

36. Han T, Li J, Xue J, Li H, Xu F, Cheng K, Li D, Li Z, Gao M, Hua H. Scutellarin derivatives as apoptosis inducers: Design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 135: 270-281.
37. Jo WR, Park HJ. Antiallergic effect of fisetin on IgE-mediated mast cell activation *in vitro* and on passive cutaneous anaphylaxis (PCA). *J. Nutr. Biochem.* 2017; 48: 103–111.
38. Syed DN, Adhami VM, Khan N, Khan MI, Mukhtar H. Exploring the molecular targets of dietary flavonoid fisetin in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2016; 40–41: 130–140.
39. Zheng W, Feng Z, You S, Zhang H, Tao Z, Wang Q, Chen H, Wu Y. Fisetin inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2017; 45: 135–147.
40. Murayyan AI, Manohar CM, Hayward G, Neethirajan S. Antiproliferative activity of Ontario grown onions against colorectal adenocarcinoma cells. *Food Res. Intern.* 2017; 96: 12–18.
41. Sharma K, Ko EY, Assefa AD, Ha S, Nile SH, Lee ET, Park SW. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *J. food drug anal.* 2015; 23: 243-252.
42. Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Punia S, Mukherjee TK. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. *J. Funct. Foods* 2017; 30: 203–219.
43. Syed HO. Biophenols pharmacology against the amyloidogenic activity in Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 89: 396–413.
44. Santos BL, Oliveira MN, Coelho PL, Pitanga BP, da Silva AB, Adelita T. *et al.* Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chemico-Biol. Interac.* 2015; 242: 123-138.
45. Choi I, Lee JY, Lacroix M, Han J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food Chem.* 2017; 218: 122–128.
46. Grajeda-Iglesias C, Salas E, Barouh N, Baréa B, Figueroa-Espinoza MC. Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from hibiscus flowers. *Food Chem.* 2017; 230: 189–194.
47. Teng H, Fang T, Lin Q, Song H, Liu B, Chen L. Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends Food Sci. Technol.* 2017; 66: 153-165.
48. Gowd V, Jia Z, Chen W. Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes. A review of recent advances. *Trends Food Sci. Technol.* 2017; 68: 1-13.

49. Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, Borutaite V. Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. *Pharmacol. Res.* 2016; 113: 808–815.
50. Athira KV, Madhana RM, Lahkar M. Flavonoids, the emerging dietary supplement against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Chemico-Biol. Interac.* 2016; 248: 18-20.
51. Verma M, Gupta SJ, Chaudhary A, Vipin K. Garg VK. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents – A brief review. *Bioorg. Chem.* 2017; 70: 267-283.
52. Gong Y, Qin XY, Zhai YY, Hao H, Lee J, Park YD. Inhibitory effect of hesperetin on α -glucosidase: Molecular dynamics simulation integrating inhibition kinetics. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2017; 101: 32–39.
53. Costa M, Dias TA, Brito A, Proença F. Biological importance of structurally diversified chromenes. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 123: 487-507.
54. Liu X, Zhao W, Wang W, Lin S, Yang L. Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF- κ B and Erk pathway. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92: 429–436.
55. Hu P, Li DH, Jia CC Liu Q, Wang XF, Li ZS, Hua HM. Bioactive constituents from *Vitex negundo* var. *heterophylla* and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *J. Func. Foods* 2017; 35: 236–244.
56. Zhao Y, Wang P, Chen S, Han C, Yan Q, Zheng L, Jia J, Ren Z, Zhen X. Dihydromyricetin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via suppressing microglia-mediated neuroinflammation and activation of ERK1/2-CREB signaling pathway- *J. Func. Foods* 2017; 33: 76–84.
57. Kuppusamy A, Arumugam M, George S. Combining *in silico* and *in vitro* approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of Alzheimer’s disease. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2017; 95: 199–203.
58. Liu Q, Pan R, Ding L, Zhang F, Hu L, Ding B. *et al.* Rutin exhibits hepatoprotective effects in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease by reducing hepatic lipid levels and mitigating lipid-induced oxidative injuries. *Intern. Immunopharmacol.* 2017; 49: 132–141.
59. Guan LP, Liu BY. Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 121: 47-57.
60. Zarev Y, Foubert K, Lucia de Almeida V, Anthonissen R, Elgorashi E , Apers S. *et al.* Antigenotoxic prenylated flavonoids from stem bark of *Erythrina latissimi*. *Phytochemistry* 2017; 141: 140-146.
61. Vauzour D, Camprubi-Robles M, Miquel-Kergoat S, Andres-Lacueva C, Bánáti D, Barberger-Gateau P. *et al.* Nutrition for the ageing brain: Towards evidence for an optimal diet. *Ageing Res. Rev.* 2017; 35: 222-240.

62. Peluso I, Palmery M. Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? *Biomed. Pharmacother.* 2015; 71: 102–107.
63. Martinelli T, Whittaker A, Benedettelli S, Carboni A, Andrzejewska J. The study of flavonolignan association patterns in fruits of diverging *Silybum marianum* (L.) Gaertn. chemotypes provides new insights into the silymarin biosynthetic pathway. *Phytochemistry* 2017; 144: 9-18.
64. Zholobenko A, Modriansky M. Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia* 2014; 97: 122–132.
65. Ma J, Zhang J, Shen Z. Two unusual isoflavonoids from *Campylotropis hirtella* – A new biosynthesis route of flavonoids. *Tetrahedron Lett.* 2017; 58: 1462–1466.
66. Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017; 34: 540–560.
67. Tang X, Zhu D, Huai W, Zhang W, Fu C, Xie X, Quan S, Fan H. Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. *Sep. Purif. Technol.* 2017; 175: 266–273.
68. Blunder M, Orthaber A, Bauer R, Bucar F, Kunert O. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. *Food Chem.* 2017; 218: 600–609.
69. Yang Z, Wu Y, Wu S. A combination strategy for extraction and isolation of multi-component natural products by systematic two-phase solvent extraction- ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition and following conical counter-current chromatography separation: Podophyllotoxins and flavonoids from *Dysosma versipellis* (Hance) as examples. *J. Chromatog. A* 2016; 1431: 184–196.
70. Sang J, Sang J, Ma Q, Hou X, Li C. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. *Food Chem.* 2017; 218: 386–395.
71. Roriza CL, Barros L, Prieto MA, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Ind. Crops Prod.* 2017; 105: 29–40.
72. Harborne JB, Mabry H, Mabry TJ. *The Flavonoids*, 2013, Springer.
73. Markham KR. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London-New York-Paris. 1982, Capítulo 3.
74. Tatsuzawa F, Tanikawa N, Nakayama M. Red-purple flower color and delphinidin-type pigments in the flowers of *Pueraria lobata* (Leguminosae). *Phytochemistry* 2017; 137: 52-56.

75. Maltese F, Erkelens C, van der Kooy F, Choi YH, Verpoorte R. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food Chem.* 2009; 116: 575–579.
76. Xiao K, Han QT, Zhang L, Dai SJ. Two new flavanone glycosides from *Scutellaria galericulata* with antiinflammatory activities. *Phytochemistry Lett.* 2017; 20: 151–154.
77. Yi J, Du G, Yang Y, Li Y, Li Y, Guo F. Chiral discrimination of natural isoflavanones using (R)- and (S)-BINOL as the NMR chiral solvating agents. *Tetrahedron Asymm.* 2016; 27: 1153–1159.
78. Velozo LSM, Ferreira MJP, Santos MIS, Moreira DL, Guimarães EF, Emerenciano VP, Kaplan MAC. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia* 2009; 80: 119–122.
79. Tebou PLF. Flavonoids from *Maytenus buchananii* as potential cholera chemotherapeutic agents. *South African J. Bot.* 2017; 109: 58–65.
80. Wang L, Sang M, Liu E, Banahene PO, Zhang Y, Wang T, Han L, Gao X. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 40: 45–61.
81. Xing J, Xie C, Lou H. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 44: 368–378.
82. Dias HJ, de Melo NI, Miller Crotti AE. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview, in: *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, Dr Jeevan Prasain (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/32680. Available from: <https://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles/electrospray-ionization-tandem-mass-spectrometry-as-a-tool-for-the-structural-elucidation-and-derepl>
83. Bhatt V, Sharma S, Kumar N, Sharma U, Singh B. Simultaneous quantification and identification of flavonoids, lignans, coumarin and amides in leaves of *Zanthoxylum armatum* using UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 132: 46–55.
84. Wanga Y, Johnson-Cicaleseb J, Singha AP, Vorsa N. Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS. *Plant Sci.* 2017; 262: 91–102.
85. Hurst WJ. ed. W, *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, CRC Press, Chapter 5: Gary Takeoka and Lan Dao, Anthocyanins. Boca Raton, 2008.
86. Yang H, Kim HW, Kwon YS, Kim HK, Sung SH. Fast and Simple Discriminative Analysis of Anthocyanins -Containing Berries Using LC/MS Spectral Data. *Phytochem. Anal.* 2017; 28: 416–423.

87. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 2018; 1: 12-23.
88. Li K, Fan H, Yin P, Yang L, Xue Q, Li X, *et al.* Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots. *Arabian J. Chem.* 2018; 11: 159-170.
89. Arai Y, Endo S, Miyagi N, Abe N, Miura T, Nishinaka T. *et al.* Structure–activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1). *Fitoterapia* 2015; 101: 51–56.
90. Li M, Dong Y, Yu X, Zou Y, Zheng Y, Bu X. *et al.* Inhibitory effect of flavonoids on human glutaminy cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24: 2280-2286.
91. Mahfoudi R, Djeridane A, Benarous K, Gaydou EM, Yousf M. Structure-activity relationships and molecular docking of thirteen synthesized flavonoids as horseradish peroxidase inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2017; 74: 201–210.
92. Sun X, Xu B, Xue Y, Li H, Zhang H, Zhang Y. *et al.* Characterization and structure-activity relationship of natural flavonoids as hERG K channel modulators. *Internat. Immunopharmacol.* 2017; 45: 187-193.
93. Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 142: 213-228.
94. Oniszczuk T, Oniszczuk A, Gondek E, Guz L, Puk K, Kocira A. *et al.* Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.). *Saudi J. Biol. Sci.* 2019; 26: 24-30.
95. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. eds. *Natural Products Isolation*, 2nd. Edition, Humana Press, New Jersey USA, 2006, chapter 1.
96. Zenga X, Sua W, Baia Y, Chena T, Yana Z, Wang J. *et al.* Urinary metabolite profiling of flavonoids in Chinese volunteers after consumption of orange juice by UFLC-Q-TOF-MS/MS. *J. Chromatog. B* 2017; 1061–1062: 79–88.
97. Invima, Sala Especializada de Productos Naturales de la Comisión Revisora, Agencia Nacional de Referencia Regional Dirección de Medicamentos y productos Biológicos, Listado de Plantas Medicinales Aceptadas con Fines Terapéuticos, Julio de 2014 (www.invima.gov.co).
98. Aladic K, Jarni K, Barbir T, Vidovic S, Vladic J, Bilic M, Jokic S. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind. Crops Prod.* 2015; 76: 472–478.
99. Seemann B, Alon T, Tsizin S, Fialkov AB, Amirav A. Electron ionization LC-MS with supersonic molecular beams—the new concept, benefits and applications. *J. Mass Spectrom.* 2015; 50: 1252–1263.
100. Candeias NR, Assoah B, Simeonov SP. Production and Synthetic Modifications of Shikimic Acid. *Chem. Rev.* 2018; 118: 10458-10550.

101. Diaz-Muñoz G, Miranda IL, Saroti SK, de Resende DC, Diaz MAN. Chapter 11 - Anthraquinones: An Overview Studies in Natural Products Chemistry Volume 58, 2018, Pages 313-338
102. Sottorff I, Künzel S, Wiese J, Lipfert M, Preußke N, Sönnichsen FD, Imhof JF. Antitumor Anthraquinones from an Easter Island Sea Anemone: Animal or Bacterial Origin? *Mar. Drugs* 2019; 17: 154.
103. Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind. Crops Prod.* 2016; 94 812–833.
104. Xua Y, Wanga Q, Yin Z, Gao X. On-line incubation and real-time detection by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapidly analyzing metabolites of anthraquinones in rat liver microsomes. *J. Chromatog. A* 2018; 1571: 94–106.
105. Anouar EH, Che Osman CP, Weber JFF, Ismail NH. UV/Visible spectra of a series of natural and synthesised anthraquinones: experimental and quantum chemical approaches. *SpringerPlus* 2014; 3: 233.
106. Niedziałkowski P, Czaczyk E, Jarosz J, Wcisło A, Białobrzaska W, Wietrzyk J, Ossowski T. Synthesis and electrochemical, spectral, and biological evaluation of novel 9,10-anthraquinone derivatives containing piperidine unit as potent antiproliferative agents. *J. Mol. Struct.* 2019; 1175: 488-495.
107. Schripsema J, Dagnino D. Elucidation of the Substitution Pattern of 9,10-anthraquinones through the chemical shifts of polyhydrodroxyl protons. *Phytochemistry* 1996; 42: 177-184.
108. Napolitano MP, Kuo PC, Johnson JV, Arslanoglu J, Yost RA. Tandem mass spectrometry of laser-reduced anthraquinones for painted works and dyed cultural artifacts. *Internat. J. Mass Spectrom.* 2017; 421: 14–24.
109. Dimmer JA, Núñez Montoya SC, Mendoza CS, Cabrera JL. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 2017; 137: 94-100.
110. Zhao F, Zhao S, Han JT, Wang YF, Wang YN, Wang CH. Antiviral anthraquinones from the roots of *Knoxia valerianoides*. *Phytochemistry Lett.* 2015; 11: 57–60.
111. Wang J, Qin X, Chen Z, Ju Z, He W, Tan Y. *et al.* Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). *Phytochemistry Lett.* 2016; 15: 13–15.
112. Jang JP, Hwang GJ, Jang M, Takahashi S, Ko SQ, Osada H. *et al.* Aturanosides A and B, Glycosylated Anthraquinones with Antiangiogenic Activity from a Soil-Derived *Streptomyces* Species. *J. Nat. Prod.* 2018 81; 9: 2004-2009.

113. Diaz-Muñoz G, Miranda IL, Sartori SK, de Rezende DC, Diaz MAN. Chapter 1. In: Anthraquinones: An Overview. Studies in Natural Products Chemistry, Volume 58, 2018, Pages 313-338.
114. Stanojković T, Marković V, Matića IZ, Mladenović MP, Petrović N, Krivokuća A. *et al.* Highly selective anthraquinone-chalcone hybrids as potential antileukemia agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018; 28: 2593–2598.
115. Alehaideb Z, Chin KC, Yao MC, Law FCP. Predicting the content of anthraquinone bioactive in Rhei rhizome (*Rheum officinale* Baill.) with the concentration addition model. *Saudi Pharm. J.* 2019; 27: 25-32.
116. Jibril S, Basar N, Sirat HM, Wahab RA, Mahat NA, Nahar L, Sarker SD. Application of Box – Behnken design for ultrasound - assisted extraction and recycling preparative HPLC for isolation of anthraquinones from *Cassia singueana*. *Phytochem. Anal.* 2018: 1 – 9.
117. Guerra AR, Duarte MF, Duarte IF. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66: 10663-10685.
118. Nunes Silva L, Rigon Zimmer K, José Macedo A, Silva Trentin D. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem. Rev.* 2016; 116: 9162–9236.
119. Ghorbani A, Rashidi R, Shafiee-Nick R. Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 111: 947–957.
120. Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 646: 107–112.
121. Aziz N, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *J. Ethnopharmacol.* 2018; 225: 342–358.
122. Kwon Y. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2017; 95: 39–43.
123. Ima E, Yeo C, Lee EO. Luteolin induces caspase-dependent apoptosis via inhibiting the AKT/ osteopontin pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep-1 cells. *Life Sci.* 2018; 209: 259–266.
124. Chen KC, Hsu WH, Ho JY, Lin CW, Chu CY, Kandaswami CC. *et al.* Flavonoids Luteolin and Quercetin Inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction. *J. Food Drug Anal.* 2018; 26: 1180 – 1191.
125. Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, Angelini L, Fuhrmann-Stroissnigg H, Xu M. *et al.* Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* 2018; 36: 18–28.
126. Wen P, Zong MH, Hu TG, Li L, Wu H. Preparation and Characterization of Electrospun Colon-Specific Delivery System for Quercetin and Its Antiproliferative Effect on Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66: 11550-11559.

127. Ma L, Cao X, Wang H, Lu K, Wang Y, Tu C, Y. *et al.* Discovery of Myricetin as a Potent Inhibitor of Human Flap Endonuclease 1, Which Potentially Can Be Used as Sensitizing Agent against HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2019; 67: 1656–1665.
128. Ya F, Tian J, Li Q, Chen L, Ren J, Zhao Y. *et al.* Cyanidin-3-O- β -glucoside, a Natural Polyphenol, Exerts Proapoptotic Effects on Activated Platelets and Enhances Megakaryocytic Proplatelet Formation. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66: 10712-10720.
129. Martins BT, Correia da Silva M, Pinto M, Cidade H, Kijjoa A. Marine natural flavonoids: chemistry and biological activities. *Nat. Prod. Res.* 2019; 33: 3260-3272.
130. Elis Bianchi S, Kaiser S, Pittol V, Doneda E, Borges de Souza KC, Linck Bassani V. Semi-preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. by high-performance counter-current chromatography. *Phytochem. Anal.* 2018; 1-11.
131. Chanda J, Mukherjee PK, Biswas R, Biswas S, Tiwari AK, Pargaonkar A. UPLC - QTOF - MS analysis of a carbonic anhydrase - inhibiting extract and fractions of *Luffa acutangula* (L.) Roxb (ridge gourd). *Phytochem. Anal.* 2018; 1 – 8.
132. Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. Characterization of Flavone and Flavonol Aglycones by Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1997; 11: 1357–1364.
133. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39: 1–15.
134. Zheng J, Tian W, Yang C, Shi W, Cao P, Long J. *et al.* Identification of flavonoids in *Plumula nelumbinis* and evaluation of their antioxidant properties from different habitats. *Ind. Crops Prod.* 2019; 127: 36–45.
135. Wolff T, Berrueta LA, Valente LMM, Barboza RS, Neris RLS, Guimarães-Andrade IP. *et al.* Comprehensive characterisation of polyphenols in leaves and stems of three anti-dengue virus type-2 active Brazilian *Faramea* species (Rubiaceae) by HPLC-DAD-ES I-MS/MS. *Phytochem. Anal.* 2018;1–11.
136. Yuka HJ, Ryu HW, Kim DY, Park MH, Seo WD, Jeong SH, Oh SR. Comparison of flavonoid and policosanol profiles in Korean winter-spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivated in different regions. *Food Chem.* 2019; 279: 202–208.
137. March R, Brodbelt J, Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43: 1581 – 1617.
138. Staszaków A, Swarcewicz B, Banasiak J, Muth D, Jasiński M, Stobiecki M. LC/MS profiling of flavonoid glycoconjugates isolated from hairy roots, suspension root cell cultures and seedling roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics* 2011; 7 (4): 604–613.

139. Riffault L, Destandau E, Pasquier L, André P, Elfakir C. Phytochemical analysis of *Rosa hybrida* cv. 'Jardin de Granville' by HPTLC, HPLC-DAD and HPLC-ESI-HRMS: Polyphenolic fingerprints of six plant organs. *Phytochemistry* 2014; 99: 127–134.
140. Masullo M, Cerulli A, Montoro P, Pizza C, Piacente S. In depth LC-ESIMSⁿ -guided phytochemical analysis of *Ziziphus jujuba* Mill. Leaves. *Phytochemistry* 2019; 159: 148–158.
141. Bondonno NP, Lewi JR, Blekkenhorst LC, Bondonno CP, Shin JHC, Croft KD. *et al.* Association of flavonoids and flavonoid-rich foods with all-cause mortality: The Blue Mountains Eye Study. *Clin. Nutr.* 2019 en impresión
142. Kerai A, Sim TF, Emmerton L. Medical cannabis: A needs analysis for people with epilepsy. *Complement. Ther. Clin. Pract.* 2018; 33: 43–48.
143. Rovetto LLJ, Aieta NV. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa*. *J. Supercrit. Fluids* 2017; 129: 16–27.
144. Cai C, Yu W, Wang C, Liu L, Li F, Tan Z. Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin. *J. Mol. Liq.* 2019; 287: 110957.
145. Cardenia V, Toschi TG, Scappini S, Rubino RM, Rodriguez-Estrada MT. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *J. Food Drug Anal.* 2018; 26: 1283-1292.
146. Burnier C, Esseiva P, Roussel C. Quantification of THC in *Cannabis* plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta* 2019; 192: 135–141.
147. Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Maran D, Benvenuti S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 143: 228–236.

Capítulo 3

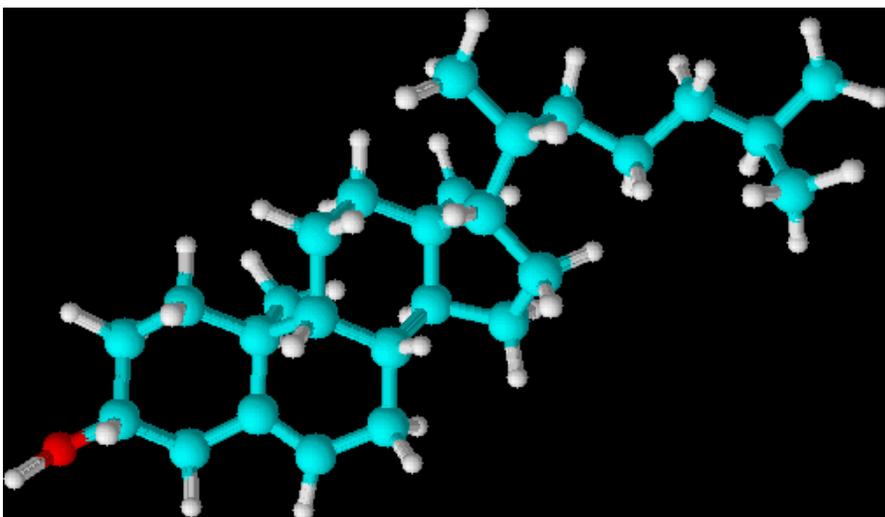
Metabolitos secundarios no aromáticos



Además de la gran cantidad y diversidad estructural encontrada en los metabolitos con anillos aromáticos, presentes en las fuentes naturales hasta ahora estudiadas, existe otra gran cantidad y diversidad estructural de metabolitos, que en su gran mayoría no contienen anillos aromáticos. Estos incluyen un gran grupo de sustancias con un número de átomos de carbono que generalmente es múltiplo de cinco, inicialmente llamadas isoprenoides, y actualmente denominadas terpenoides y que van de sustancias de bajo peso molecular como los monoterpenos presentes en diferentes aceites esenciales hasta polímeros de más de 4.000 átomos de carbono, como el caucho. Además de las notables variaciones estructurales, presentan propiedades que las hacen útiles como materias primas fundamentales para muchos productos y procesos industriales, alimentarios y farmacéuticos.

Los terpenoides incluyen sustancias que contienen 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, y un mayor número de carbonos, pero el aprovechamiento para fines farmacéuticos y alimentarios, actualmente está más relacionado a los que tienen 10, 15 y 30 átomos de carbono. Estos son los monoterpenos, los sesquiterpenos y los triterpenoides. Los monoterpenos y sesquiterpenos más conocidos son los presentes en los aceites esenciales y fragancias que producen diferentes vegetales, y además de su uso cosmético tienen algunos usos farmacéuticos. Los triterpenoides, incluyen una gran cantidad de sustancias importantes en la industria farmacéutica como son los esteroides, y con nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevos productos contra el cáncer. Los de 25 átomos de carbono son denominados sesterterpenoides, y se aislaron inicialmente de organismos marinos como las esponjas. Los de 40 átomos de carbono incluyen un grupo interesante como son los carotenoides, que cumplen papeles importantes para la salud. Sobre los mono- y sesquiterpenos, se ampliará en el capítulo 5. A continuación se profundizará sobre varias clases de esteroides naturales como son los esteroides, las saponinas esteroides, los cardiotónicos, los carotenoides y los alcaloides esteroidales.

Esteroles



Distribución y estado natural

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se encuentran en forma libre (También llamados agliconas esteroides), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5 (Figura 3.1).

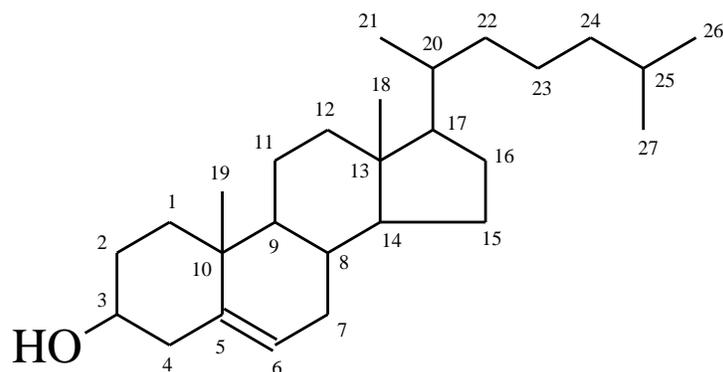


Figura 3.1. Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de colesterol.

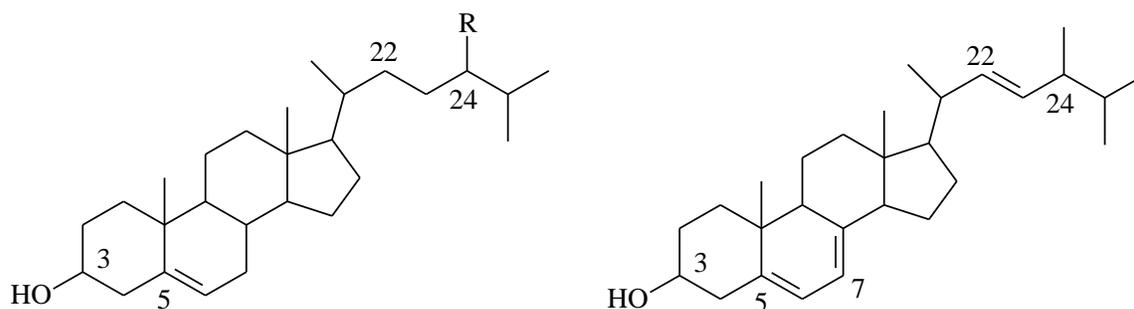
En los animales superiores se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (hormonas, ácidos biliares, vitaminas D, etc.).

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Figura 3.2). Un esteroide menos común es el

fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco (*Cocos nucifera* L.).

En los hongos y levaduras se encuentra principalmente el ergosterol, que, a diferencia de los mencionados anteriormente, posee un grupo dieno conjugado, el cual determina muchas de sus propiedades químicas y biológicas, muy especialmente su actividad como precursor de vitaminas D, que son importantes en procesos tales como la calcificación de los huesos.

En cambio, los animales inferiores (Principalmente invertebrados marinos tales como esponjas, estrellas, corales, etc.) y ciertas plantas filogenéticamente poco evolucionadas (P.ej. algunas orquidáceas) contienen mezclas complejas de esteroides con modificaciones estructurales variadas tales como núcleos sin el carbono 4 (A-nor-esteroides), sin el carbono 19 (19-Nor-esteroides), con varias insaturaciones; cadenas laterales con más de 10 carbonos, con anillos ciclopropano, con enlaces alénicos, etc. En la Figura 3.2 se presentan algunos ejemplos de los más comunes.



R = H, Colesterol (mamíferos)
 R = Me, Campesterol (plantas superiores)
 R = Et, Sitosterol (plantas superiores)
 R = Et, insat. C-22, Estigmasterol (plantas superiores)
 R = Et, insat C-24, Fucosterol (algas)

Ergosterol (hongos y levaduras)

Figura 3.2. Estructuras básicas de algunos esteroides naturales.

Nomenclatura

Aunque a la mayoría de esteroides se les conoce por sus nombres vulgares (P.ej. colesterol, estigmasterol, β -sitosterol, brassicasterol, poriferasterol, etc.) se usa una forma más sistemática para llamar a todas estas clases de sustancias. Para ello, se considera a la mayoría de esteroides relacionados con la estructura del colestano (Figura 3.3).

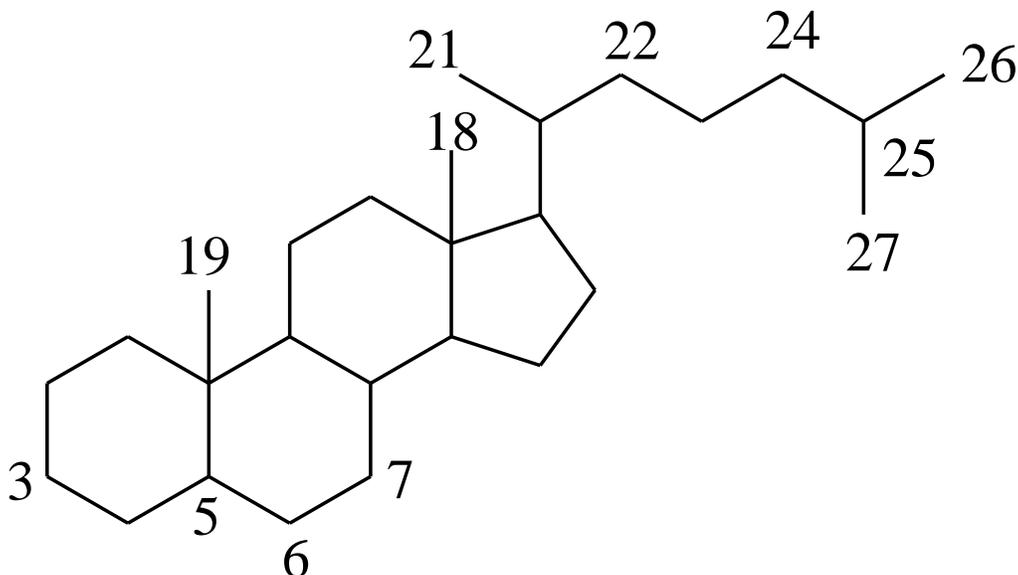


Figura 3.3. Estructura química del núcleo esteroidal tipo colestano.

A continuación se dan algunas instrucciones para asignar el nombre sistemático de esteroides comunes. No se toman en cuenta aquí, aspectos como la fusión de los anillos en el núcleo esteroidal.

El nombre sistemático consta de cuatro partes:

- el esqueleto básico
- la posición de las insaturaciones
- la posición del grupo hidroxilo
- la estereoquímica

Por ejemplo, veamos el nombre sistemático del colesterol (Figura 3.2). Su estructura química incluye:

- El esqueleto básico es el del colestano, entonces: COLEST-
- Tiene un enlace doble sobre el carbono 5, entonces: 5-én-
- Tiene un grupo hidroxilo sobre el carbono 3, entonces: 3-OL

Y por lo tanto el nombre correcto es: Colest-5-én-3-ol

- Cuando el esteroide posee más de un enlace doble se escribe COLESTA en vez de COLEST.
- Cuando posee dos o más enlaces dobles se nombra respectivamente: dién, trién, tetraén, etc.

- Cuando posee 2, 3, 4, etc. grupos hidroxilos se nombra respectivamente: diol, triol, tetraol, etc.
- Cuando posee sustituyentes, estos se nombran como prefijo del esqueleto básico, p.ej. para el Campesterol (figura 3.2), el nombre inicia con 24-metilcolest; para el Sitosterol el nombre inicia con 24-etilcolest, etc.

A manera de ejemplo el nombre para el ergosterol es: 24-Metilcolesta-5,7,22-trién-3-ol.

Los esteroides que poseen un anillo contraído, por ejemplo, algunos esteroides marinos en los cuales el anillo A es de 5 carbonos, se les denomina nor-esteroides, por ejemplo: Anorcolesterol. Los que poseen un anillo expandido se les denomina homo-esteroides. Los esteroides con un enlace roto o ausente en alguno de los anillos se los denomina seco-esteroides.

Es importante tener en cuenta que, debido a su estructura, los esteroides naturales presentan varios carbonos quirales, que definen su estereoquímica. Para lograr esto, basta con añadir luego del número correspondiente las letras R, S, E, Z, α ó β , según se trate de epímeros R o S, isómeros E o Z o configuraciones α ó β , respectivamente. Generalmente, los esteroides naturales poseen la configuración 3β -hidroxi, siendo pocas las excepciones. De acuerdo con esto el nombre sistemático del colesterol es colest-5-én- 3β -ol. El sitosterol tiene dos estructuras que son 24R-etilcolest-5-én- 3β -ol y el 24S-etilcolest-5-én- 3β -ol.

Propiedades físicas

La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (acetato de etilo, cloroformo, benceno, etc.), menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular, y que funden sin descomponerse (en forma libre o esterificada). Presentan además actividad óptica debido a los carbonos quirales que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de oxidación fotoquímica ilustrada en la figura 3.4.

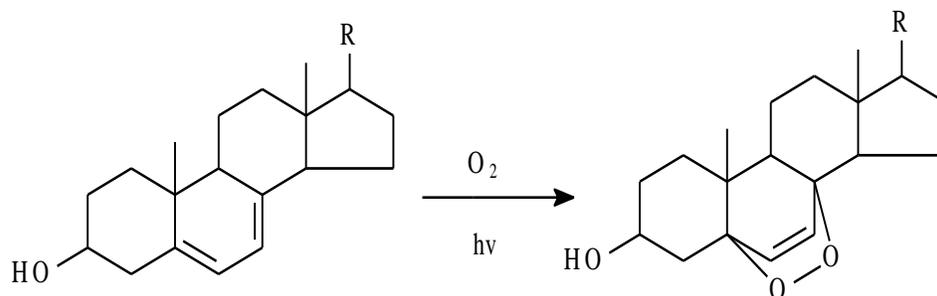


Figura 3.4. Reacción de ciclo adición [4+2] de un esteroide con grupo dieno conjugado y oxígeno, en presencia de luz. El producto es un epidioxiesteroide, o esteroide con un grupo endoperoxido entre los carbonos C-6 y C-8.

Biogénesis

Los esteroides se derivan biogénicamente de la acetilcoenzima-A (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno, por una ruta compartida con los denominados triterpenoides. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, mientras que los animales tienen al lanosterol (Figura 3.5). De una forma análoga se originan los triterpenoides.

En la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones C-C, metilaciones (vía S-adenosilmetionina), hidroxilaciones, etc.

El conocimiento de la biosíntesis de esteroides ha contribuido al desarrollo de la Quimotaxonomía vegetal, particularmente en el caso de las algas, y ha servido para correlacionar la estructura de estas sustancias con aspectos evolutivos.

Por otro lado, el conocimiento de la biosíntesis de esteroides como el colesterol, ha llevado a evaluar diferentes sustancias con el fin de inhibir el proceso de ciclación del óxido de escualeno, lo que llevaría a inhibir la biosíntesis del colesterol y su potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos antiparasitarios, antihongos, hipocolesterolemiantes y anticáncer.

Hechos estructurales

Los esteroides naturales más conocidos presentan las siguientes características estructurales:

- Los enlaces dobles en el núcleo se presentan principalmente en C-5, C-7, C-8 y C-9, en su orden.
- Los enlaces dobles en la cadena lateral se presentan especialmente en C-22, y con menor frecuencia en C-24 y C-25.
- Además de los grupos metilos 18, 19, 21, 26 y 27, es frecuente encontrar grupos metilo en C-24, menos frecuente en el C-4.

d. La cadena lateral presenta grupos alquilo (metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc.) principalmente en C-24.

e. Algunos organismos poco evolucionados como los organismos invertebrados marinos, presentan esteroides con modificaciones en la cadena lateral (anillos ciclopropano, dobles enlaces alénicos, metilaciones en C-26 y C-27, ausencia del C-25, etc.), y con núcleos modificados.

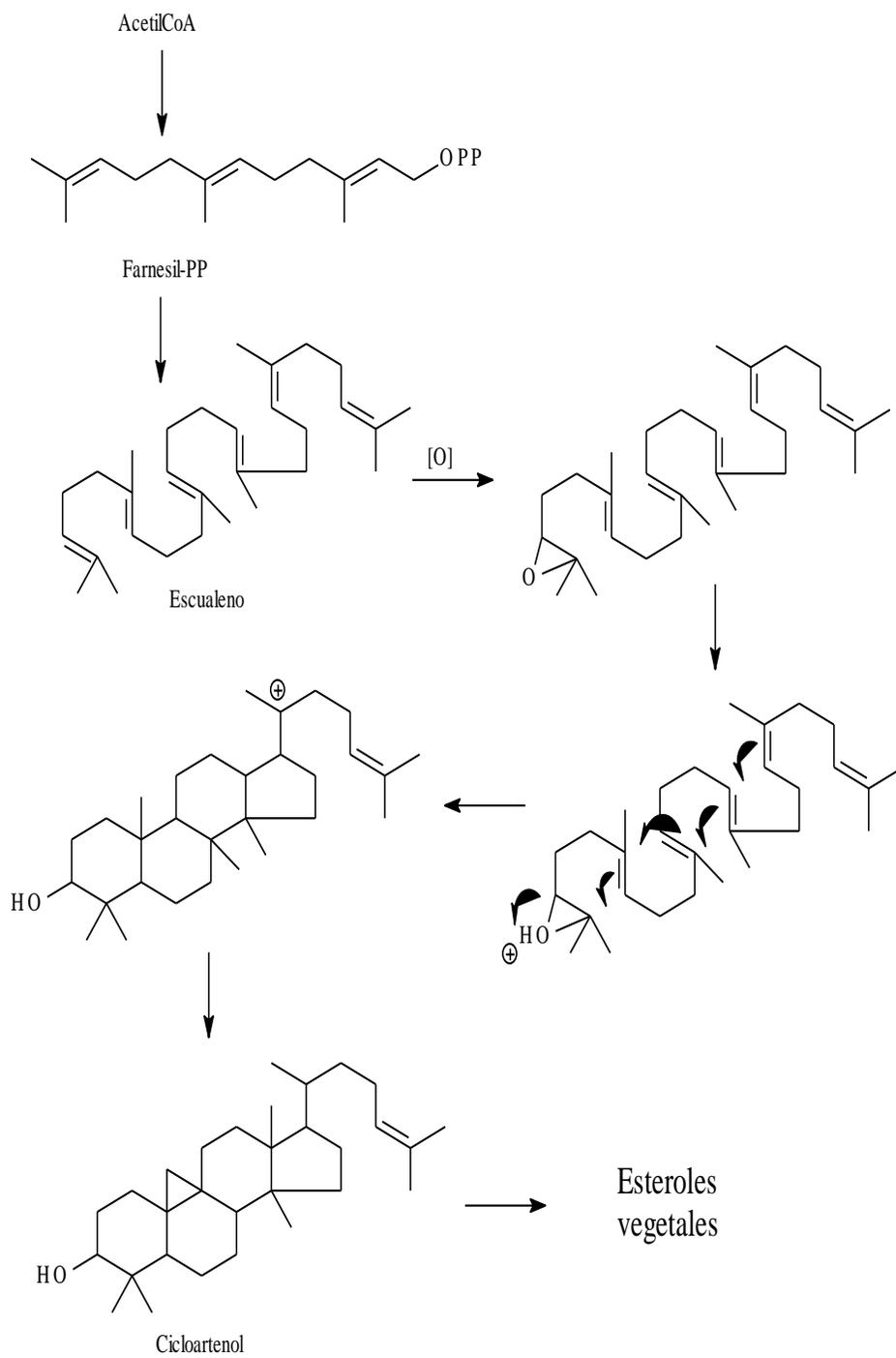


Figura 3.5. Esquema biogénico para los esteroides vegetales.

Extracción y aislamiento

El método más utilizado para la extracción de esteroides libres y esterificados es el de Bligh y Dyer. El material biológico seco y molido se extrae a temperaturas menores de 40°C, con un volumen suficiente de una mezcla cloroformo: metanol 2:1. Sin embargo, dada la toxicidad y el impacto ambiental negativos de estas sustancias, más recientemente se han propuesto mezclas de extracción como 2-metiltetrahidrofurano:alcohol isoamílico 2:1. Estos dos solventes se obtienen a partir del procesamiento industrial de residuos de la industria de la caña de azúcar, mientras que el cloroformo es derivado de la industria petroquímica y es neurotóxico. También se utilizan otras mezclas de solventes como hexano: diclorometano 1:1. Toda esta mezcla se filtra y al filtrado obtenido se le hace partición con un volumen adecuado de agua. La fase clorofórmica contiene entonces todos los compuestos liposolubles tales como esteroides, triglicéridos, otros terpenoides, ácidos grasos, etc. No obstante, es recomendable evaluar otros solventes extractores, menos tóxicos que el diclorometano y el cloroformo, como por ejemplo el acetato de etilo mezclado con hexano, y utilizar el ultrasonido o la extracción asistida por microondas, con el fin de acelerar los procesos de extracción y reducir la contaminación del medio ambiente.

Cuando se sabe de antemano que la muestra contiene glicósidos esteroides, y se desea estudiar sus respectivas agliconas, entonces el material vegetal se extrae con alcohol o con una mezcla alcohol: agua, y el extracto obtenido se hidroliza con HCl 2M.

A nivel comercial el colesterol se obtiene de la espina dorsal de las reses, y el fitosterol a partir de residuos de la industria papelera, y del procesamiento de la caña de azúcar.

Para la separación y purificación de esteroides a partir de extractos lipídicos, se emplean con buenos resultados la cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina (CCF), con sílica gel y eluentes como mezclas de n-hexano-acetato de etilo, y mezclas de ellos. Una mezcla recomendable es n-hexano-acetato de etilo 4:1. Existen varias clases de reveladores incluido el ácido fosfomolibdico, el de Liebermann-Burchard, uno con cloruro de berberina y carbazol-ácido sulfúrico.

Sin embargo, no siempre estas técnicas en forma aislada permiten la obtención de esteroides puros, sobre todo en el caso de mezclas de esteroides, por lo cual deben complementarse con otras técnicas de separación y purificación más eficientes como son: La CCF argéntica (placas de sílica gel impregnadas con una solución de nitrato de plata al 10% en acetonitrilo), la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE o HPLC en inglés) y la Cromatografía de Gases (CG).

En la CCF argéntica, se impregna la sílica con soluciones concentradas de nitrato de plata en agua:alcohol; y como resultado los esteroides se separan sobre dicha sílica por retención diferencial de acuerdo al número de enlaces dobles C=C que contengan en su estructura

(P.ej. el ergosterol con 3 enlaces dobles es más retenido que el colesterol, el cual solo posee un enlace doble).

La CLAE (sigla inglesa: HPLC) permite las mejores separaciones de mezclas esterólicas y se obtienen más rápidamente esteroides puros. Son muy utilizadas columnas de Octadecilsilano (Fase Reversa) y eluentes tales como: etanol, metanol, mezclas alcohol: agua, mezclas acetonitrilo: agua, etc. Además, la integración de la CLAE con la Espectrometría de masas es una excelente técnica porque a la vez que separa mezclas de esteroides, permite obtener información estructural a partir de los espectros de masas, inclusive es posible hacer diferenciación entre epímeros debido a su retención diferencial. Adicionalmente, la combinación de la CLAE con espectrómetros UV (de longitud de onda variable o arreglo de diodos) e infrarrojo con transformada de Fourier, permite la obtención de los correspondientes espectros UV e IR. La figura 3.6. muestra el cromatograma CLAE de la fracción de esteroides libres de la esponja marina *Ircinia campana*.

Otras técnicas utilizadas para el análisis de esteroides en muestras biológicas es la combinación de cromatografía líquida-cromatografía de gases- espectrometría de masas, ya utilizada para diferentes plantas.

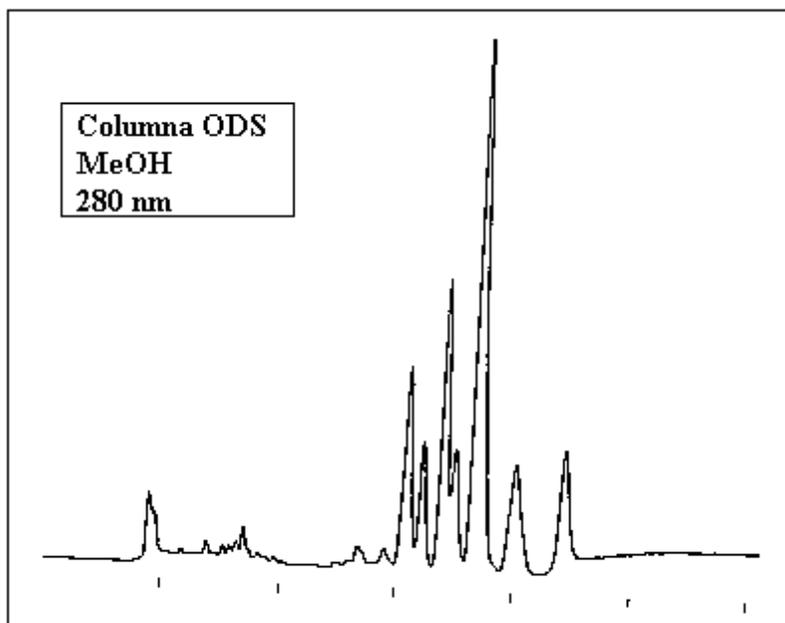


Figura 3.6. Cromatograma HPLC de la fracción de esteroides libres de la esponja marina *Ircinia campana*.

La Cromatografía de Gases con diferentes fases estacionarias como OV-17 (1%, 3%, 5%), SE-54, etc., con temperaturas de 250-280°C, permite una buena separación y análisis de mezclas esterólicas. Además, si esta se acopla con un espectrómetro de masas de impacto

electrónico, se obtienen los respectivos espectros de masas, los cuales facilitan la identificación.

Ensayo de Liebermann-Burchard

Los esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares de muestras vegetales y animales mediante el ensayo de Liebermann-Burchard. En este ensayo, a una solución en acetato de etilo de la muestra que se analiza, se le agrega un volumen igual de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (98%). Si hay esteroides, se producen coloraciones verdes, violetas, rojas o azules.

Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada. Diferentes autores aseguran que la prueba la dan positiva solamente los esteroides que tengan en su estructura grupos dieno conjugados reales o potenciales (por ejemplo en los Δ^5 -3-hidroxiesteroides la deshidratación genera un $\Delta^{3,5}$ dieno, mientras que los Δ^7 -3-hidroxiesteroides requieren de la deshidratación seguida de isomerización del enlace doble formado hasta conjugarse con el enlace C=C en C-7). El ensayo de Liebermann-Burchard es la base del método de Abell-Kendall, el cual se utilizó durante muchos años para la cuantificación de colesterol en muestras sanguíneas, sin embargo, actualmente se utilizan métodos instrumentales como la espectrometría de masas con imágenes (MSI Mass Spectrometry Imaging), que inclusive permite localizar la presencia de colesterol directamente sobre los tejidos que lo contienen.

Espectroscopia infrarroja

Los espectros infrarrojos de la mayoría de esteroides naturales son bastante simples y similares a los de alcoholes alifáticos saturados o insaturados. Generalmente se observan: Una banda de tensión O-H alrededor de 3600 cm^{-1} , bandas de tensión de enlaces C-H saturados alrededor de $2960\text{-}2780\text{ cm}^{-1}$, bandas de tensión de enlaces =C-H alrededor de $3125\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$, bandas de flexión de enlaces saturados C-H alrededor de 1440 y 1380 cm^{-1} y bandas de tensión de enlaces C=C olefínicos alrededor de 1670 cm^{-1} (Generalmente es una banda débil). Otra utilidad de la espectroscopia infrarrojo es que permite diferenciar por ejemplo entre los ésteres de esteroides y otros tipos de sustancias como los triglicéridos y los fosfolípidos.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

En los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de los esteroides, en general se observan las señales de protones metílicos en la región de 0-1 ppm con constantes de acoplamiento de 6-7 Hz cuando tienen carbonos saturados vecinos. El protón ligado al carbono 3 se observa a 360 MHz como un multiplete alrededor de 3.53 ppm cuando el

hidroxilo está en posición 3β , mientras que se observa como un quintete cuando el hidroxilo está en posición 3α .

En el caso de los esteroides con enlace doble entre los carbonos 5 y 6, el protón del carbono 6 se observa como un "doblete" ancho alrededor de 5.35 ppm.

En el caso de esteroides con enlaces dobles en C-5 y C-7 (esteroides con núcleo tipo ergosterol) los protones H-6 y H-7 se observan como multipletes en 5.4 y 5.5 ppm.

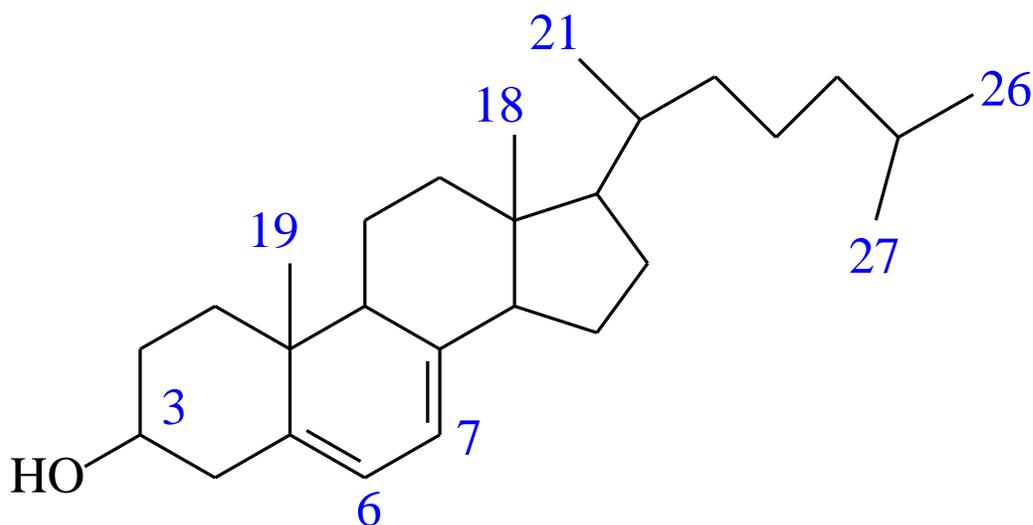
En general, los espectros RMN permiten asignaciones estereoquímicas a partir de su análisis detallado y por comparación con los espectros de esteroides de estructura completamente conocida.

En el caso de los derivados acetilados de esteroides, la presencia del grupo acetato sobre el carbono 3, desplaza la señal del protón ligado al mismo carbono hasta valores de 4.5 ppm, además en el espectro aparece la señal del grupo metilo del acetato alrededor de 1.8 ppm.

La región de protones metílicos (0-1.2 ppm) es conocida para varios esteroides naturales, y permite asignaciones estereoquímicas precisas de la cadena lateral.

La tabla 3.1 presenta para propósitos comparativos las señales del espectro RMN- ^1H del 7-deshidrocolesterol aislado de la esponja marina *Ircinia campana*. Así como los desplazamientos químicos calculados con el software comercial ACD-Labs NMR Predictors versión 11[®], y con la aplicación en línea nmrdb.org.

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos experimentales y calculados para señales de protones seleccionadas del espectro RMN-¹H del 7-deshidrocolesterol.



Protón	δ exp.	δ calc. ACD-Labs®	δ calc. Nmrdb.org
H-3	3.7 m	3.61	4.19
H-6	5.4 m	5.39	4.85
H-7	5.6 m	5.56	5.39
H-18	0.62 s	0.65	0.65
H-19	0.95 s	0.94	0.94
H-21	0.90 d	0.87	0.87
H-26	0.85 d	0.80	0.80
H-27	0.86 d	0.79	0.79

La espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 ha facilitado mucho la dilucidación estructural de esteroides. Es muy fácil reconocer en estos espectros las señales características de esteroides como, por ejemplo, la señal del carbono 3 aparece alrededor de 72 ppm en esteroides con núcleos Δ^5 - y Δ^7 -3-hidroxiandrosteno. Además, los esteroides con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno presentan las señales de los carbonos 5 y 6 en 141 y 122 ppm aproximadamente, la señal del metilo 18 a 12 ppm, y la del metilo 19 a 20 ppm. Los esteroides con núcleo Δ^7 -3- hidroxiandrosteno muestran las señales de los carbonos 7 y 8 a 130 y 140 ppm, y las señales de los metilos 18 y 19 alrededor de 12 ppm aproximadamente. La tabla 4 resume los desplazamientos químicos aproximados para varios tipos de carbonos característicos de los esteroides naturales:

Tabla 3.2. Rangos de desplazamiento químico en RMN-¹³C para varios tipos de carbonos característicos de esteroides naturales.

Tipo de carbono	Desplazamiento químico (ppm)
CH ₃ sat.	12-24
CH ₂ sat.	20-41
CH sat.	35-57
C sat.	27-43
C-OH sat.	65-91
C=C olefínico	119-172
C=O	177-220

Por otro lado, el desarrollo de la RMN Bidimensional permite hacer una asignación más fácil de las señales y por ende de la estructura.

La tabla 3.3 presenta algunas de las señales de RMN-¹³C experimentales y calculadas para el 7-deshidrocolesterol.

Tabla 3.3. Desplazamientos químicos experimentales y calculados para señales de carbonos seleccionadas del espectro RMN-¹³C del 7-deshidrocolesterol.

Carbono	δ exp.	δ calc. ACD-Labs®	δ calc. Nmrdb.org
C-3	70.44	70.50	71.2
C-5	139.73	139.80	140.7
C-6	119.57	119.70	119.4
C-7	116.21	116.08	116.7
C-8	141.47	140.57	140.6
C-18	11.80	19.55	12.0
C-19	16.27	20.08	16.0
C-21	18.83	18.70	18.9
C-26	22.54	22.62	22.6
C-27	22.85	22.62	22.6

Espectrometría de masas

Los espectros de masas de impacto electrónico (70 eV) de los esteroides libres proporcionan información estructural muy útil y existen mecanismos de fragmentación verificados experimentalmente con esteroides marcados con isótopos tales como deuterio.

Teniendo en cuenta que la mayoría de esteroides naturales poseen 4 clases de núcleos tetracíclicos: Δ^5 -3-hidroxiandrosteno, Δ^0 -3-hidroxiandrostano, Δ^7 -3-hidroxiandrosteno, $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno y $\Delta^{5,7,9(11)}$ -3-hidroxiandrostatrieno, y que muchos de ellos tienen cadenas laterales hidrocarbonadas saturadas o monoinsaturadas en los carbonos 22, 24 o 25; pueden establecerse las siguientes características estructurales a partir de su espectro de masas I.E.:

a. Los esteroides libres con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno y la cadena lateral saturada presentan en sus espectros de masas normalmente los fragmentos: M (Ion molecular), M-Metilo, M-Agua, M-Metilo-Agua, M-85, M-111, 273, 255, 231, 213 y 145. Además, si contienen un grupo isopropilo terminal se observan también los fragmentos M-Isopropilo y M-Isopropilo-Agua. Los derivados acetilados muestran los fragmentos M, M-AcOH, M-AcOH-Metilo, 255 (M-AcOH-R), 213 y 145. Los derivados Trimetilsililéteres (TMS) muestran los fragmentos M, M-TMSOH, M-TMSOH-15, 255 (M-TMSOH-R), 213, 145 y 129. La figura 3.7. esquematiza el origen de algunos de estos iones.

b. Los esteroides libres con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) insaturada presentan además de los fragmentos citados en (a), los fragmentos $m/z=300$, 271, 253, 229 y 211, si son monoinsaturados en el carbono 22. Si la insaturación es en el carbono 24, se observa además el fragmento intenso $m/z=314$. Finalmente, si la insaturación es en el carbono 25, se observa además el fragmento $m/z: 328$ intenso. Estos fragmentos intensos de masa par se originan por rupturas tipo McLafferty (Figura 3.7).

c. Los esteroides libres con núcleo Δ^0 -3-hidroxiandrostano y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) saturada presentan los fragmentos: M, M-Metilo, M-Agua, M-Metilo-Agua, $m/z: 233$, 215 y 147, generalmente. Además, como en el caso de los anteriores, si poseen un grupo isopropilo terminal presentan los fragmentos: M-Isopropilo y M-Isopropilo-Agua. Los derivados acetilados presentan los fragmentos: M, M-AcOH, M-AcOH-Metilo, 257 (M-AcOH-R), 215 y 147. Los derivados TMS-éteres muestran los iones M, M-TMSOH, M-TMSOH-15, 257, 215 y 147. La figura 3.8 esquematiza la formación de algunos de estos iones.

d. Los esteroides con núcleo Δ^0 -3-Hidroxiandrostano y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) monoinsaturada, presentan además de los fragmentos citados en (c), a los fragmentos: $m/z: 302$, 231, 211; si la insaturación es en el carbono 22. Si la insaturación es

sobre el carbono 24, se aprecia además el fragmento intenso m/z : 316. Y finalmente, si la insaturación es sobre el carbono 25, se observa el fragmento intenso m/z : 330 (figura 3.8).

e. Los esteroides libres con núcleo Δ^7 -3-hidroxiandrosteno y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) saturada, presentan en sus espectros de masas los fragmentos: M, M-Metilo, M-Agua, M-Metilo-Agua, 273, 255, 246, 231 y 213. Además, si tienen un grupo isopropilo terminal, a veces se observan los fragmentos: M-Isopropilo y M-Isopropilo-Agua. Los derivados acetilados muestran los fragmentos: M, M-AcOH, M-AcOH-Metilo, M-AcOH-R y 213, por lo cual no es posible diferenciarlos de los derivados acetilados de esteroides con núcleo Δ^5 -3-Hidroxiandrosteno. Los derivados TMS muestran fragmentos de m/z iguales a los descritos para los derivados TMS de esteroides Δ^5 . La figura 3.9 presenta un esquema de formación probable de estos iones.

h) Los esteroides con núcleo Δ^7 -3-Hidroxiandrosteno y la cadena lateral Hidrocarbonada (No oxigenada) monoinsaturada, presentan en sus espectros de masas, además de los fragmentos citados en (e), los siguientes fragmentos: m/z : 300, 271, 253, 229 y 211, si la insaturación es sobre el carbono 22. Si la insaturación es sobre el carbono 24, se observa además el fragmento intenso m/z : 314. Y finalmente, si la insaturación es sobre el carbono 25, se observa además el fragmento intenso de masa m/z : 328 (Ver figura 3.9).

i) Los esteroides con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) saturada, presentan en sus espectros de masas los fragmentos: M, M-Metilo, M-Agua, M-Metilo-Agua, 271, 253, 229, 211, 158, 143 y 128. Además, si tienen un grupo isopropilo terminal, a veces se observan los fragmentos: M-Isopropilo y M-Isopropilo-Agua. Cuando la cadena lateral es insaturada en lugar de m/z : 158 se observa m/z : 157. Los derivados acetilados muestran los fragmentos: M, M-AcOH, M-AcOH-Metilo, M-AcOH-R, 211, 158 (Si R saturada), 157 (Si R insaturada), 143 y 128. Los derivados TMS-éteres muestran los iones M, M-TMSOH, M-TMSOH-15, 253, 211 y 143. La figura 3.10 presenta la formación probable de estos iones.

j) Los esteroides con núcleo $\Delta^{5,7,9(11)}$ -3-Hidroxiandrostatrieno y la cadena lateral hidrocarbonada (No oxigenada) saturada, presentan en sus espectros de masas los fragmentos: M, M-Metilo, M-Agua, M-Metilo-Agua, 251, 209 y 141. Además, si tienen un grupo isopropilo terminal, a veces se observan los fragmentos: M-Isopropilo y M-Isopropilo-Agua. Los derivados acetilados muestran los fragmentos: M, M-AcOH, M-AcOH-Metilo, M-AcOH-R, 209 y 141 (ver figura 3.10).

Más recientemente se han revisado los patrones de fragmentación para varios esteroides y esteroides naturales, mediante la preparación y análisis de espectrometría de masas de los

derivados trimetilsilil-oxima, que muestran que estos derivados presentan ventajas como por ejemplo una mayor sensibilidad para su análisis instrumental.

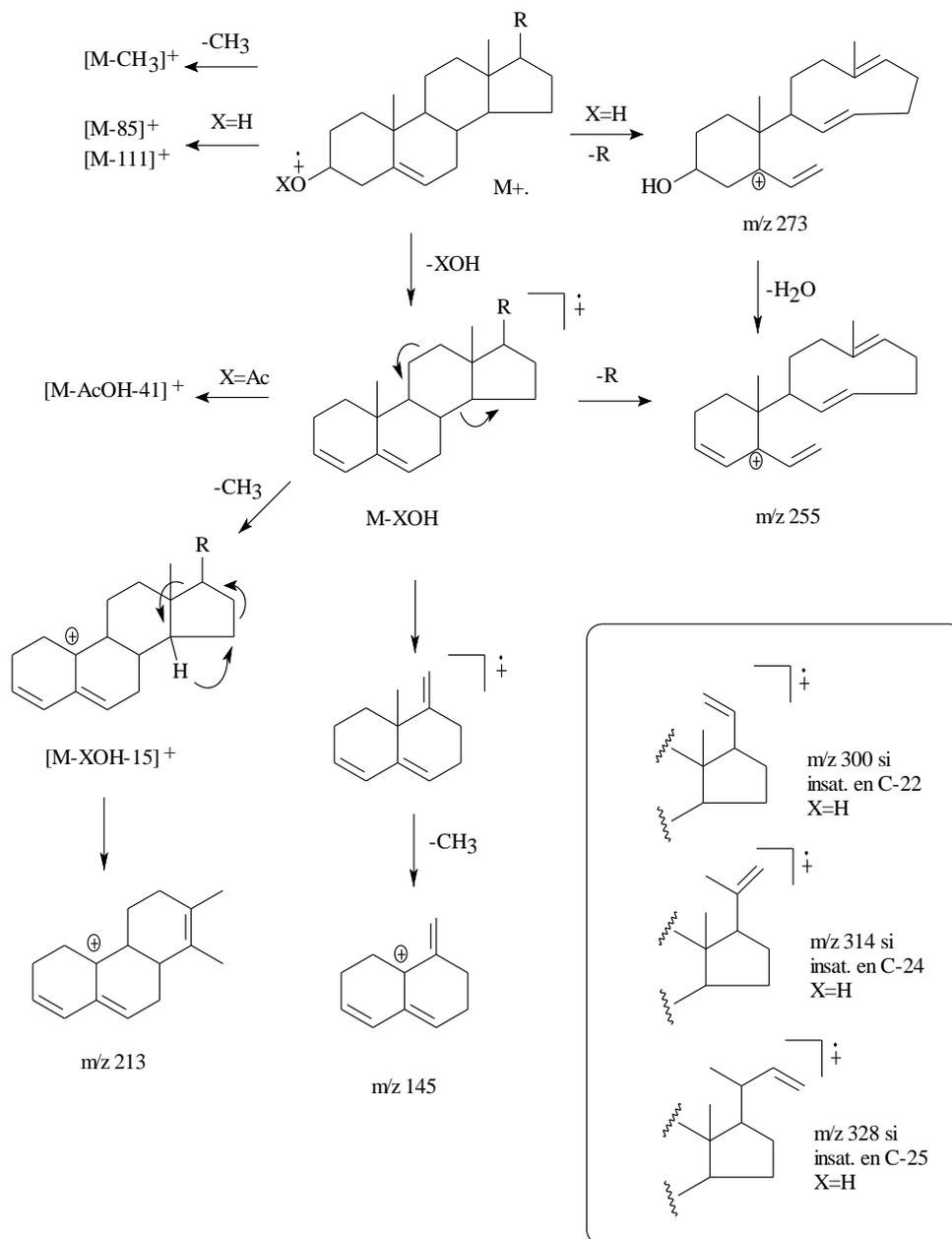


Figura 3.7. Algunos fragmentos característicos del espectro de masas IE de esteroides con el núcleo Δ^5 -androsteno ($X = H, Ac, Me, TMS$).

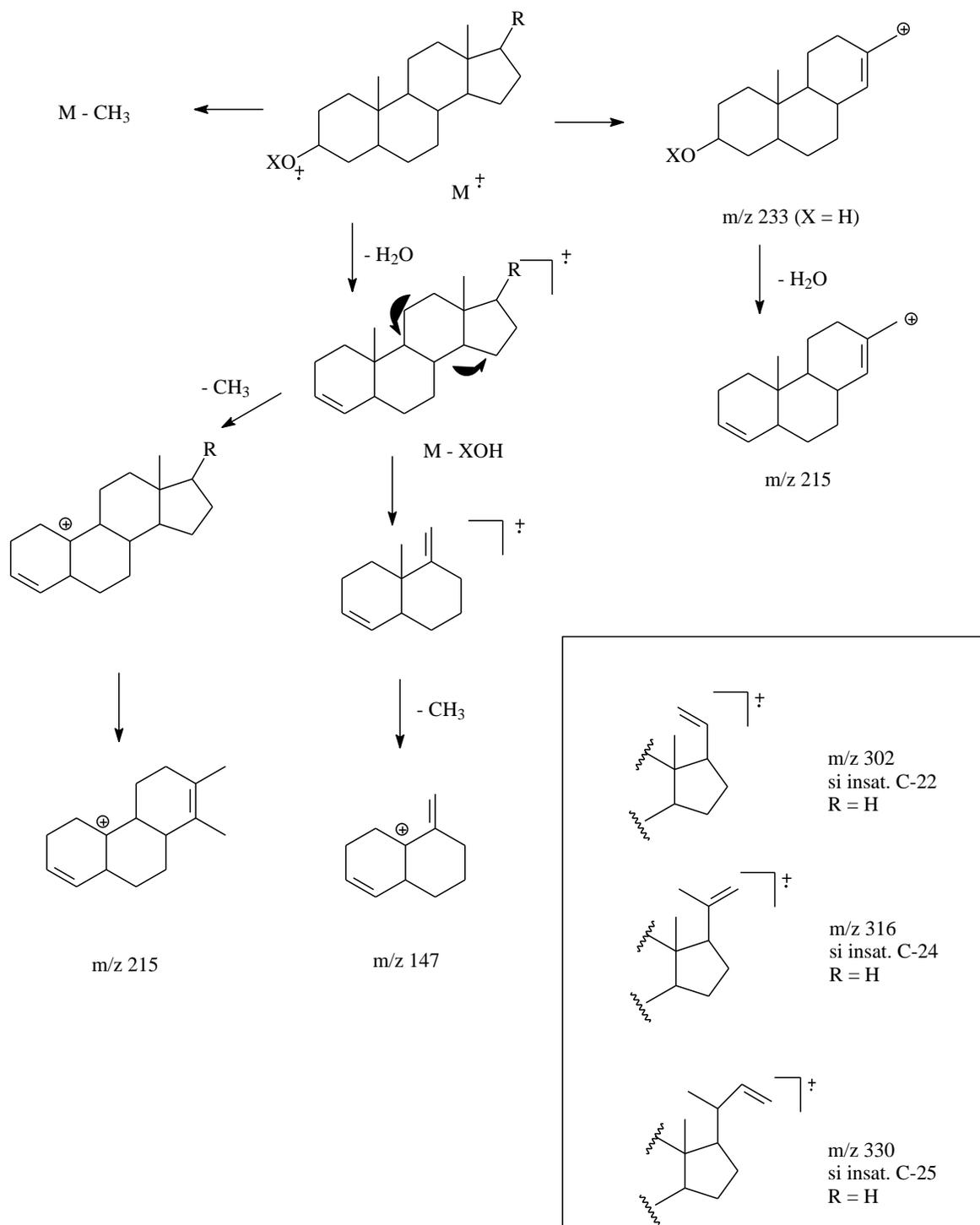


Figura 3.8. Algunos fragmentos característicos del espectro de masas IE de esteroides con el núcleo Δ^0 -androstano (X = H, Ac, Me, TMS).

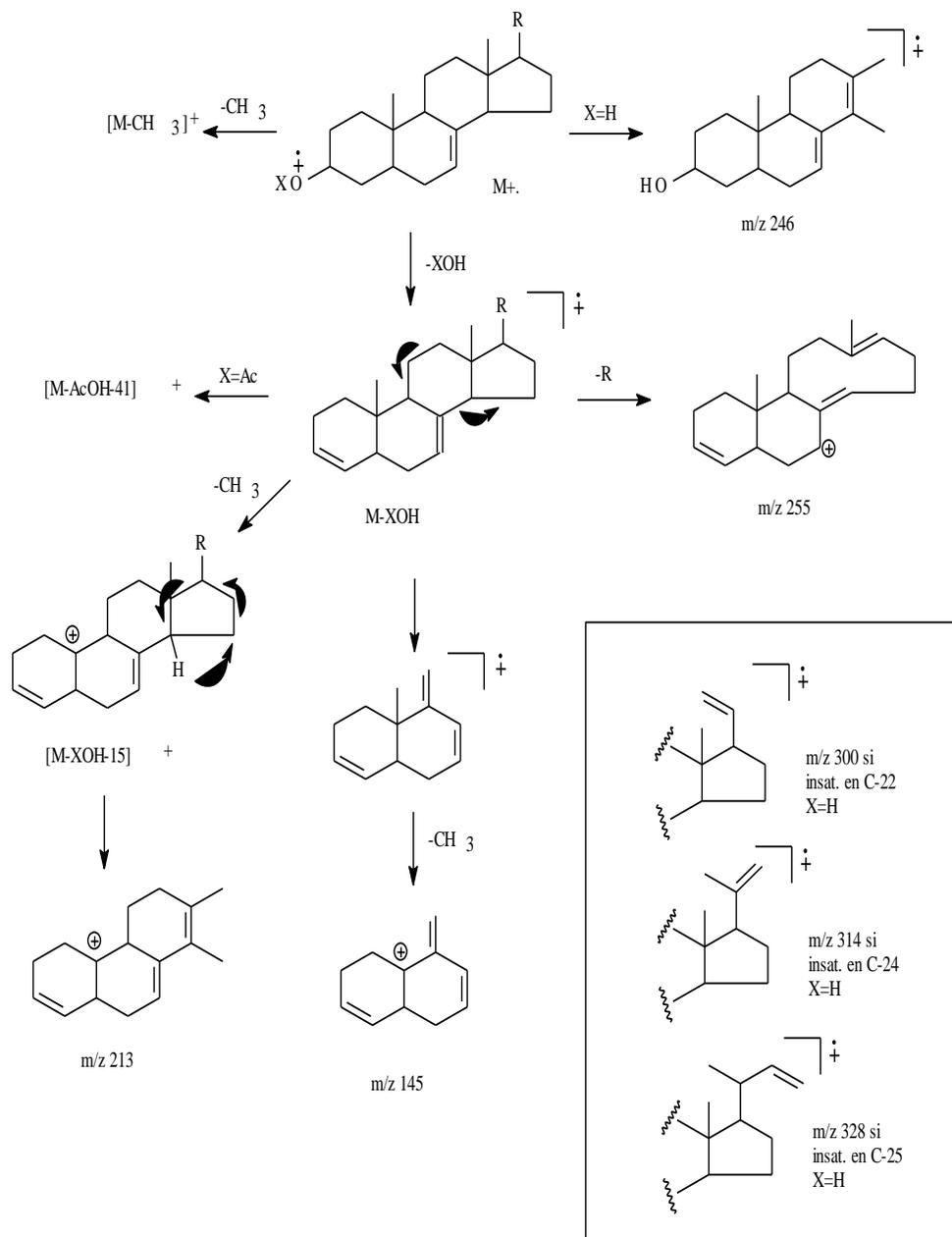


Figura 3.9. Algunos fragmentos característicos del espectro de masas IE de esteroides con el núcleo Δ^7 -androsteno ($X = H, Ac, Me, TMS$).

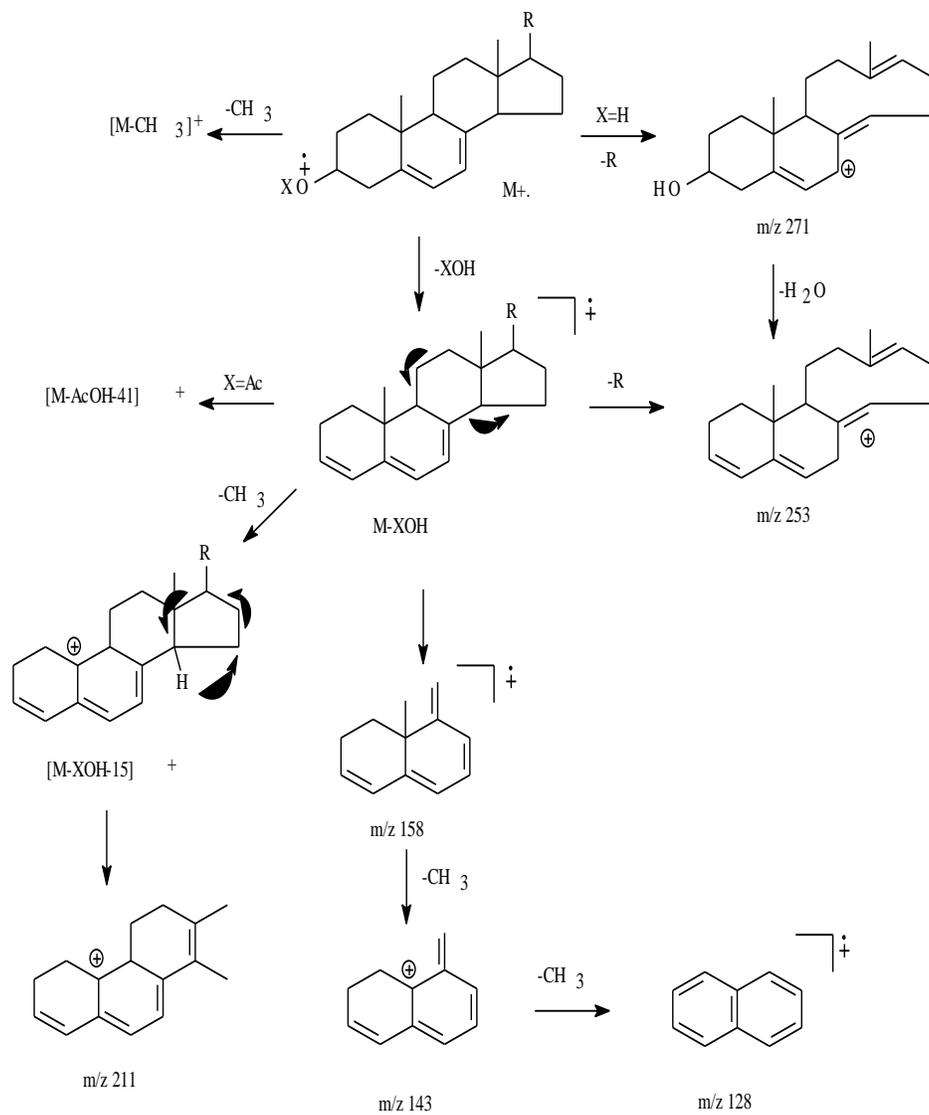


Figura 3.10. Algunos fragmentos característicos del espectro de masas IE de esteroides con el núcleo $\Delta^{5,7}$ -androstadieno ($X = H, Ac, Me, TMS$).

En el caso de esteroides dihidroxilados, sus espectros de masas muestran fragmentos que incluyen las pérdidas de dos moléculas de agua, en general se observan M (generalmente muy débil), M-agua, M-Me-H₂O, M-2H₂O, M-2H₂O-Me, M-R-H₂O, M-R-2H₂O, M-R-D-H₂O, M-R-D-2H₂O, etc.

Espectroscopia ultravioleta-visible

Debido a que la mayoría de esteroides naturales contienen grupos funcionales tales como enlaces dobles C=C y el grupo hidroxilo, sus espectros ultravioleta en metanol (200-360 nm) únicamente muestran un máximo de absorción alrededor de 205 nm, debido a transiciones $\pi-\pi^*$ del enlace doble aislado. Sin embargo, para esteroides con grupos dienos conjugados como por ejemplo el ergosterol, estos sí absorben intensamente en la región citada y la posición de los máximos de absorción se puede predecir con las reglas de Woodward-Fieser para dienos conjugados. Por ejemplo, los esteroides con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno presentan máximos de absorción alrededor de 240, 270, **280** y 290 nm, mientras que los esteroides con núcleo $\Delta^{5,7,9(11)}$ -3-hidroxiandrostatrieno presentan máximos de absorción alrededor de 310, **325** y 340 nm. Los valores en negrilla corresponden a los de máximos de absorción de mayor absorbancia. Los esteroides con el cromóforo Δ^4 -3-oxa muestran un máximo característico alrededor de 240 nm.

Correlaciones estructura y rotación específica

Se han hecho estudios donde se correlaciona la rotación específica de soluciones de esteroides con sus características estructurales. La Tabla 3.4 muestra estas correlaciones.

Tabla 3.4. Correlaciones entre la rotación específica y las características estructurales del esteroide.

ROTACIÓN ESPECÍFICA [α] _D ²⁰	TIPO ESTRUCTURAL	EJEMPLO
Menor de -90°	Enlaces dobles conjugados en el anillo B	Ergosterol (-135°)
-70° a -50°	Enlaces dobles C5-C6 y C22-C23	Estigmasterol (-55.6°)
-45° a -30°	Enlace doble C5-C6	Colesterol (-39.5°)
-25° a +10°	Enlace doble C7-C8 y posiblemente C22-C23	Asterosterol
+10° a +30°	Núcleo saturado	Colestanol (+20°)
+40° a +50°	Enlace doble C8-C9 y posiblemente en la cadena lateral	Zimosterol

Utilidad farmacéutica

Aunque en general a los esteroides naturales se les asocia más con funciones biológicas como componentes estructurales de las membranas celulares, como precursores de hormonas, vitaminas y ácidos cíclicos, entre otras; a nivel de la industria farmacéutica son precursores importantes de diferentes clases de medicamentos esteroides. Para el caso de los monohidroxiesteroides, como el colesterol y relacionados, se ha reportado actividad hipocolesterolemizante, antiinflamatoria potencial, citotóxica y antimicótica, pero es más común encontrar en la literatura científica que son los polihidroxiesteroides (esteroides con más de un grupo hidroxilo en el núcleo), los que presentan diferentes actividades las cuales incluyen actividad citotóxica, antiinflamatoria y antimicrobiana. El desarrollo de nuevos métodos para evaluar la actividad biológica de compuestos tan apolares ha permitido demostrar por ejemplo que el sitosterol presente en *Moringa oleífera*, muestra acción antiinflamatoria *in vitro*.

En el caso de esteroides con el núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno como el ergosterol, estos son convertidos en vitamina D la cual desempeña un papel importante en el metabolismo de minerales como el calcio y fósforo, y esta puede ser convertida en otros análogos hidroxilados que son activos contra la psoriasis y cáncer de tipo epitelial. Algunos esteroides con grupos funcionales peróxido y epóxido, como los aislados del micelio del hongo *Cordyceps sinensis*, presentan actividad antitumoral.

Como se mencionó anteriormente, la mayor importancia de los esteroides naturales es para la industria farmacéutica, en especial la dedicada a la producción de medicamentos esteroides. La Figura 3.11 esquematiza el proceso de conversión mediante reacciones de síntesis química y procesos de fermentación, del estigmasterol en medicamentos fluorocorticoides, la figura 3.12 muestra el proceso de conversión de sitosterol y colesterol en esteroides acetilénicos y la figura 3.13 esquematiza el proceso de obtención de hormonas esteroides a partir de los esteroides de la caña de azúcar.

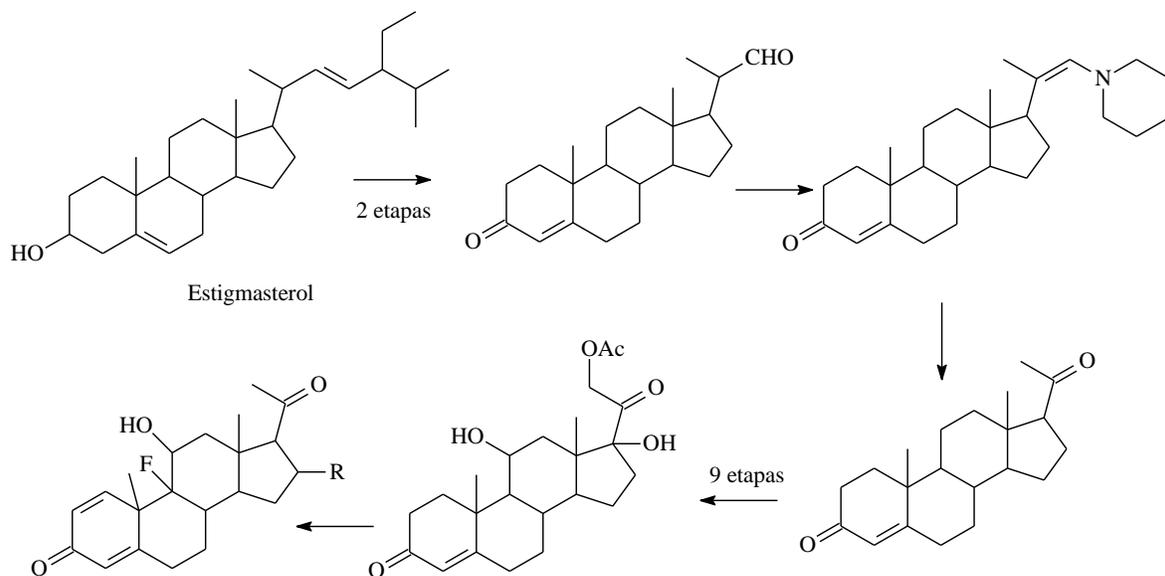


Figura 3.11. Esquema del proceso de conversión química y microbiológica de estigmasterol en fluorocorticoides.

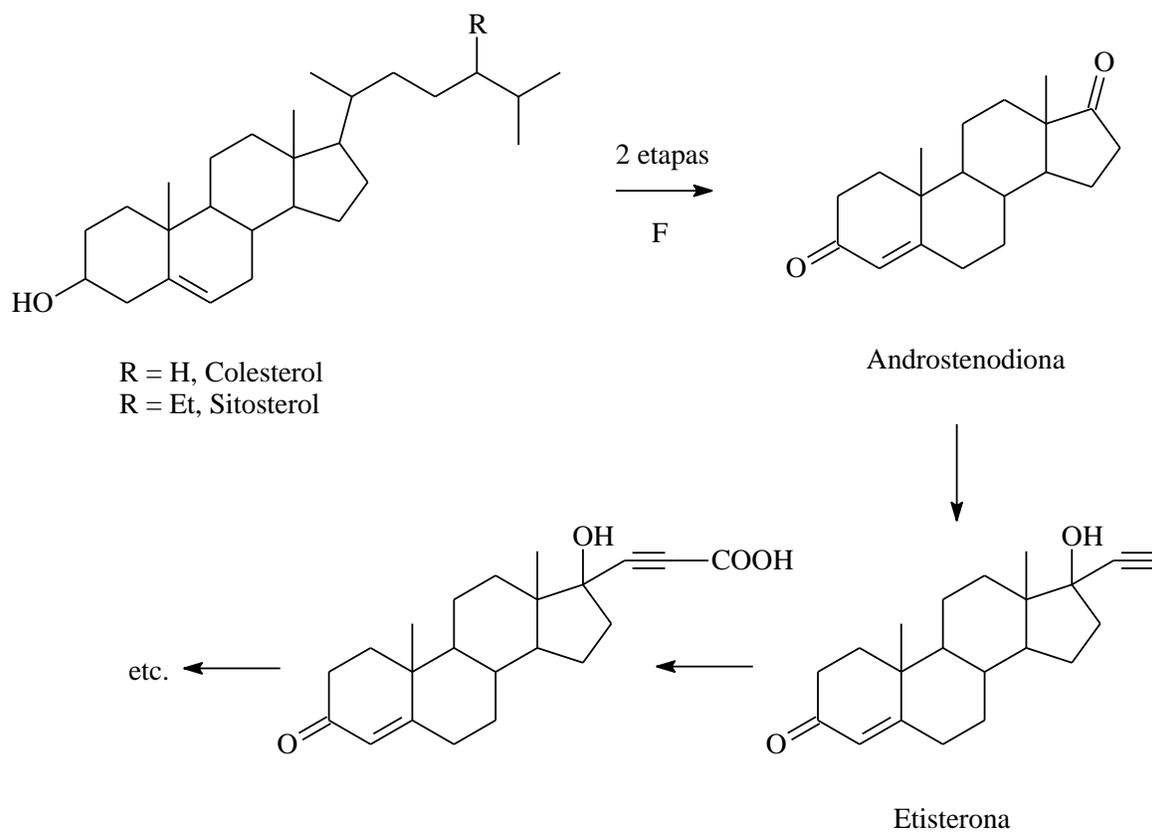


Figura 3.12. Esquema del proceso químico y microbiológico para la conversión de colesterol y sitosterol en medicamentos esteroides.

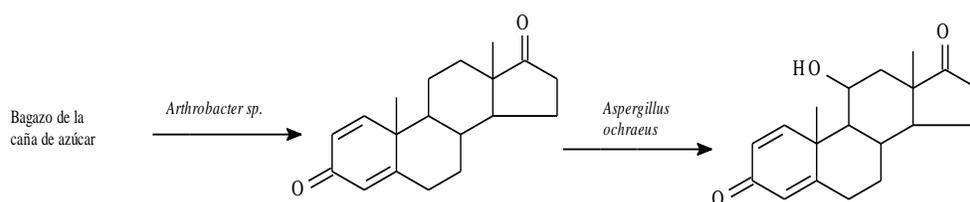


Figura 3.13. Esquema del proceso de obtención de 11-oxiesteroides a partir de los esteroides de la caña de azúcar.

Síntesis

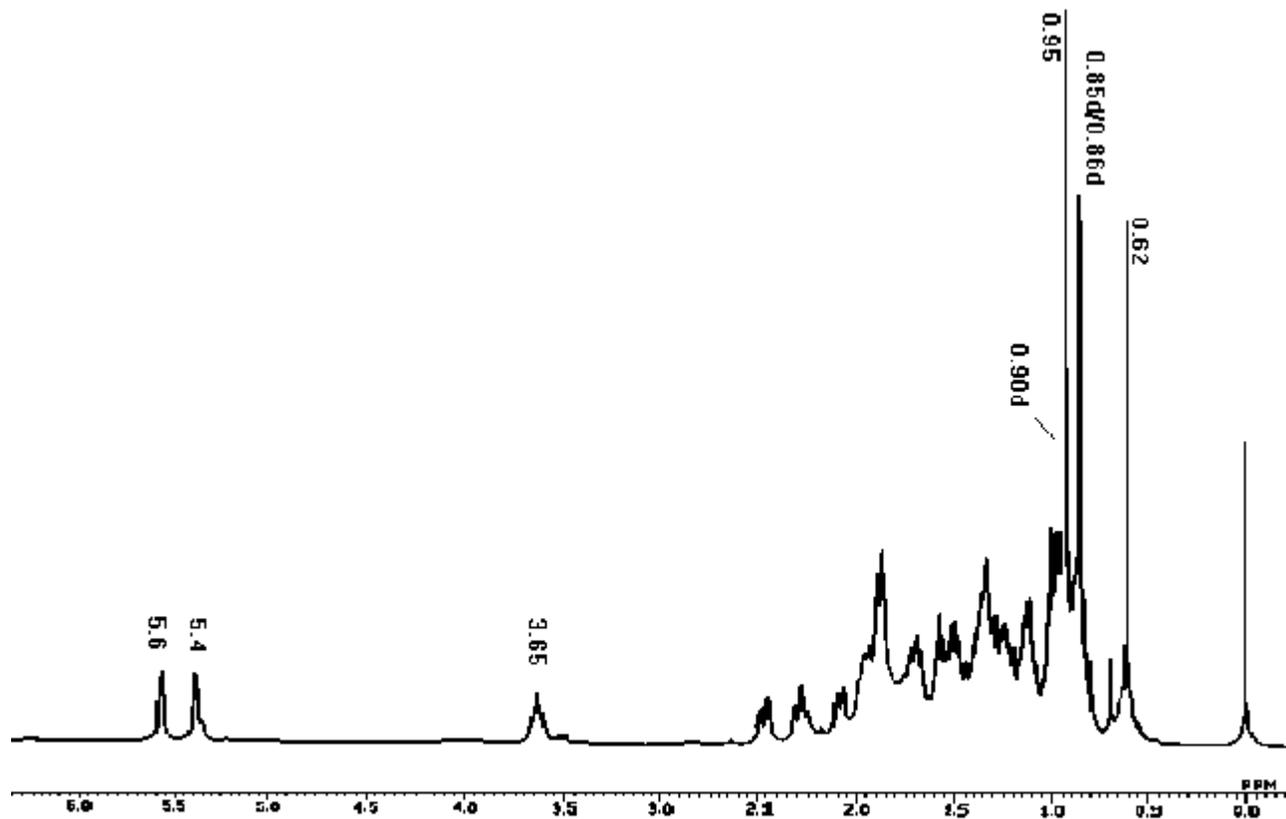
Una gran cantidad de esteroides naturales y sus derivados se pueden obtener mediante reacciones con paladio como catalizador.

Los esteroides con la cadena lateral oxigenada son objeto de investigación porque están implicados en varios procesos biológicos importantes que incluyen la síntesis de ácidos biliares, la regulación y transporte de colesterol, la modulación de la función de receptores estrogénicos, la apoptosis; y se cree que son potencialmente útiles para el desarrollo de productos contra los males de Alzheimer y Parkinson, la esclerosis múltiple la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, y las cataratas.

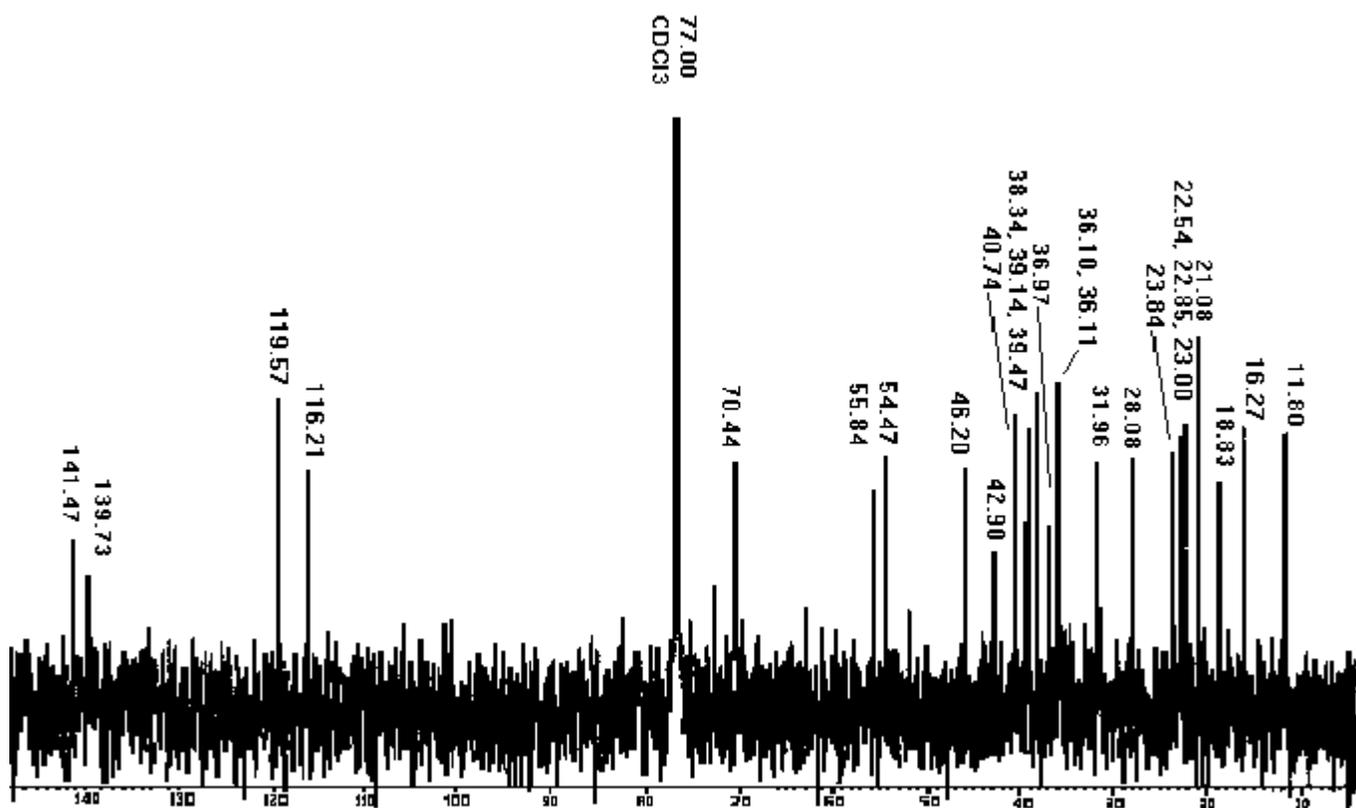
Ejercicio

Proponer la estructura más probable para los esteroides cuyos espectros se presentan a continuación:

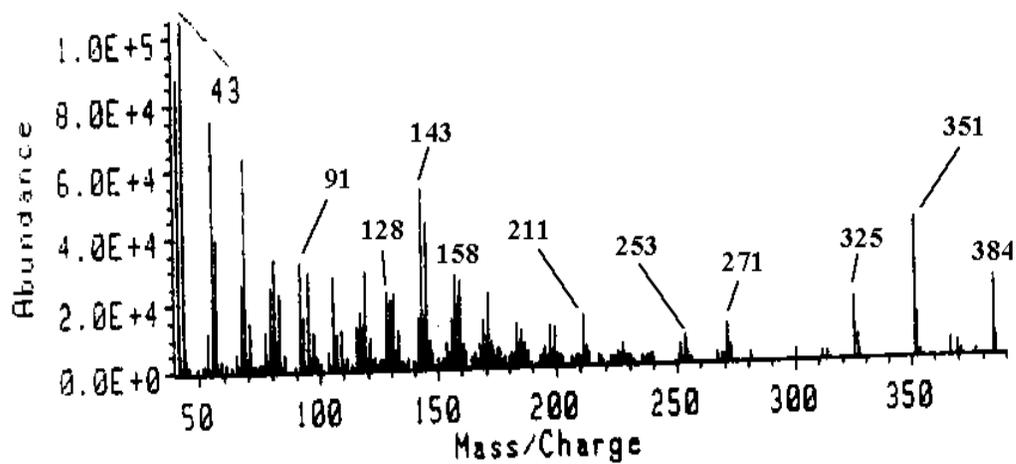
a) Espectro RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3):



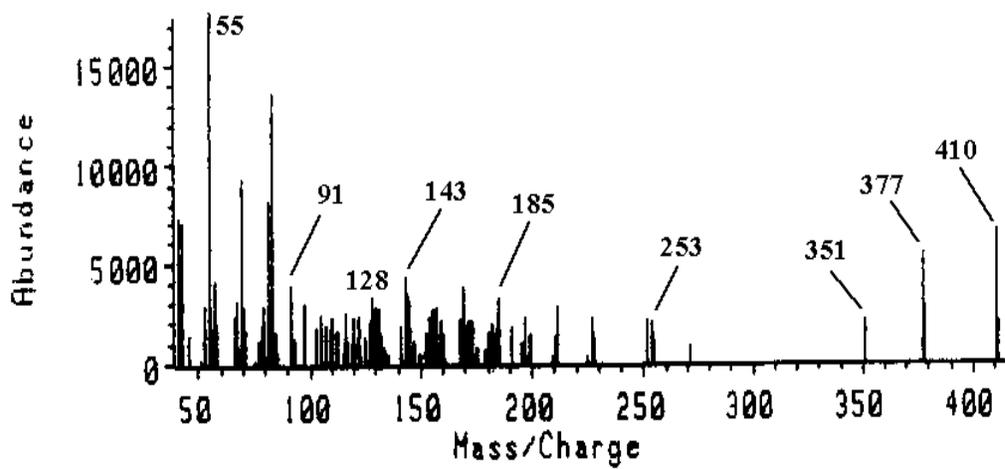
Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):



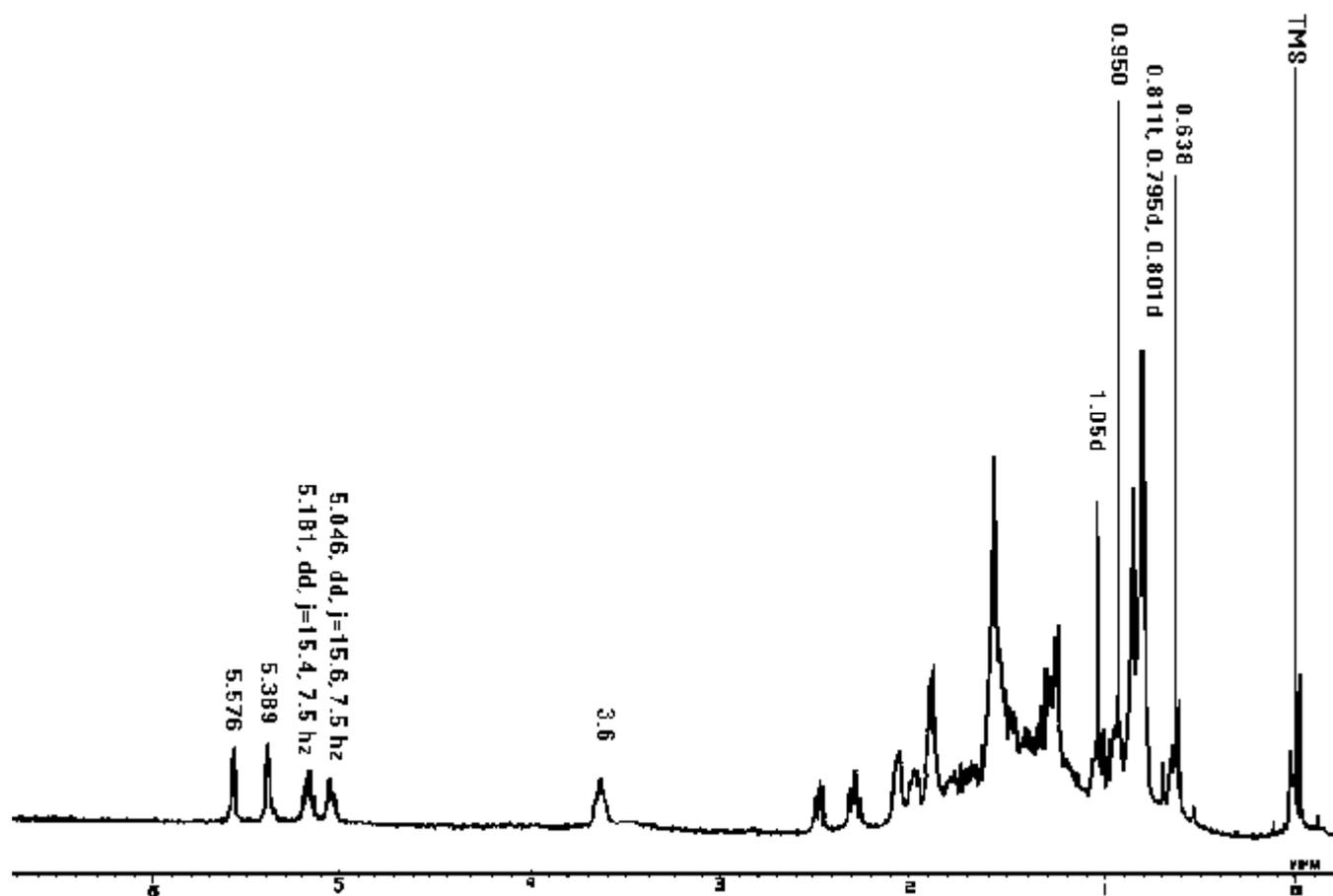
Espectro de masas (70 eV):



b) Espectro de masas (70 eV):



Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3):



Soluciones a los problemas

Problema 1a

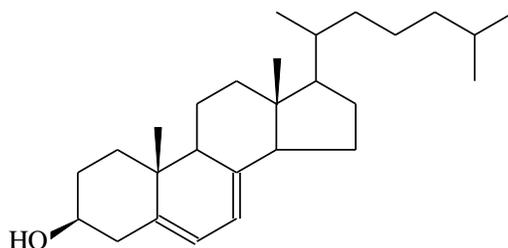
El espectro de masas muestra el ion molecular en m/z 384 consistente con la fórmula molecular $C_{27}H_{44}O$. También pueden observarse los iones m/z 369 (pérdida de un grupo metilo), 366 (pérdida de una molécula de agua) y 351 (pérdida de un grupo metilo y una molécula de agua), característicos de esteroides. Los iones m/z 271 (pérdida de la cadena lateral), 253 (pérdida de la cadena lateral y una molécula de agua), 211 (fisión del anillo D menos agua), indican claramente la presencia de dos insaturaciones en el núcleo, y los iones m/z 158 (fisión entre anillos B y C), 143 (158 menos un grupo metilo) y 128 (158 menos dos grupos metilo) hacen evidente que las insaturaciones están en el C-5 y en el C-7 (ver Figura 6.d). La diferencia entre el ion molecular y el ion m/z 271 (pérdida de la cadena lateral) indica que la cadena lateral de este esteroide es saturada con la fórmula C_8H_{17} . Todo este análisis lleva a la conclusión de que este compuesto es un esteroide con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno con una cadena lateral saturada de ocho átomos de carbono.

El espectro de RMN- 1H confirma el núcleo $\Delta^{5,7}$ -3 β -hidroxiandrostadieno por las señales multiplete en 5.4 y 5.6 ppm integrando cada una para un protón, correspondientes a los protones olefínicos H-6 y H-7, un multiplete (7 señales) en 3.65 ppm correspondiente al protón H-3 α y dos singletes en 0.62 y 0.95 ppm, correspondientes a los metilos H-18 y H-19. Las señales de los CH_3 -26 y CH_3 -27 se observan como dobletes en 0.85 y 0.86 ppm, y los protones del CH_3 -21 se observan como un doblete en 0.9 ppm. Estos datos corresponden a un esteroide con el núcleo

$\Delta^{5,7}$ -3 β -hidroxiandrostadieno con una cadena lateral con un grupo isopropilo terminal. La configuración 3 β -hidroxi la confirma la multiplicidad de la señal del H-3, la cual corresponde a un multiplete extendido 42 Hz originado por acoplamiento de los protones axiales de H-3 α con H-2 y H-4, y a los acoplamientos entre H-3 α y los protones ecuatoriales H-2 y H-4, mientras que la configuración 3 α -hidroxi genera un 'quintete' extendido 28 Hz, originado por acoplamiento protónico axial-ecuatorial y ecuatorial-ecuatorial de H-3 β con H-2 y H-4. El espectro de RMN- ^{13}C muestra 27 señales entre las cuales cuatro corresponden a los carbonos olefínicos C-5 (139.73 ppm), C-6 (119.57 ppm), C-7 (116.21 ppm), C-8 (141.47 ppm) y una al carbono hidroxilado C-3 (70.44 ppm), confirmando la existencia de un esteroide con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3 β -hidroxiandrostadieno, las demás señales corresponden a δ 38.34 (C-1), 31.96 (C-2), 40.74 (C-4), 46.20 (C-9), 36.97 (C-10), 21.08 (C-11), 39.14 (C-12), 42.90 (C-13), 54.47 (C-14), 23.00 (C-15), 28.08 (C-16), 55.84 (C-17), 11.80 (C-18), 16.27 (C-19), 36.10 (C-20),

18.83 (C-21), 36.11 (C-22), 23.84 (C-23), 39.47 (C-24), 27.99 (C-25), 22.54 (C-26) y 22.85 (C-27).

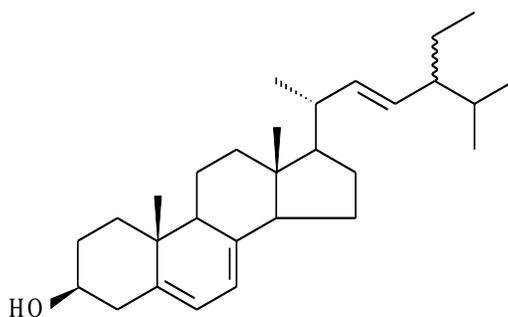
Con este análisis se llega a la conclusión de que este esteroide es el colestano-5,7-dién-3 β -ol (comúnmente llamado 7-dehidrocolesterol).



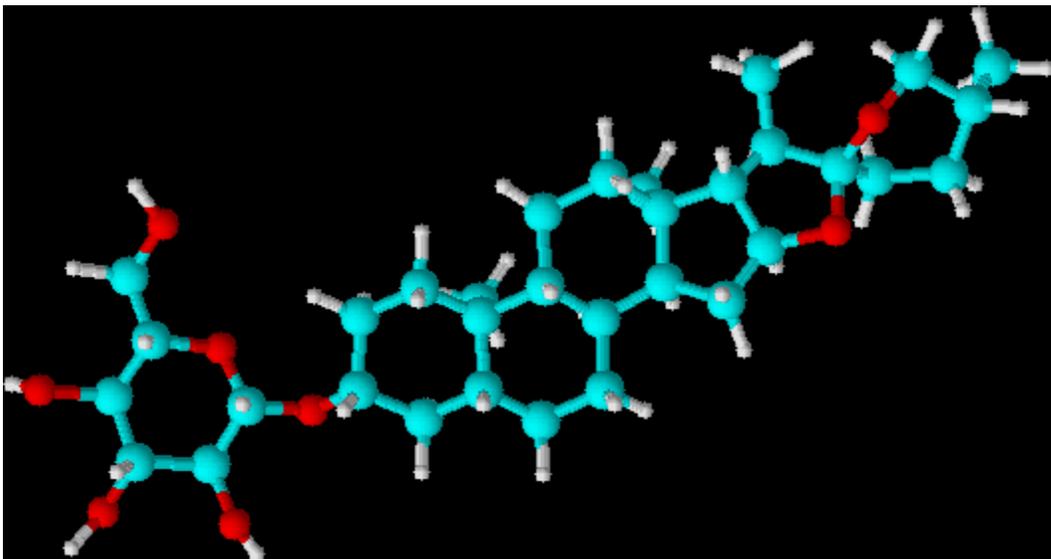
Problema 1b

El espectro de masas muestra el ion molecular m/z : 410 consistente con la fórmula $C_{29}H_{46}O$. También se observa el fragmento m/z 377 (M-metilo-agua) característico de esteroides. Los iones m/z 271 (M-cadena lateral), 253 (271-agua) y 211 (fisión del anillo D y pérdida de una molécula de agua) indican claramente la presencia de dos insaturaciones en el núcleo y los iones m/z 128, 143 y 158 hacen evidente que estas insaturaciones están en el C-5 y el C-7. La diferencia entre el ion molecular y el ion m/z 271 (M-cadena lateral) indica que la cadena lateral de este componente es monoinsaturada con una fórmula $C_{10}H_{19}$. Todo este análisis lleva a la conclusión de que este es un esteroide con un núcleo $\Delta^{5,7}$ -3 β -hidroxiandrostadieno con una cadena lateral monoinsaturada.

El espectro de RMN- 1H muestra las señales δ 0.638 (s, CH_3 -18), 0.950 (s, CH_3 -19), 3.6 (m, H-3), 5.389 (m, H-6), 5.576 (m, H-7). Las señales δ 5.046 (dd, $J=15.6$ y 8.7 Hz) y 5.181 (dd, $J=15.1$ y 6.4 Hz) corresponden a los protones H-22 y H-23 con geometría E. La señal 0.811 (t, $J=7.3$ Hz) es la del grupo CH_3 -29 que está ligado a un grupo metileno. Este análisis permitió asignar la estructura del (22E,24 ξ)-24-etilcolestano-5,7,22E-trién-3 β -ol para esta sustancia.



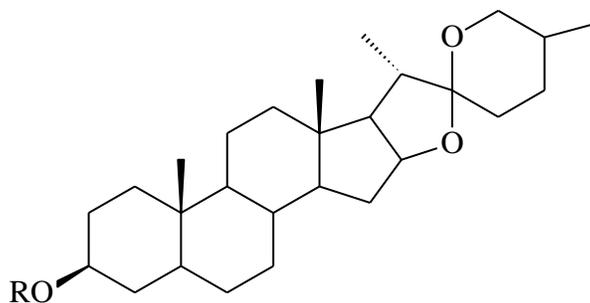
Saponinas y sapogeninas esteroides



En la naturaleza se encuentran sustancias que básicamente son glicósidos terpenoides, que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial de las soluciones acuosas, y que se las denomina comúnmente como saponinas. Se han estudiado dos grandes grupos de ellas como son las saponinas triterpenoides y las saponinas esteroides. Las primeras, aunque son ampliamente distribuidas en las plantas, y se les han atribuido inicialmente propiedades antinutricionales por sus propiedades hemolíticas, membranólíticas y tóxicas contra hongos; más recientemente se están estudiando por sus propiedades benéficas para la salud, como potencial protección contra el riesgo de cáncer, la disminución de los niveles de colesterol y azúcar en la sangre, además de propiedades anti inflamatorias, hipocolesterolemiantes e inmuno modulatorias.

Por otro lado, las saponinas esteroides, comparativamente se encuentran menos distribuidas en los vegetales que los esteroides, pero constituyen desde hace muchos años junto ellos, una materia prima importante para la producción de medicamentos esteroides. No obstante, se han reportado estudios que demuestran que presentan actividades biológicas interesantes como por ejemplo citotóxica, anti cáncer, antiinflamatoria, anti hongos, hemostática, etc.

Las saponinas esteroides son glicósidos con un núcleo espirostando (Figura 3.14) que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas.



R = H, Sapogenina esteroide
 R = carbohidrato(s), Saponina esteroide

Figura 3.14. Estructura química general de sapogeninas y saponinas esteroides tipo espirostanos.

Biogénesis

Aunque prácticamente no existen estudios reportados sobre la biosíntesis de sapogeninas esteroides, se especula que la porción esteroide de las saponinas esteroides (también denominada sapogenina o aglicona esteroide) se origina por la ruta de la acetil coenzima A, vía ácido mevalónico (en citosol) o metileritritol (en plastidios) y escualeno. La figura 3.15 resume esquemáticamente el proceso. Una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de carbono (p.ej. colesterol), este es deshidrogenado para originar 3-colestanona. La colestanona es hidroxilada en los carbonos 16, 22 y 27. Este intermedio altamente hidroxilado en la cadena lateral puede sufrir una deshidratación entre los hidroxilos 16 y 22, lo que origina 3-furostanona; o puede sufrir además otra deshidratación entre los hidroxilos 22 y 27 restantes, lo que da lugar al anillo espirostanos propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostanol, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación mediados por glicosiltransferasas para originar las saponinas esteroides.

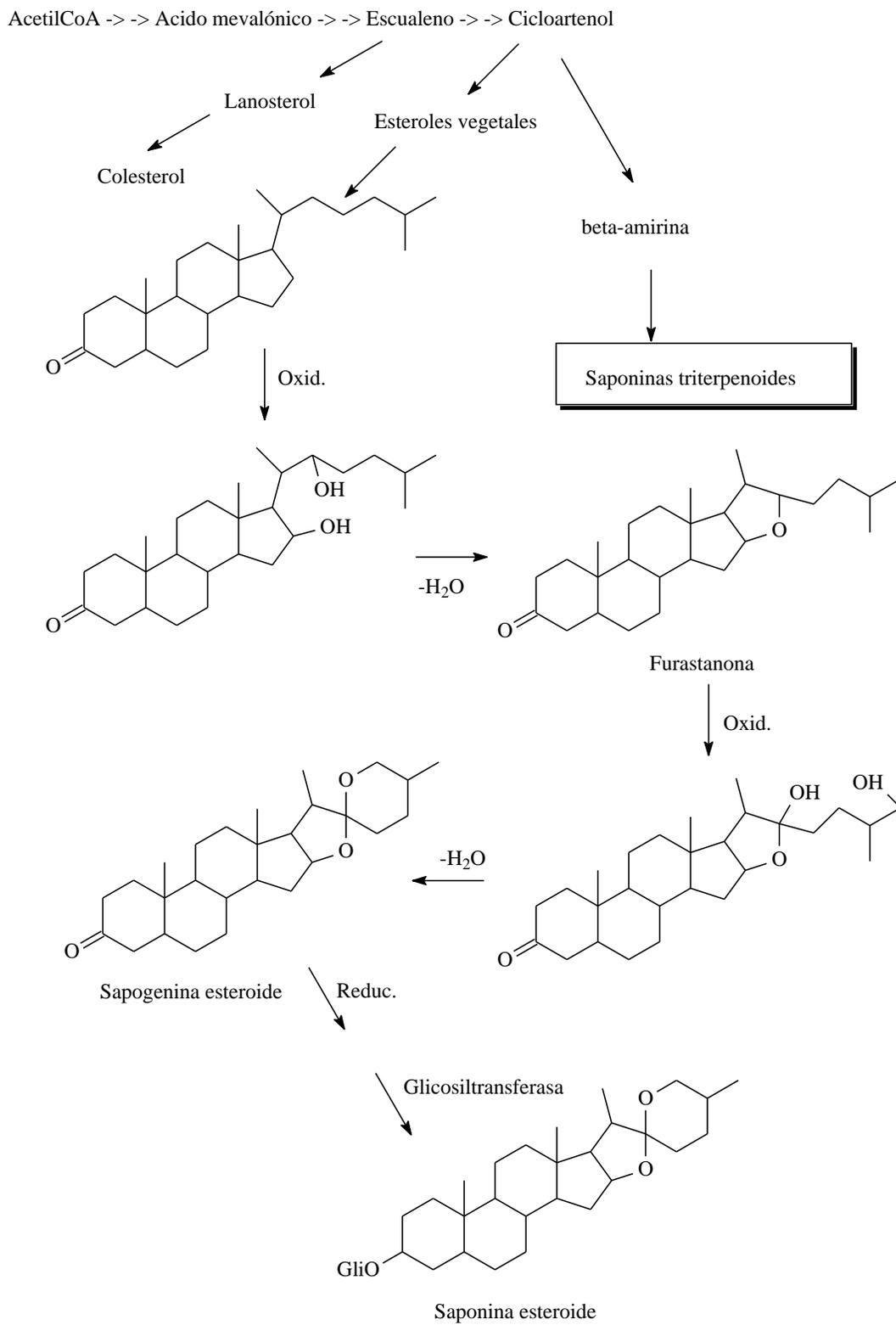


Figura 3.15. Esquema biogénico de sapogeninas y saponinas esteroides.

Hidrólisis

Como O-glicósidos, las saponinas esteroides se hidrolizan fácilmente en medio ácido o enzimáticamente. Ambos procesos liberan una o varias unidades de carbohidratos ligados, y la denominada aglicona o sapogenina esteroide. Las saponinas y sapogeninas presentan las características generales de los glicósidos y agliconas, mencionadas en el capítulo 1.

Para la hidrólisis ácida a 20 mg de saponina se adiciona HCl 2N metanólico. Se refluxa al menos durante una hora. Se neutraliza con una base diluida y se extrae la sapogenina mediante partición con acetato de etilo.

Nomenclatura

Muy comúnmente, a las saponinas esteroides se las denomina con nombres vulgares con la terminación ina u ósido, como por ejemplo dioscina, hecogenina, sarsaporrillósido, etc. La nomenclatura sistemática establece el nombre de estas a partir del núcleo básico ESPIROSTANO, de manera muy similar a como se hace con los esteroides. Es decir, se nombran primero los sustituyentes alquílicos, seguidos la palabra espirost, espirosta, o espirostán, según tengan un solo enlace doble C=C, dos o más enlaces dobles C=C, ó si no tienen enlaces dobles C=C, respectivamente. Luego se nombran los enlaces dobles C=C y su posición en la estructura, y se termina con el o los grupos hidroxilos presentes según corresponda: ol, diol, triol, etc. La figura 3.16 y la tabla 3.5. muestran las estructuras básicas de varias saponinas esteroides naturales.

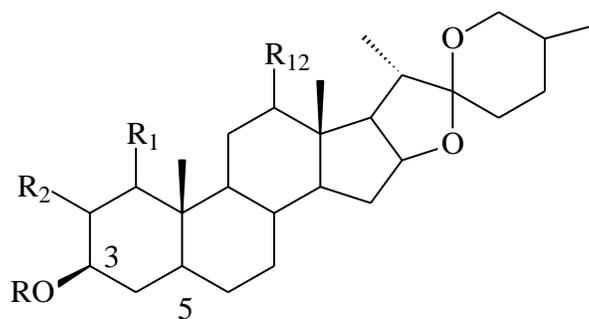


Figura 3.16. Estructura química básica de varias saponinas y sapogeninas esteroides. Para descripción de los sustituyentes referirse a la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Algunas saponinas y sapogeninas naturales y sus fuentes naturales más conocidas.

R	R ₁	R ₂	R ₁₂	C-5	NOMBRE COMÚN	FUENTE
3Glu-1Ram	H	H	H	C-C	Sarsaporrillósido	<i>Smilax sp.</i> , Liliáceas
3Glu	H	H	H	C=C	Dioscina	<i>Dioscorea sp.</i> , Dioscoráceas, por ejemplo "Ñame"
H	H	H	H	C=C	Diosgenina	<i>Dioscorea sp.</i> , Dioscoráceas, por ejemplo "Ñame"
H	OH	H	H	C=C	Ruscogenina	<i>Ruscus sp.</i> , Liliáceas
H	H	H	O	C-C	Hecogenina	<i>Agave sp.</i> , Agaváceas, por ejemplo "Fique"
H	H	H	H	C=C	Yamogenina	-
H	H	OH	H	C-C	Digitogenina	<i>Digitalis sp.</i> , Escrofulariáceas

Para el caso de la sapogenina de la dioscina, la cual se conoce con el nombre común de diosgenina, su nombre sistemático es (24R)-espirost-5-én-3β-ol. Por otro lado, para la hecogenina (la sapogenina de la heconina) su nombre sistemático es: (24R)-11-oxa-espirostán-3-ol.

Ensayos de reconocimiento

Las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante los ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos.

Ensayo de la espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides.

Ensayo de hemólisis

Este ensayo es más confiable que el de la espuma. A una suspensión de glóbulos rojos en solución salina diluida, se añade una solución de la muestra que se presume que es o que contiene saponinas. Si los glóbulos rojos se rompen (lisan o hemolizan), se asume que la prueba es positiva. Este ensayo puede realizarse en tubo de ensayo, en cajas de Petri con

agar-sangre o en cajas de Petri con gelatina-sangre. Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que la interfieren. Esto se logra por tratamiento repetido de la muestra con óxido de magnesio, el cual forma complejos insolubles con los taninos, por lo cual es fácil eliminarlos por filtración.

Este ensayo, junto con el de la espuma, cuando ambos resultan positivos en una muestra vegetal (extracto, fracción ó sustancia pura) permiten establecer que la muestra es ó contiene saponinas. La sola prueba de espuma positiva no es concluyente para determinar la presencia de saponinas. Además, hay sustancias que interfieren estas dos pruebas como son los taninos. Si la muestra contiene taninos, estos pueden eliminarse pues se absorben en MgO.

Ensayo de Liebermann-Burchard

Por la porción esteroide que poseen las saponinas esteroides, este ensayo puede confirmar su presencia por ejemplo en muestras y extractos vegetales, tal como se indicó anteriormente para los esteroides, pero debe tenerse en cuenta que al igual que en el caso de los esteroides -y los esteroides en general- solamente dan un resultado positivo los que tengan grupos dienos conjugados reales o potenciales. Sin embargo, se debe tener en cuenta que muchos compuestos naturales, como los carotenoides, que contienen enlaces dobles C=C conjugados, también dan resultado positivo con este ensayo.

Extracción y aislamiento

Las saponinas esteroides por su carácter glicosídico, son insolubles en solventes apolares. Para obtenerlas de las plantas o animales, el material seco y molido se desengrasa previamente con un solvente apolar (generalmente éter de petróleo o n-hexano). El marco se extrae con etanol, metanol, n-butanol, ó mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua. El extracto acuoso (libre de alcohol) se liofiliza o se concentra en rotavapor, y se hace pasar por resinas de intercambio iónico a fin de eliminar sustancias iónicas. El eluato acuoso se pasa luego a través de materiales como el Sephadex LH-20 para separar las saponinas de otras moléculas como péptidos y macromoléculas que dificultan su purificación cromatográfica. Una vez obtenidas las saponinas crudas, se pueden purificar por cromatografía en columna o líquida de alta eficiencia. En el caso de la cromatografía en columna, se puede utilizar sílica gel y eluentes como los denominados BAW, es decir mezclas de butanol, ácido acético y agua.

La determinación de los carbohidratos ligados se hace mediante la hidrólisis ácida. Los carbohidratos liberados se identifican por cromatografía en papel frente a muestras auténticas o por cromatografía de gases de derivados estables (p. ej. trimetilsililéteres, metiléteres, etc.). Ciertos derivados como los éteres TMS-(+)-butilglicósidos permiten además identificar los isómeros D y L.

La técnica combinada cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) permite también el reconocimiento de los carbohidratos ligados en forma de derivados trimetilsililéteres de alditoles-MBA mediante el método de Hakomori, como se explica más adelante.

Para el caso de mezclas complejas de saponinas, el uso de técnicas como HPLC con detector ELSD, junto a las técnicas de espectrometría de masas electrospray HRESI-MS, ha permitido facilitar el proceso de aislamiento y caracterización de estas sustancias.

Espectroscopia infrarrojo

Además de las bandas de absorción características de las sustancias esteroideas, las saponinas y sapogeninas esteroideas presentan varias bandas originadas por tensiones C-O de los anillos pirano y furano, localizadas alrededor de 850, 900, 920 y 987 cm^{-1} . Por otro lado, la intensidad relativa entre las bandas a 900 y 920 cm^{-1} permite determinar la estereoquímica del carbono 25. De acuerdo con esto si la banda alrededor de 900 es más intensa que la de 920 cm^{-1} , la configuración del carbono 25 es *R*, y en el caso inverso es *S*. Algunos procedimientos para la detección y valoración de sapogeninas esteroideas se basan en estas bandas de absorción.

Espectrometría de masas

Las sapogeninas esteroideas presentan espectros de masas de impacto electrónico, en los cuales pueden apreciarse el ion molecular y los fragmentos m/z : 115 y 139, siendo alguno de estos el pico base del espectro. La figura 4 muestra los mecanismos de fragmentación que explican la formación de estos dos últimos iones. Budzikiewicz y col. también racionalizaron los mecanismos de formación probable para iones M-114, M-129 y M-143, la figura 3.17 describe los mecanismos de formación de los iones característicos m/z 115 y 139. Se ha reportado que, utilizando la técnica de espectrometría de masas con trampa de iones y triple cuadrupolo lineal, se forma un fragmento similar al m/z 139, pero con valor m/z 144 Da.

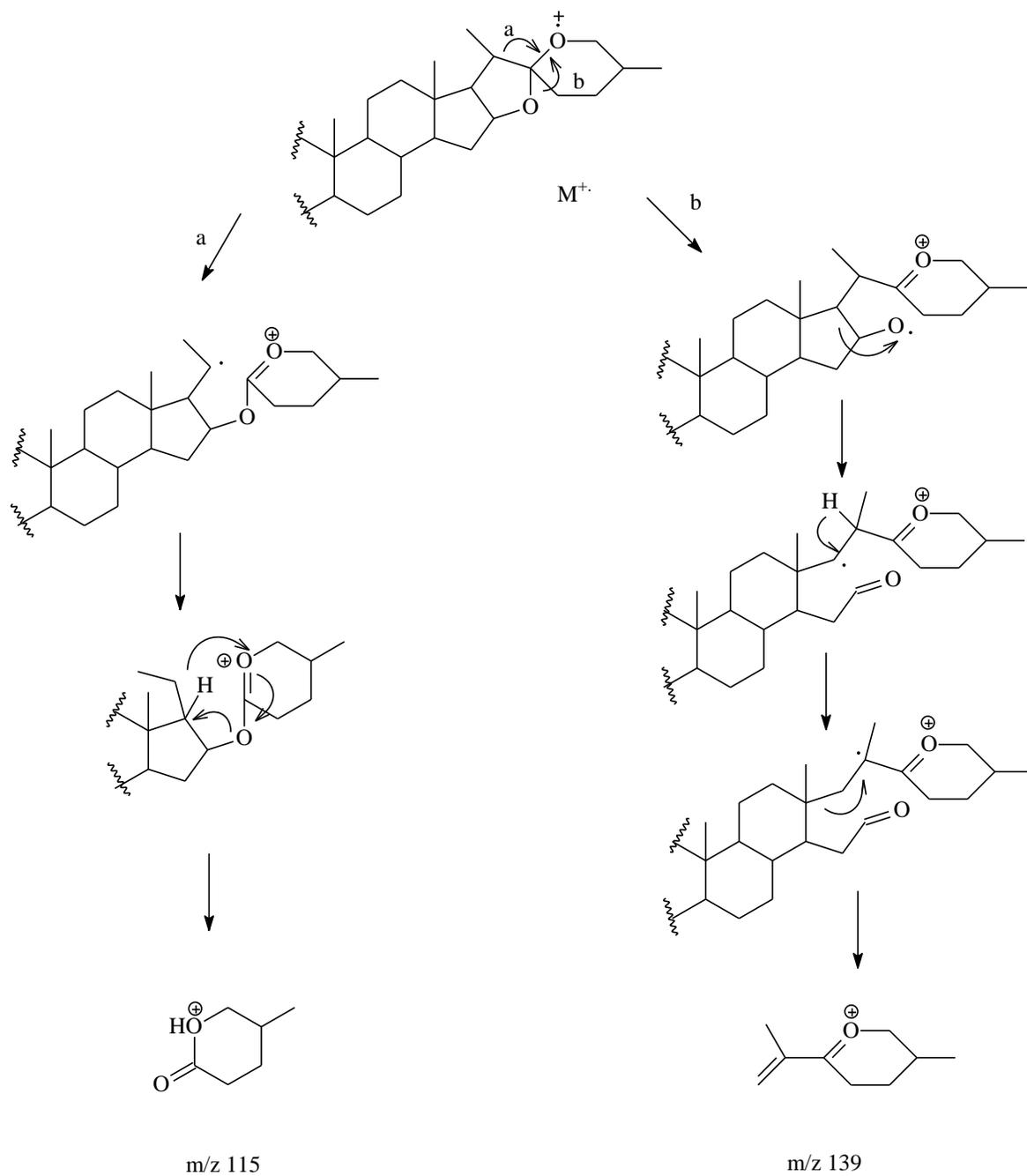
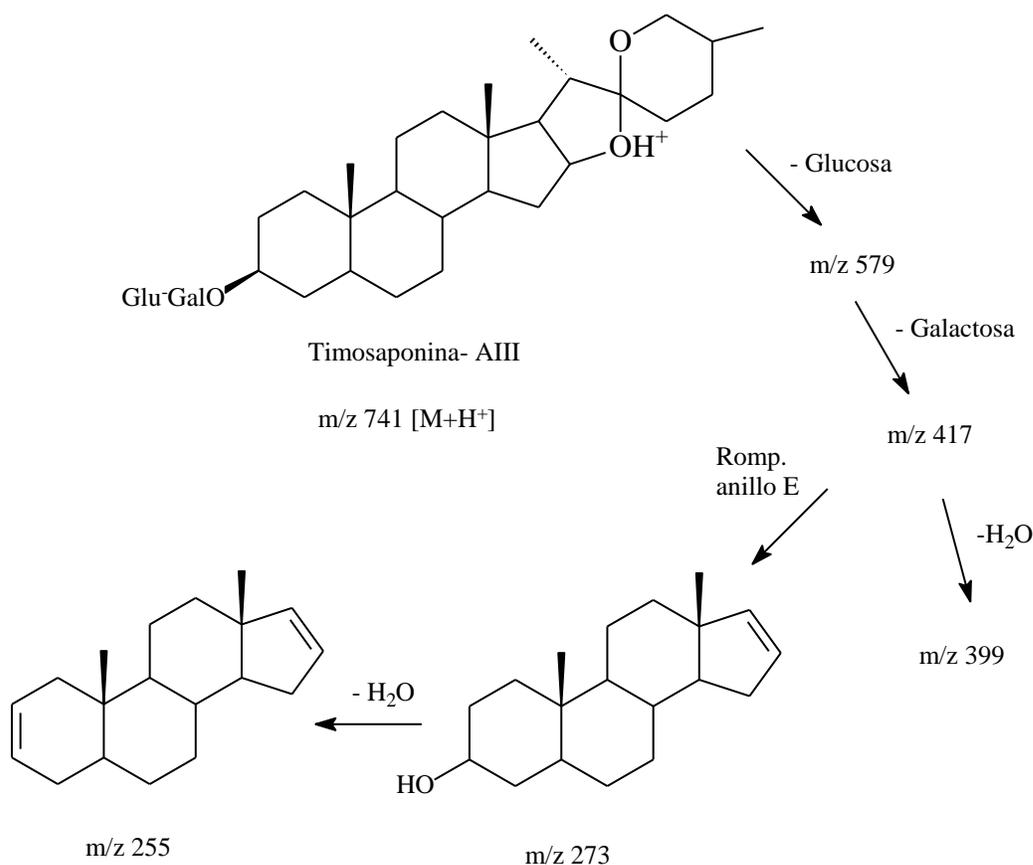


Figura 3.17. Mecanismos de formación de los iones m/z 115 y 139, característicos en el espectro de masas 70 eV de saponinas esteroideas.

Para el análisis e identificación de las saponinas esteroides se están utilizando actualmente técnicas combinadas como ultra-HPLC con espectrometría de masas ESI. Estos espectros permiten la determinación no solo del peso molecular a través del ión pseudomolecular formado con especies como el ión amonio, sino que también permiten determinar las

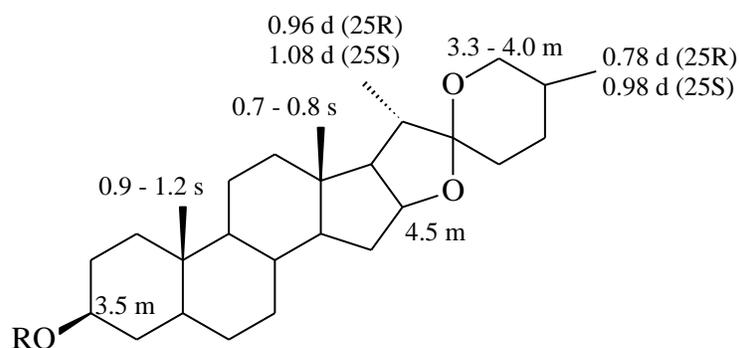
unidades de azúcares ligados, como en el caso del fistulósido-C identificado en *Anemarrhena asphodeloides*. De esta planta se aisló también la timosaponina-AIII, que muestra en su espectro el ión pseudomolecular m/z 741 ($M+H^+$), junto con los fragmentos m/z 579 (pérdida de una molécula de glucosa), 417 (pérdida de una molécula de glucosa y una de galactosa), 399 (417 – agua), 273 (rompimiento del anillo D) y 255 (273 – agua). Estos estudios permitieron establecer que si los iones m/z 417, 255 y 273 se observan en el espectro MS/MS la saponina no tiene hidroxilos en los anillos A, B, C y D. Por otro lado, si se observan los iones m/z 433 y 415, la saponina debe tener un hidroxilo en alguno de los anillos A, B, C o D.



Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

Las saponinas esteroides pueden reconocerse en sus espectros de Resonancia Magnética Protónica por las señales de los protones localizados sobre los carbonos unidos a átomos de oxígeno como son: C-16, C-3, C-26, C-18 y C-19. La señal del protón 16 aparece alrededor de 4.0-4.5 δ en forma de un cuartete o un doble doblete. La señal del protón 3 aparece alrededor de 3.5 δ cuando en el carbono 3 existe un grupo hidroxilo. Los protones del C-26 resuenan en 3.3-4.0 δ (H-26 ecuatorial dd, $J=10$ y 2-3 Hz; H-26 axial dd, $J=10$ y 10 Hz). Los protones del

metilo-18 resuenan como un singlete en 0.7-0.8 ppm y los del metilo-19 en 0.9-1.2 ppm, también en forma de singlete. El desplazamiento químico de los protones de los metilos 21 y 27 depende de la estereoquímica del C-25. Así, estos resuenan como dobletes ($J=7$ hz) alrededor de 1.08 y 0.98 ppm respectivamente en isómeros 25S, mientras que en los isómeros 25R resuenan en 0.96 y 0.78 ppm respectivamente. La figura 3.18 resume estas anotaciones. Al realizar el cálculo del espectro RMN- ^1H , con la herramienta en línea nmrdb.org, se obtienen valores de desplazamiento de las señales de los protones mostrados en la figura 3.18. con una aproximación de ± 0.5 ppm.

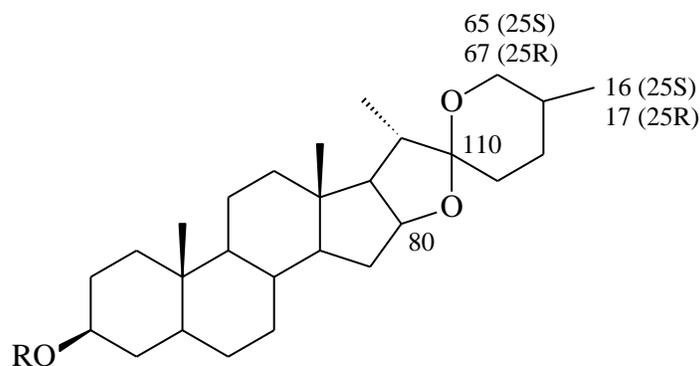


R = H, Sapogenina esteroide

R = carbohidrato(s), Saponina esteroide

Figura 3.19. Desplazamientos químicos RMN de varios protones del sistema espirostanos.

En los espectros de Resonancia Magnética de Carbono-13, se aprecian las señales de los carbonos 16, 22, 25, 26 y 27, alrededor de 80, 110, 30, 65 y 17 δ respectivamente. En el caso del isómero 25S los carbonos C-25, C-26 y C-27 resuenan alrededor de 27, 65 y 16 ppm respectivamente si no tienen sustituyentes oxigenados, mientras que en el isómero 25R resuenan alrededor de 30, 67 y 17 ppm, respectivamente. La figura 3.20 resume los desplazamientos químicos observados para varios de los carbonos característicos de los compuestos con el sistema espirostanos. Al realizar el cálculo con la herramienta en línea nmrdb.org se obtienen desplazamientos químicos muy similares a los mostrados en la figura 3.20, con aproximación de ± 3 ppm.



R = H, Sapogenina esteroide
 R = carbohidrato(s), Saponina esteroide

Figura 3.20. Desplazamientos químicos de las señales de RMN-¹³C de varios carbonos presentes en el sistema esteroideo.

Regla de Klyne

A partir de las rotaciones ópticas de la saponina y la sapogenina correspondiente, es posible determinar si los carbohidratos ligados están enlazados a través de un enlace α - ó β -glicosídico.

Para esto se convierten los valores $[\alpha]_D$ de la saponina y la sapogenina en valores de rotaciones moleculares $[M]_D$ mediante la fórmula:

$$[M]_D = [\alpha]_D \cdot M / 100$$

donde M es el peso molecular. Con estos valores se determina la diferencia:

$$\Delta C = [M]_D \text{ saponina} - [M]_D \text{ sapogenina}$$

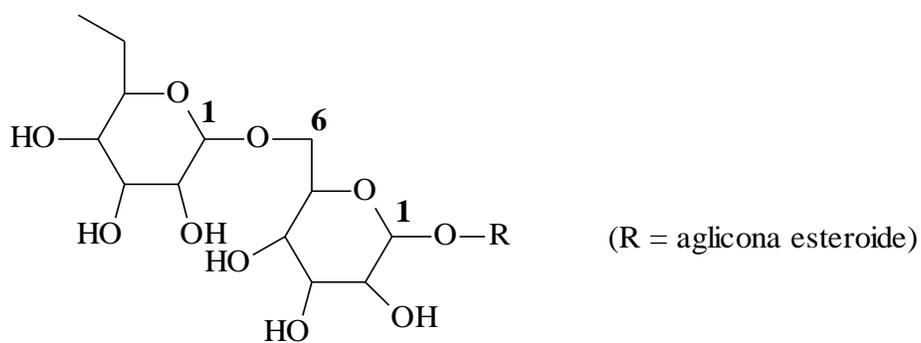
La regla de Klyne establece que si ΔC es alrededor de $+305^\circ$, el enlace glicosídico es α , pero si es alrededor de -61° , el enlace glicosídico es β .

Método de Hakomori

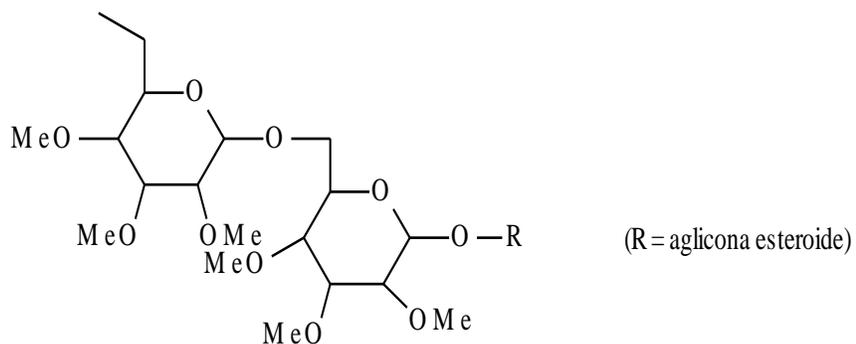
Debido a que muchas saponinas esteroides contienen más de un monosacárido ligado, generalmente en el C-3, para poder establecer las uniones glicosídicas entre ellos y asignar la estructura total de tales compuestos se utiliza el denominado método de Hakomori. Este método se basa en que al hacer una metilación exhaustiva del glicósido, todos los grupos hidroxilos libres presentes en los carbohidratos ligados son convertidos en grupos metoxilos. En cambio, los enlaces glicosídicos y hemiacetal permanecen estables. La hidrólisis ácida del producto de metilación libera los grupos hidroxilos que participan en los enlaces glicosídicos a determinar y rompe los enlaces hemiacetal generando un grupo carbonilo y un hidroxilo

libre en cada molécula de carbohidrato. Luego de esto se hace una reducción con NaBH_4 , en la cual los grupos carbonilos obtenidos a partir de los enlaces hemiacetal son reducidos hasta grupos metileno. La acetilación de esta mezcla lleva a que los hidroxilos formados por la hidrólisis de los enlaces hemiacetal, y los hidroxilos obtenidos por la reducción del enlace éter formen los correspondientes acetatos. Los productos obtenidos corresponden a los denominados alditoles metilados y acetilados, y el patrón de metilación/acetilación permite establecer las uniones entre ellos. Estos derivados son lo suficientemente estables y se pueden identificar por CG-EM, y utilizando fases estacionarias quirales se pueden reconocer si se trata de derivados alditoles de monosacáridos isómeros *D* ó *L*.

Para comprender mejor este método supongamos que se tiene una saponina como la siguiente:



Al someter a metilación exhaustiva esta saponina se produce:



Al someter a hidrólisis ácida este producto se rompen los enlaces glicosídico (1→6) y (1→O-aglicona), y los dos enlaces hemiacetal de los dos monosacáridos, se obtiene:

Distribución natural

Las saponinas esteroides se encuentran principalmente en varias familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliáceas, dioscoreáceas y amarilidáceas (agaváceas). En las dicotiledóneas, se las ha encontrado en las familias solanáceas y escrofulariáceas. En el reino animal, las estrellas de mar constituyen un ejemplo de animales con saponinas esteroides.

Importancia farmacéutica

Aunque las investigaciones más recientes muestran que algunas saponinas esteroides tienen actividades biológicas tales como antimicrobiana, citotóxica, anticáncer ictiotóxica, molusquicida, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, anti-úlceras, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antifertilidad, antihepatotóxica, hemolítica, antimicótica, etc.); fundamentalmente se han constituido desde hace bastante tiempo, como precursores únicos para la producción industrial de muchos medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos. La producción industrial de estas sustancias requiere una serie de procesos microbiológicos de fermentación y una serie de conversiones químicas relativamente complejas y en su gran mayoría patentadas por importantes laboratorios farmacéuticos. La Figura 3.21, muestra un esquema parcial de la producción de hormonas esteroides a partir de la diosgenina obtenida de los rizomas de *Dioscorea sp.* La Figura 3.22 muestra una parte del esquema de la producción de medicamentos corticoides a partir de la hecogenina acetilada. La Figura 3.23 describe la obtención de medicamentos esteroides a partir del denominado "compuesto s" que es el intermedio clave para varias clases de medicamentos esteroides.

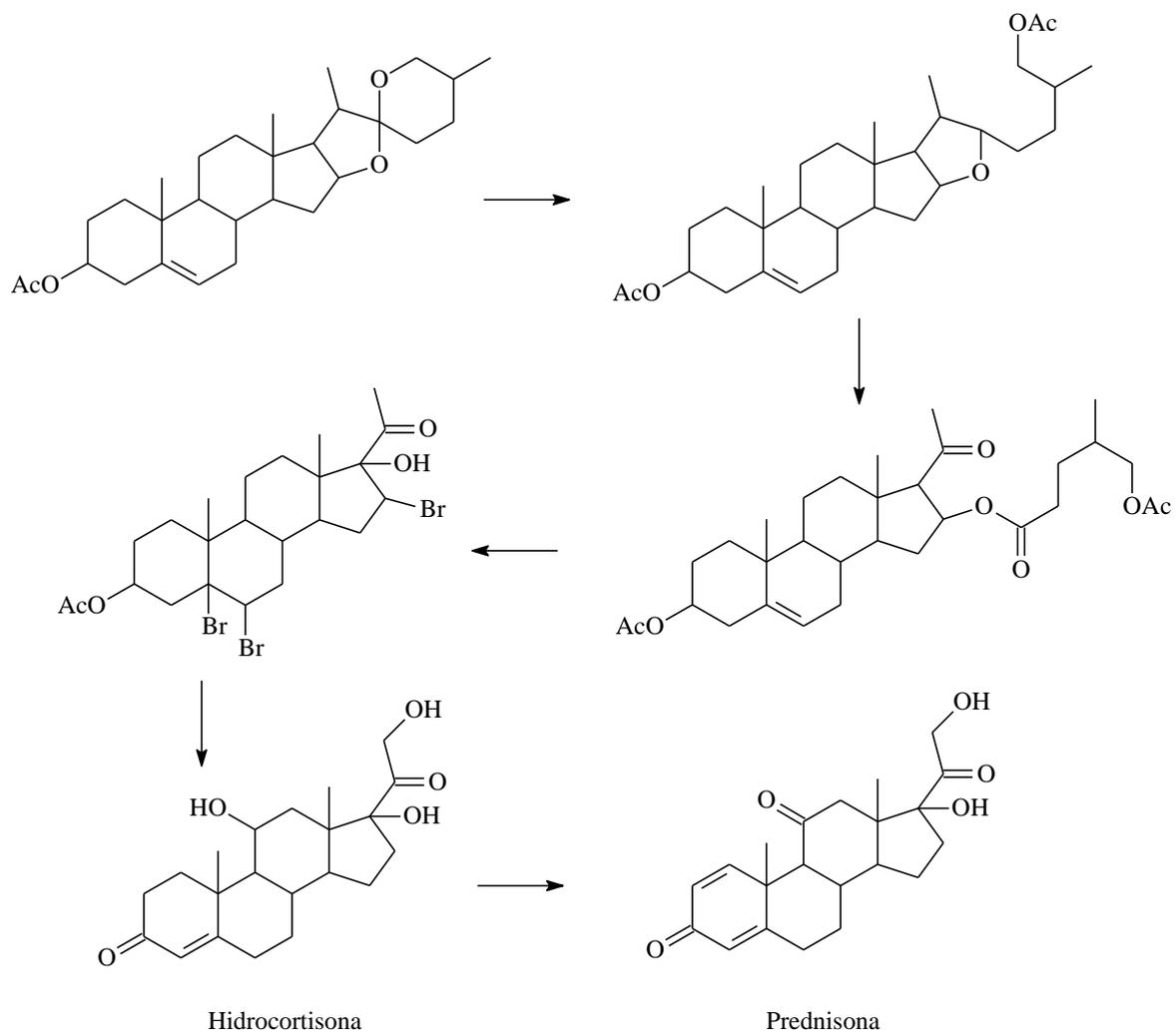


Figura 3.21. Esquema del proceso de obtención de medicamentos esteroides a partir de diosgenina.

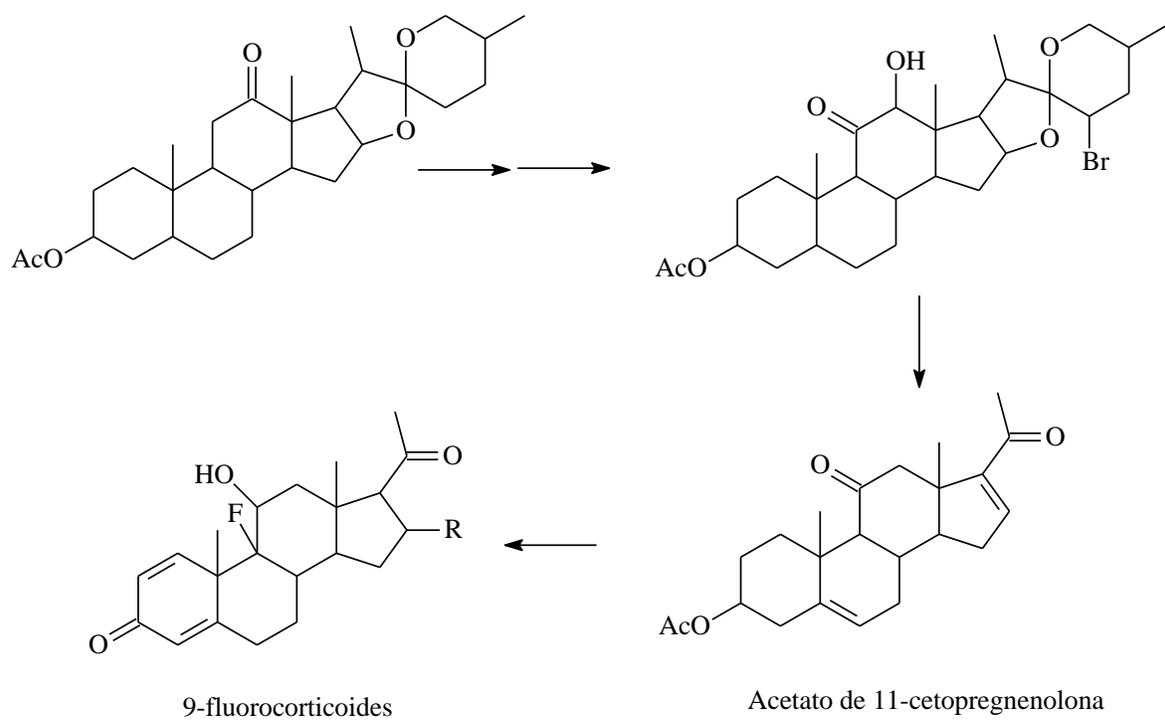


Figura 3.22. Esquema de la conversión de acetato de hecogenina en medicamentos fluorocorticoides.

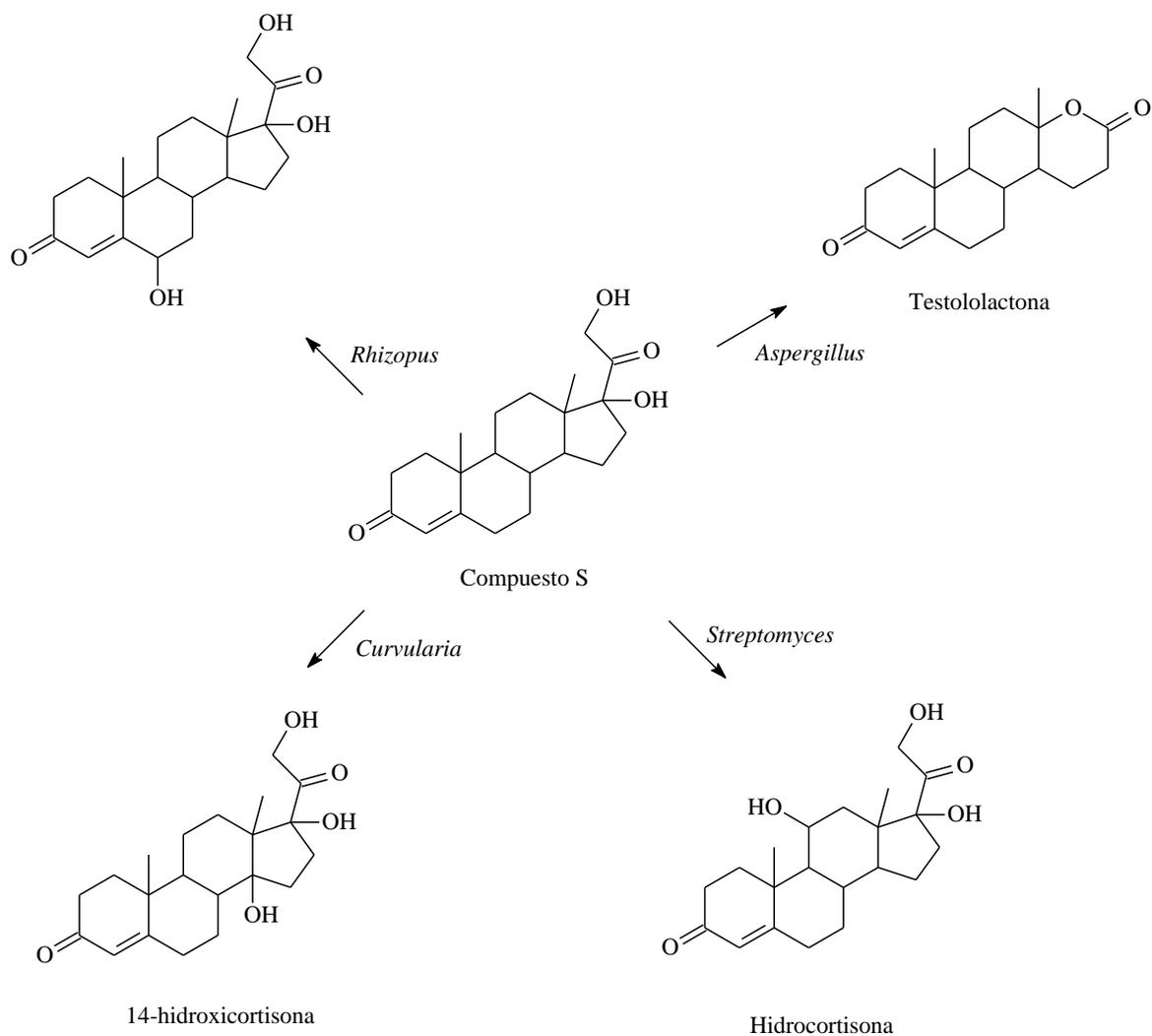
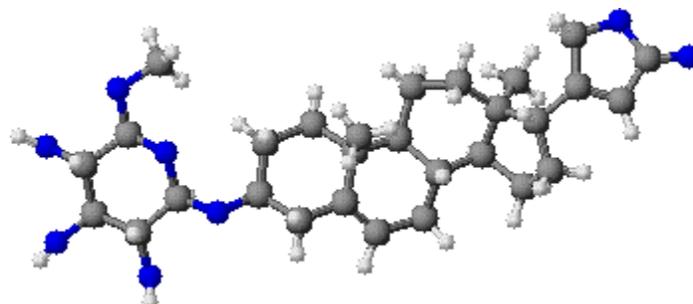


Figura 3.23. Algunas conversiones microbianas del denominado compuesto "S" un intermedio clave en la producción de medicamentos esteroides.

Glicósidos cardiotónicos



A lo largo de la historia de la ciencia, se ha mostrado que numerosas naturales además de su uso en diferentes actividades humanas que incluyen la caza y la guerra. Pero también se les han atribuido a muchas de ellas, propiedades mágico-religiosas. Esos usos y costumbres han servido para el desarrollo y conocimiento de muchas drogas y medicamentos. En el caso particular de algunas sustancias obtenidas de plantas y animales, que algunas comunidades han utilizado para la elaboración de sus armas primitivas como lanzas y flechas. Es conocido por ejemplo el caso de indígenas que, en las puntas de sus flechas y lanzas, depositan pequeñas cantidades de venenos obtenidos de ranas, que producen parálisis cuando dan en el blanco de animales como algunas especies de monos que se constituyen en sus presas de caza. Otro ejemplo es el uso de preparaciones a base de plantas que se depositaban en la punta de las lanzas y flechas por comunidades indígenas para sus labores de caza y para la guerra, muchos años después cuando se investigaron los componentes químicos de estas plantas se encontraron sustancias que tenían efecto directo en el corazón. Históricamente se han conocido los primeros como “venenos de sapo”, y los últimos como “venenos de flecha”. Actualmente, se conoce que la producción de sustancias tóxicas es un sofisticado mecanismo de defensa utilizado por muchas plantas, microorganismos y animales tanto marinos como terrestres, para defenderse de sus depredadores incluido el hombre.

A continuación, se presentan diferentes aspectos químicos y de actividad biológica de algunos de las sustancias presentes en estos venenos, y que tienen aplicación farmacéutica.

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona α,β -insaturada o δ -lactona- α,β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca. Se conocen entonces según el anillo lactónico dos grandes clases de cardiotónicos: los cardenólidos, con anillo de γ -lactona, y los bufanólidos o escilanólidos, con anillo de δ -lactona. La figura 3.26 muestra la estructura estereoquímica general de los cardenólidos y bufanólidos.

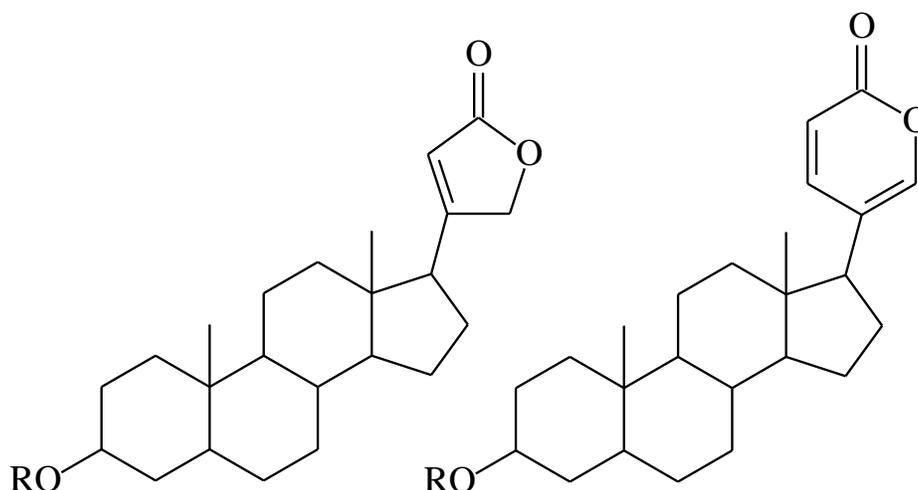


Figura 3.26. Estructura general de cardiotónicos. Cardenólidos a la izquierda, bufanólidos a la derecha (R = H, agliconas; R = carbohidratos, glicósidos).

Biogénesis

Se tienen evidencias experimentales de que la progesterona es un intermedio en el proceso. La progesterona formada se condensa con una unidad C_2 para dar origen a una cadena lateral de 4 carbonos típica de los cardenólidos. La posterior oxidación y deshidratación origina el anillo γ - lactona- α,β -insaturado.

Distribución natural

Los cardiotónicos son sustancias naturales menos distribuidas que los esteroides y las saponinas, y se encuentran principalmente en las hojas de plantas de las familias Escrofulariáceas, Apocináceas (especialmente los géneros *Nerium*, *Thevetia*, *Cerbera*, *Apocynum* y *Strophanthus*), Liliáceas, Ranunculáceas y Moráceas.

Los bufanólidos se han encontrado también en ranas del género *Bufus*, y en las alas de mariposas monarca, han sido considerados de interés por su potencial anticancerígeno.

Ensayos de reconocimiento

Los cardenólidos se pueden reconocer en muestras biológicas mediante los ensayos de coloración con varios reactivos nitro, tal como se anotó para las sesquiterpenlactonas; específicamente con los reactivos de Kedde, Legal y Raymond. Al igual que las saponinas esteroides, dan resultados positivos con el reactivo de Liebermann-Burchard, lo que permite diferenciarlos de las lactonas terpénicas y las cumarinas.

Por otro lado, los carbohidratos ligados incluyen generalmente a la D-glucosa, L-rhamnosa y desoxiazúcares. Estos últimos pueden reconocerse mediante el ensayo de Keller-Kiliani.

Hidrólisis

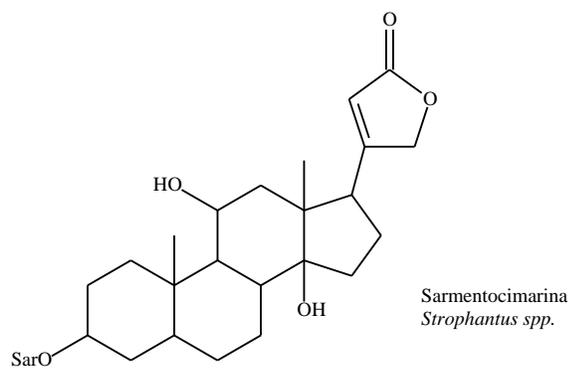
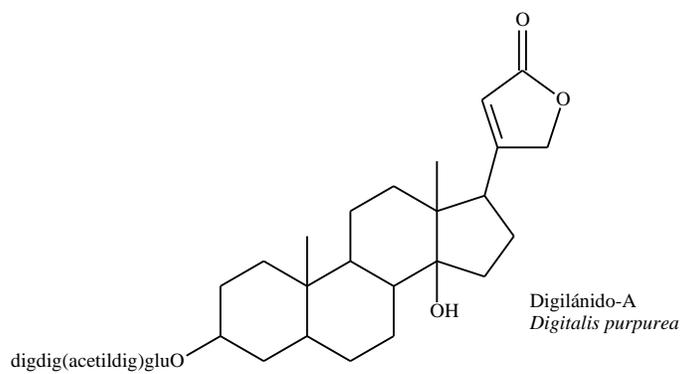
Los glicósidos cardiotónicos se hidrolizan fácilmente en soluciones ácidas liberando la sapogenina y los carbohidratos ligados. En medio alcalino, además de liberarse la sapogenina puede ocurrir la epimerización sobre el carbono 17 y apertura del anillo lactónico.

Hechos estructurales

Los cardiotónicos naturales en su gran mayoría, poseen:

- un anillo lactónico α,β -insaturado en posición 17 β
- un grupo hidroxilo o glicosilo en posición 3 β
- un grupo hidroxilo en posición 14 β
- configuración **cis** entre los anillos A/B y C/D
- otros grupos hidroxilo en 1, 5, 12, 16, etc.
- el grupo metilo 19 algunas veces oxidado hasta alcohol o aldehído
- 1 a 4 unidades de carbohidrato ligadas al oxígeno del carbono 3
- los carbohidratos ligados son principalmente glucosa y desoxiazúcares como digitoxosa, cimarosa, etc.

Los desoxiazúcares son una característica importante de los glicósidos cardiotónicos, ya que esta clase de carbohidratos se encuentra prácticamente restringida a estas sustancias naturales. La Figura 3.27 muestra algunos ejemplos de cardiotónicos naturales y desoxiazúcares más comunes.



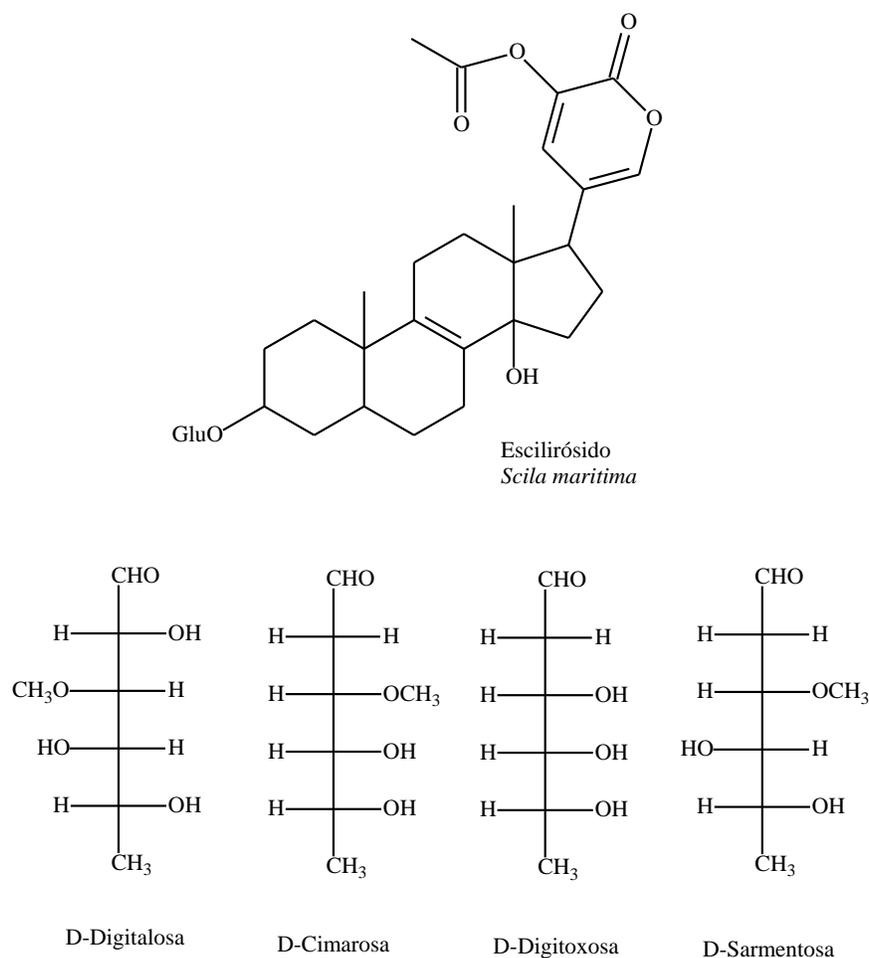


Figura 3.27. Algunos ejemplos de cardiotónicos y desoxiazúcares naturales (dig = digitoxosa).

Extracción y aislamiento

Al igual que las saponinas esteroides y otros glicósidos terpenoides, los cardiotónicos pueden aislarse en forma glicosídica o como sapogeninas. En el primer caso se utiliza el método ya descrito para las saponinas esteroides (desengrase, extracto polar, resina de intercambio iónico, Sephadex y cromatografía HPLC), mientras que en el segundo caso se realiza una hidrólisis ácida seguida de partición con un solvente orgánico (generalmente cloroformo) y cromatografía en sus diferentes formas, especialmente con sílica gel. Otros métodos incluyen la fermentación del material vegetal, para la obtención de las agliconas. Como se mencionó en el capítulo 1, los métodos de extracción con ultrasonido y con sistemas de microondas, presentan ventajas sobre los métodos clásicos de extracción, tanto en eficiencia, como rapidez, y menos efectos sobre el medio ambiente.

Para el fraccionamiento por cromatografía en columna con sílica gel pueden utilizarse mezclas de solventes como diclorometano/metanol/agua 91:22:68. Luego de este fraccionamiento e hidrólisis ácida, las geninas pueden analizarse y separarse por HPLC-fase

reversa; mientras que los carbohidratos ligados pueden analizarse por cromatografía en papel eluyendo con la mezcla Butanol/Acido Acético/Agua 4:1:5.

Con las técnicas acopladas como HPLC-Espectrometría de masas se pueden analizar extractos crudos que contienen glicósidos cardiotónicos o saponinas, mediante técnicas combinadas como LC-TMS (HPLC combinada con Espectrometría de masas con interface termospray) y LC-CF/FAB (HPLC combinada con Espectrometría de masas FAB de flujo continuo), entre otras.

Espectroscopia infrarrojo

Los cardiotónicos además de las bandas características de la funcionalidad esteroide, presentan bandas de absorción características del grupo carbonilo lactónico α,β -insaturado alrededor de $1715\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$.

Espectroscopia ultravioleta

El cromóforo γ -lactona α,β -insaturada muestra un máximo de absorción alrededor de 215-225 nm.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas de impacto electrónico (70 eV) de las agliconas de cardenólidos presentan el fragmento característico m/z 111, el cual se origina por el mecanismo ilustrado en la Figura 3.28. Además, se observa la pérdida de CO_2 (M-44).

Para los glicósidos se utiliza actualmente la espectrometría de masas con ionización electro-spray (ESI-MS).

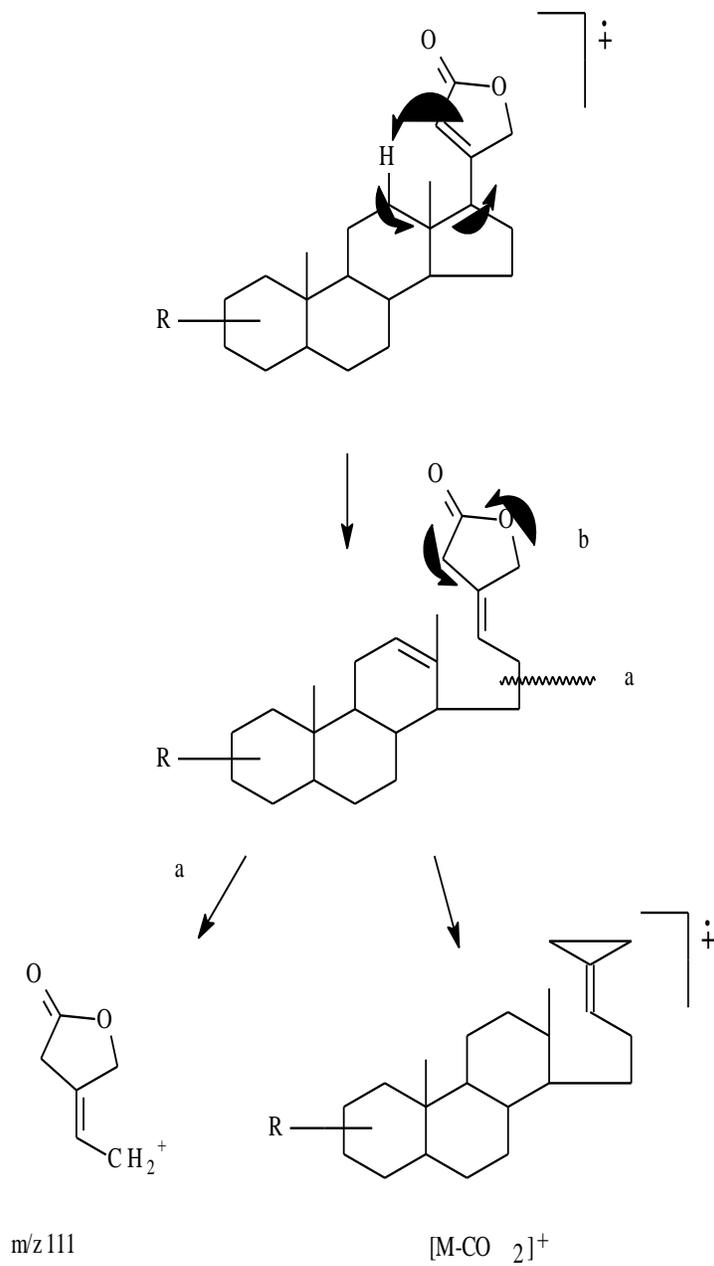


Figura 3.28. Mecanismo de formación de los fragmentos $m/z\ 111$ y $M-44$, característicos de cardenólidos.

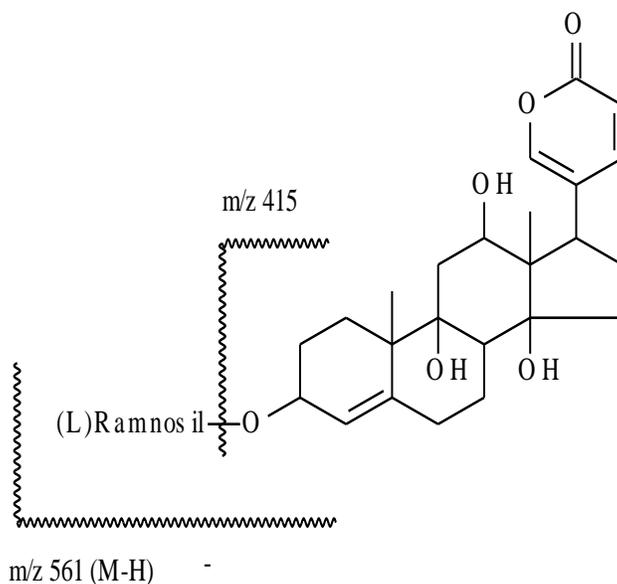


Figura 3.29. Esquema de fragmentos FAB del 9-hidroxiescilifaeósido.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

Los cardenólidos se reconocen por RMN- ^1H por las señales del protón 3α (4.4 ppm, m), del metilo 18 (0.9, s), del metilo 19 (1.1, s), el protón 17 (2.8-3.5 ppm), el protón del hidroxilo 14 (5.0-6.0 ppm, s), los protones 21a y 21b (4.8-5.8 ppm, dd, $J=18$ y 2 Hz) y el protón olefínico 22 (6.0-6.4 ppm, s ancho). En el espectro de RMN- ^{13}C se observan las señales características en δ 74 (C-3), 64 (C-14 hidroxilado), 36 (C-21), 96 (C-22), 119 (C-20) y 214 (C-23).

Los bufanólidos se reconocen por RMN- ^1H por las señales del protón 3α (4.0-5.5 ppm, quintete ancho), del metilo 18 (0.9, s), del metilo 19 (1.1, s), el protón 21 (7.3, d, $J=2-3.5$ Hz), el protón 22 (8.0, dd, $J=10$ y 2-3.5 Hz) y el protón 23 (6.3 ppm, d, $J=10$ Hz). En el espectro de RMN- ^{13}C se observan las señales características en δ 76 (C-3), 16-20 (C-18 y C-19), 119-125 (C-20), 150 (C-21 y C-22), 112-116 (C-23) y 165 (C-24).

Los desoxiazúcares presentes en los glicósidos cardiotónicos presentan espectros RMN característicos.

Utilidad farmacéutica

Los cardenólidos son conocidos inhibidores de la enzima Na/K-atpasa, por esto tienen acción inotrópica positiva, es decir, incrementan las fuerzas de contracción del músculo cardíaco. Por esta propiedad las drogas que contienen este tipo de sustancias se utilizan en algunos países, particularmente de Europa para el tratamiento de dolencias cardíacas.

Pero más recientemente se ha comprobado que tanto los cardenólidos como los bufanólidos, presentan actividad anti cáncer. Los bufadienólidos en particular, tienen además actividades biológicas que incluyen la regulación del tono cardíaco, efecto anestésico, regulación de la presión sanguínea y estimulación respiratoria. Los bufadienólidos aislados de anfibios, algunos de ellos en vía de extinción, emergen como una clase de compuestos naturales de biodiversidad química impresionante. Tienen selectividad moderada contra células tumorales humanas, especialmente las de la piel de sapo como bufalina, cinobufagina, telocinobufagina y marinobufagina. Los estudios de relación estructura-actividad antitumoral para los bufadienólidos muestran que el tamaño y la electronegatividad de los sustituyentes presentes en los carbonos 1, 3, 5, 10, 11, 12, 15 y 16 determina la mayor o menor actividad antitumoral.

Los cardenólidos como la digoxina, la cual es una droga usada clínicamente, inducen apoptosis de células de cáncer mamario, de pulmón y de próstata. También se ha reportado su potencial acción antiviral.

Algunas drogas vegetales que contienen cardiotónicos

Azuceno de la habana

Corresponde al *Nerium oleander* (Fam. Apocináceas). Esta planta es cultivada para fines ornamentales, y es común verla en diferentes sitios de la ciudad de Medellín, con flores rosadas o blancas. La variedad de flores blancas tiene reportados usos como antídoto, antibacterial, antiepiléptico, anticancerígeno, cardiotónico y como depresor del Sistema Nervioso Central (SNC). De las raíces, Huq y col., aislaron un cardenólido que además de cardiotónico es antibacterial. Las hojas contienen varios cardenólidos con acción depresora sobre el sistema nervioso central SNC.

Bulbo de escila

La droga la constituyen los bulbos de *Drimia maritima* (Fam. liliáceas). Contiene bufanólidos como el escilareno-A el cual produce irritación gástrica la que a su vez induce la secreción de los bronquiolos, por lo cual se usa como expectorante.

Estrofanto

Esta droga la constituyen las semillas desecadas de varias especies de plantas del género *Strophantus*, y es usada como veneno de flechas por los nativos de algunas tribus de Africa. Esta droga contiene el glicósido estrofantina.

Heléboro negro

Corresponde a *Helleborus niger* (Fam. Ranunculáceas).

Hojas de digital

La droga la constituyen las hojas desecadas de *Digitalis purpurea* (Fam. escrofulariácea). Esta planta es cultivada en Europa, pero en Colombia es más bien escasa y se utiliza con fines ornamentales. Se la conoce con el nombre vulgar de "campanitas" o "dedalera" y crece silvestre en localidades como a orillas de la autopista Medellín-Bogotá en el sector de Sasaima. Los principios activos son una mezcla de glicósidos cardiotónicos denominados purpureaglicósidos, en los cuales la sapogenina es la digitoxigenina. Uno de estos es el purpureaglicósido A.

La especie relacionada *Digitalis lanata*, también contiene glicósidos cardiotónicos, pero con la característica particular de que uno de los carbohidratos ligados posee un grupo hidroxilo acetilado. Esta especie contiene los denominados lanatósidos.

La especie *D. lanata*, aunque es originaria de Europa, también se encuentra en nuestro país, específicamente en la sabana de Bogotá.

Estas drogas vegetales se comercian en Europa bajo nombres comerciales como Digitalina™, Cardinatina™, Cristaloxina™, Digoxina™, etc.

Lirio de los valles

La droga la constituyen las partes aéreas de *Convallaria majalis* (Fam. liliáceas). Esta contiene varios cardiotónicos, entre ellos la convalatoxina.

Thevetia peruviana

Las semillas de esta planta contienen cardiotónicos como el peruvósido.

Especies relacionadas existentes en Colombia

La especie *Digitalis purpúrea* se introdujo antes de 1850 a Bogotá y se fué extendiendo a los climas fríos de la cordillera oriental. El "lirio de los valles" *Convallaria majalis* se cultiva como ornamental y se conoce con el nombre de "campana de mayo". El "catapé" ó "cobalonga" es ornamental en poblaciones de clima cálido y corresponde a la *Thevetia nerifolia*. El "azuceno de la habana" *Nerium oleander* se encuentra en varios pisos climáticos p. ej. en Cartagena y en Medellín, y es utilizado para fines ornamentales. El "rajalgar" corresponde a *Asclepias curasavica*, cuya savia es utilizada en preparados para aflojar los dientes. La "fruta de culebra" es una apocinácea: *Rauwolfia tetraphylla*, de la cual se obtiene también un alcaloide hipotensor.

Carotenoides



Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranil-pirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo, el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo, el licopeno). El nombre de carotenoides está relacionado con el hecho de que los primeros aislados fueron de la zanahoria *Daucus carota*. La estructura general es la de una cadena hidrocarbonada central, con dos anillos de seis carbonos en los extremos, con excepción del licopeno. La Figura 3.30 muestra algunos ejemplos de los carotenoides más distribuidos en la naturaleza.

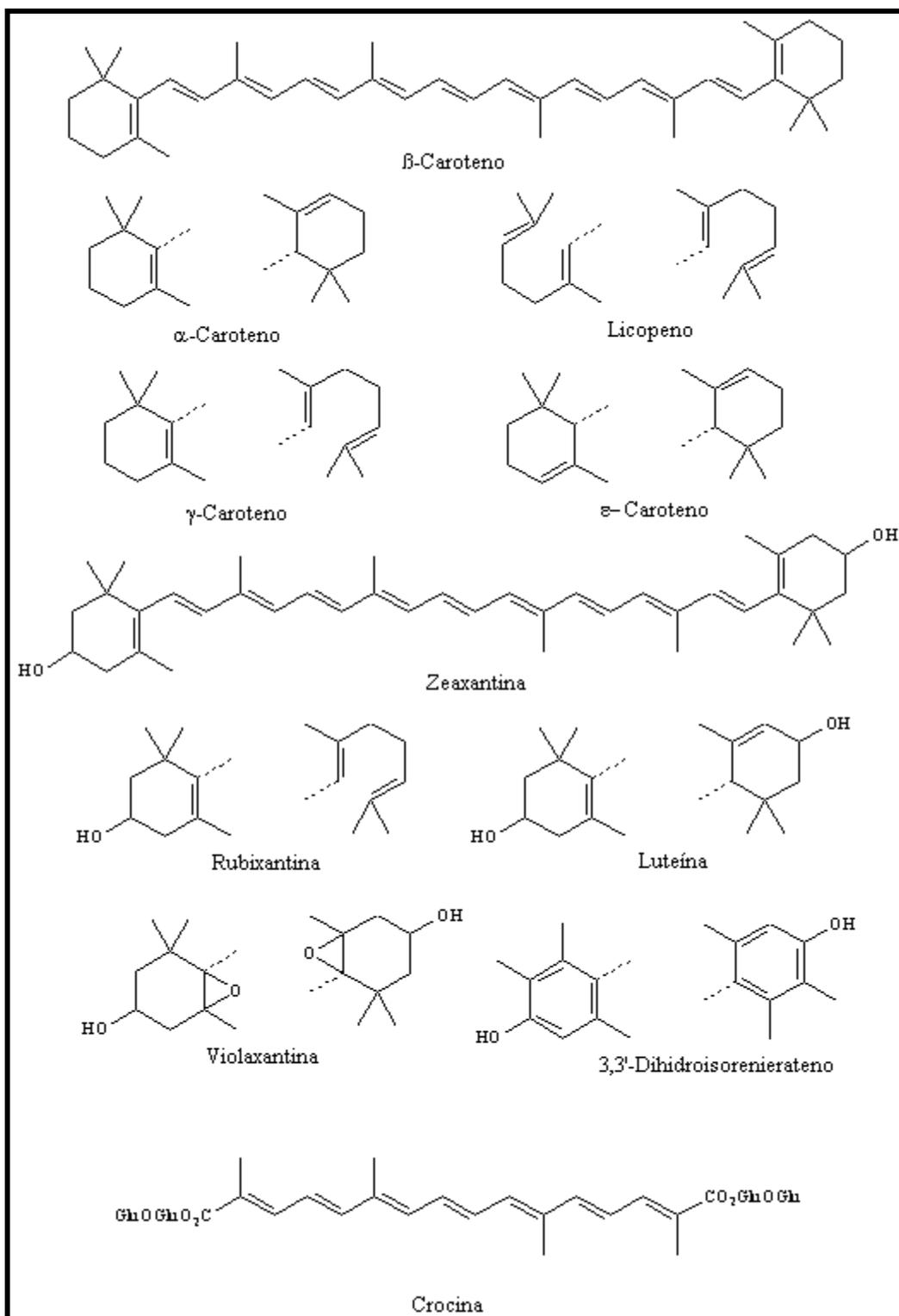


Figura 3.30. Ejemplos de carotenoides naturales ampliamente distribuidos.

Clasificación

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo, el β -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo, la luteína). Los apocarotenoides, son carotenoides que no contienen los anillos de los extremos de la cadena, por ejemplo, la crocetina.

Biogénesis

La biosíntesis de los carotenoides en las plantas y algas fotosintéticas está asociada a la ruta del metileritritol-4-fosfato (sigla inglesa: MEP). Dos moléculas de geranyl-geranyl-pirofosfato (sigla inglesa: GGPP) se condensan enzimáticamente para formar el intermedio 15-cis-fitoeno, con la participación de la enzima denominada fitoeno-sintasa. El fitoeno es convertido luego en licopeno. El licopeno a su vez genera dos subrutas biosintéticas, una con la participación de la licopeno- ϵ -ciclase y la otra con la licopeno- β -ciclase. En el primer caso da origen a δ -caroteno, α -caroteno, zeinoxantina y luteína. En el segundo caso, se originan γ -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, astaxantina, anteraxantina, capsantina, violaxantina, capsorubina y neoxantina.

Distribución y estado natural

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo, los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros.

En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

A los carotenoides se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo, los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo, tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo, la zanahoria).

Es importante mencionar que, aunque se conocen muchos carotenoides de fuentes naturales, en la medida que las técnicas analíticas evolucionan, estas permiten no solo la identificación de los que están presentes en concentraciones mayores, sino de muchos no conocidos pero que están presentes en concentraciones menores inclusive a nivel de trazas. Un ejemplo es un estudio reciente que muestra como en el azafrán *Crocus sativus*, utilizando

una combinación de técnicas como la cromatografía HPLC y la espectrometría de masas ESI tándem; se identificó la norcrocetina, un compuesto nuevo.

Nomenclatura

Como es el caso con muchas sustancias naturales, en la medida que se han ido descubriendo, se les ha dado nombres comunes, y generalmente relacionados con las fuentes naturales desde donde se obtienen. Para propósitos del estudio de los carotenoides, se cuenta con una nomenclatura semi sistemática. Esta tiene en cuenta los anillos y porciones de los extremos de la estructura molecular, y las geometrías de los enlaces dobles (*E* o *Z*). La figura 3.31, muestra los siete grupos terminales que se encuentran en los carotenoides (44). De acuerdo con esto el β -caroteno, corresponde por sus extremos al β,β -caroteno; el licopeno corresponde al ψ,ψ -caroteno (psi,psi-caroteno).

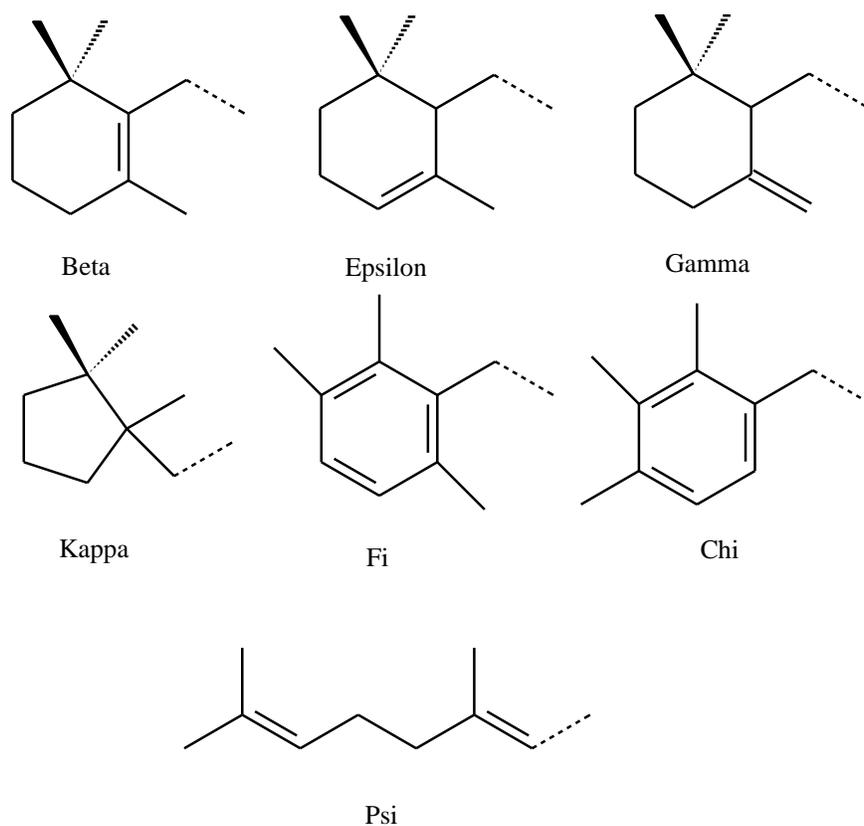


Figura 3.31. Estructuras químicas de los siete grupos terminales presentes en carotenoides naturales (43).

Extracción y aislamiento

Los carotenoides debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo, isomerismo *cis* y *trans*) es un factor a considerar al momento de realizar su extracción. El calor también favorece reacciones térmicas de degradación. El aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. Por estas razones la extracción de carotenoides se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo, con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además, se debe realizar lo más rápido posible, y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Debido a que los carotenoides en su mayoría son de baja polaridad y carácter liposoluble, y que se deben obtener de los tejidos vegetales frescos, en los cuales, el agua constituye más de un 80%, es necesario secar la muestra antes de la extracción. El mejor método de secado de muestras vegetales es la liofilización, la cual garantiza que no ocurren cambios químicos en los compuestos durante el proceso de secado. Para muestras pequeñas, y cuando no se cuenta con la liofilización, un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede entonces extraer con un solvente apolar.

Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de KOH 60% alcohólico. Esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, con atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados. Si se desea un proceso más rápido, es aconsejable la ebullición durante 5-10 minutos, acompañada de ultrasonido.

Las mezclas de carotenos y las xantofilas mono- y dihidroxiladas pueden separarse agitando una solución en éter de petróleo con un volumen de metanol al 90%. Las xantofilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las monohidroxiladas y los carotenos quedan en la fase etérea. Repitiendo este proceso con la fase etérea se separan en la fase metanólica las xantofilas monohidroxiladas, y en la fase etérea quedan los carotenos. Las xantofilas separadas en las fases metanólicas pueden recuperarse extrayéndolas con éter etílico.

Debido a que los extractos de carotenoides generalmente están impurificados por otras sustancias como los esteroides, estos se pueden eliminar dejando el extracto concentrado en solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche. De esta manera los esteroides se precipitan y pueden ser retirados por centrifugación o filtración.

Actualmente se están estudiando métodos alternativos a estos procesos de extracción, teniendo en cuenta especialmente que el proceso de extracción sea más rápido, más eficiente, y menos costoso desde los puntos de vista económico y ambiental. En el caso de los carotenoides de las microalgas marinas, se trabajan métodos que incluyen el uso de electricidad para la desintegración de las células que contienen los carotenoides, como es el caso de la extracción asistida con campos eléctricos pulsados, conocida por la sigla inglesa PEF, la cual requiere de menores volúmenes de solventes orgánicos. También la extracción asistida con microondas MAE, y la extracción asistida con ultrasonido UAE, que disminuyen los tiempos de extracción; y la extracción con fluidos supercríticos SFE con dióxido de carbono, que tiene uso no solo para propósitos analíticos sino a nivel industrial. Una alternativa al uso de solventes orgánicos es usar mezclas de estos con otras sustancias como por ejemplo los triglicéridos. Al mezclar los triglicéridos por ejemplo con el acetato de etilo, se disminuye su viscosidad y se facilita su extracción.

Una vez obtenido el extracto o los extractos de carotenoides, estos se pueden separar y analizar por cromatografía en capa fina, en papel o en columna. El método más usado es la cromatografía en capa fina con varias clases de fases estacionarias que incluyen: óxido de magnesio activado, sílica gel, hidróxido de calcio y fosfato de magnesio entre otros.

Para la separación y aislamiento cromatográfico con sílica gel algunos autores recomiendan alcalinizar la sílica con KOH al 3% para prevenir la isomerización durante el desarrollo cromatográfico. Además, como los carotenoides comienzan a descomponerse al secarse la placa por la evaporación del eluyente, recomiendan trabajar con atmósfera de un gas inerte.

Para proteger los colores contra la oxidación, las placas cromatográficas pueden rociarse con una solución de aceite de parafina al 5% en éter de petróleo.

Más recientemente y gracias al avance de los métodos cromatográficos instrumentales es posible el aislamiento rápido de carotenoides puros. En este sentido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es muy utilizada actualmente, debido a que se puede trabajar a bajas temperaturas, en ausencia de luz y aire, y es muy sensible por los grupos dienos conjugados abundantes en las estructuras de los pigmentos carotenoides. Aunque se han utilizado columnas de fase normal, son más utilizadas las de fase reversa, especialmente las de octadecilsilano (columnas C-18). La utilización de detectores como el de arreglo de diodos DAD, y espectrómetros de masas; facilita el proceso de separación e identificación de los carotenoides presentes en las mezclas de carotenoides presentes en las plantas.

En la actualidad, el procedimiento de análisis e identificación de los carotenoides en muestras biológicas se realiza en tres etapas principales. En la primera, se obtiene el extracto crudo. Posteriormente, el extracto es sometido a extracción en un cartucho con una fase sólida (de sílica gel para eliminar interferencias polares, o de octadecilsilano u octilsilano,

para eliminar impurezas apolares, ó ambos). El extracto se recupera nuevamente por elución con un solvente adecuado, y finalmente se somete a análisis y/o fraccionamiento preparativo por CLAE. La identificación puede hacerse por comparación con los tiempos de retención de carotenoides estándares, o en el caso preparativo los carotenoides aislados se someten a análisis espectrales de masas, RMN, etc.

El desarrollo reciente de interfaces CLAE-Espectrometría de masas, y detectores como los de arreglo de diodos, permiten obtener los correspondientes espectros de masas y UV-visible, los cuales facilitan el proceso de identificación. A manera de ejemplo, un estudio mediante HPLC-DAD-MS, en los cálices de *Hibiscus sabdariffa* permitió determinar el contenido de los carotenoides más abundantes como son luteína y β -caroteno. La luteína muestra máximos de absorción UV-Vis en 418, 444 y 471 nm. El β -caroteno, en 421, 451 y 476 nm. En el espectro de masas la luteína muestra ión pseudomolecular m/z 569 $[M+H]^+$, y el β -caroteno, muestra m/z 537 $[M+H]^+$.

Como muestras de referencia pueden obtenerse β -caroteno, canthaxantina y crocina (del azafrán), luteína, violaxantina y neoxantina (de las hojas de cualquier planta superior), licopeno (del tomate rojo o de salsa ó pasta de tomate comercial), y capsantina del pimentón rojo.

Es importante anotar que existen métodos reportados de análisis de carotenoides en plasma sanguíneo, a partir de muestras de solo 10 μ l.

Ensayos de reconocimiento

Los carotenoides como se anotó anteriormente son en su mayoría pigmentos liposolubles de colores amarillo, naranja y rojo. Por lo cual se les puede reconocer fácilmente en los extractos vegetales con ayuda de la CCF. Al adicionarle ácido sulfúrico concentrado a las manchas sobre la placa cromatográfica, o a una solución anhidra en un solvente como cloroformo o diclorometano; los carotenoides toman coloraciones azulosas. Debido a la presencia de varios enlaces dobles C=C conjugados, reaccionan también con el reactivo de Liebermann-Burchard, usado para el reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides, por lo tanto debe tenerse en cuenta que los carotenoides son falsos positivos para esteroides y/o triterpenoides, sin embargo la presencia de los carotenoides en una muestra vegetal se reconoce por sus colores característicos (amarillo-naranja-rojo), mientras que la mayoría de esteroides y triterpenoides conocidos hasta hoy son incoloros.

Características espectrales

Como se anotó anteriormente, aunque es relativamente fácil identificar la mayoría de carotenoides por comparación de muestras y estándares mediante la CCF y la CLAE, cuando

se tienen carotenoides que no es posible identificar por tales métodos, es necesario recurrir a los métodos espectrales como UV-visible, IR, EM y RMN.

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 350 a 550 nm. Se observa un máximo alrededor de 450 nm y generalmente se aprecian dos máximos u hombros a cada lado. La Tabla 3.6 presenta los datos de los espectros visible de algunos carotenoides, en n-hexano y en cloroformo. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a investigar la relación que existe entre la geometría E/Z de los carotenoides y una banda de absorción que se observa entre 265 y 300 nm, a la que se denomina banda uv lejana.

Tabla 3.6. Máximos de absorción del espectro visible y datos de espectrometría de masas de varios carotenoides naturales.

PIGMENTO	MÁXIMOS DE ABSORCIÓN (nm)		m/z
	n-Hexano ó éter de p.	Cloroformo	
α -Caroteno	422, 444, 473	454, 485	536 (M^+)
β -Caroteno	425h, 451, 482	466, 497	536 (M^+), 537.4 ($M+H^+$) APCIMS
γ -Caroteno	437, 462, 494	447, 475, 508	537 ($M+H^+$), 467 [$M-69$] ⁺ , 444 [$M-92$] ⁺
δ -Caroteno	428, 455, 481	-	537 [$M+H^+$], 481 [$M+H-56$] ⁺ , 444 [$M-92$] ⁺
ϵ -Caroteno	419, 444, 475	418, 442, 471 (Etanol)	-
Licopeno	446, 472, 505	456, 485, 520	536 (M^+), 537 ($M+H^+$) APCIMS
Luteína	420, 447, 477	428, 456, 487	568 (M^+), 569 [$M+H^+$], 551 ($M+H-H_2O$) ⁺ , 533, 495, 477, 463, 459
Violaxantina	443, 472	424, 452, 482	601 [$M+H^+$], 583, 565, 509, 491, 221
Zeaxantina	423, 451, 483	429, 462, 494	569.4 ($M+H^+$), 551.4 ($M-H_2O+H^+$),

PIGMENTO	MÁXIMOS DE ABSORCIÓN (nm)		m/z
	n-Hexano ó éter de p.	Cloroformo	
Neoxantina	415, 437, 466	421, 447, 477	601 ([M+H] ⁺), 583 [M-H ₂ O + H] ⁺ , 547, 509, 221
13-cis-neoxantina	-	326, 418, 443, 471	583 [M - H-18] ⁺ , 565, 509 [M+H-92] ⁺ , 491 [M+H-18-92] ⁺ , 221
Rubixantina	432, 462, 494	439, 474, 509	-
Fucoxantina	425, 450, 478	457, 492	-
Criptoxantina	425, 451, 483	433, 463, 497	552 (M ⁺)
Astaxantina	378, 400, 424	-	597 (M+H ⁺)
Bixina	432, 456, 490	433, 470, 502	-
Canthaxantina	466	482	565 (M+H ⁺)
Capsantina	450, 475, 505	-	585 (M+H ⁺)
Capsorubina	445, 479, 510	-	-
Crocina			999.3 (M+Na ⁺)
Crocetina	400, 422, 450	413, 435, 462	-

El espectro IR generalmente no es muy útil para la caracterización de la mayoría de carotenoides, sin embargo, puede servir para el reconocimiento de carotenoides raros, pues proporciona información sobre la presencia de otros grupos funcionales como grupos carbonilo y enlaces triples C-C.

Debido a la baja volatilidad de los carotenoides, sus espectros de masas de impacto electrónico son de difícil interpretación y no proporcionan el ion molecular, por lo cual prácticamente no se usan. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas de ionización suave, se obtiene información estructural muy valiosa.

Como en la gran mayoría de metabolitos secundarios, en lo correspondiente a la caracterización química, la mejor técnica para la elucidación estructural de los carotenoides es la RMN en sus diferentes modalidades mono- y bidimensionales.

Actividad biológica

Los carotenoides son pigmentos naturales presentes en plantas, algas y bacterias fotosintéticas, no son biosintetizados por el organismo humano y por tanto deben ingerirse en los alimentos o mediante suplementos. En el organismo humano desempeñan diferentes funciones que incluyen su actividad antioxidante. De manera individual carotenoides como el β -caroteno es un precursor de la vitamina A (función pro-vitamina A). La luteína, la astaxantina y la zeaxantina hacen parte del pigmento macular de los ojos. La luteína reduce la degeneración macular producida por el envejecimiento. Además, se tienen algunas evidencias de que los carotenoides mejoran la función cognitiva y la salud cardiovascular, y también pueden ayudar a prevenir algunos tipos de cáncer como el licopeno.

Los carotenoides en general son reconocidos por ser precursores de la vitamina-A (o retinol), y los denominan provitaminas. No todos presentan la misma capacidad provitamina-A, mientras el todo trans- β , β -caroteno, tiene una actividad relativa del 100%, pues su clivaje por la parte central genera 2 moléculas de vitamina A, otros carotenoides como el 9-cis- α -caroteno, solo tiene una actividad relativa del 16%.

Además de su papel como provitamina A, los carotenoides están siendo investigados en cuanto a otras actividades biológicas que incluyen su actividad antioxidante, la cual se ha encontrado que puede ser útil en prevenir el riesgo de enfermedades degenerativas como Alzheimer y Parkinson, o enfermedades como el cáncer. En particular, β -caroteno, astaxantina, cantaxantina y zeaxantina promueven la reducción en tamaño y cantidad de neoplasias del hígado en experimentos *in vivo*. La astaxantina, muestra un potencial interesante como protector del miocardio. La sifonoxantina, aislada de un alga, presenta una interesante actividad antileucémica *in vitro*.

El β -caroteno suplementado en la dieta ha mostrado alguna evidencia de acción antitumoral en ratas. Las bastadinas aisladas de esponjas marinas presentan acción antitumoral, contra el cáncer de la piel y en leucoplasias orales. El Vesanoïd®, es un derivado de la vitamina A que presenta acción citotóxica, y es usado para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda.

Alcaloides esteroidales

Diversas plantas de familias como las solanáceas, especialmente las del género *Solanum*, son conocidas como fuentes de sustancias estructuralmente muy relacionadas con las saponinas esteroides y son los alcaloides esteroidales, por ejemplo, la tomatidina, presente en las hojas del tomate *Lycopersicon esculentum* (Figura 3.32).

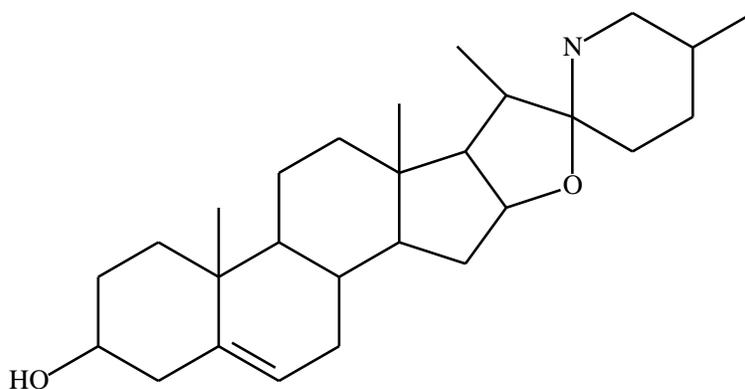
Estas sustancias poseen características tanto de esteroides como de alcaloides, este es el caso de la solasodina presente en frutos de la especie colombiana *Solanum marginatum* (figura 3.32).

Para su análisis cromatográfico existen métodos reportados por HPLC, como por ejemplo para los alcaloides de la papa *Solanum tuberosum*.

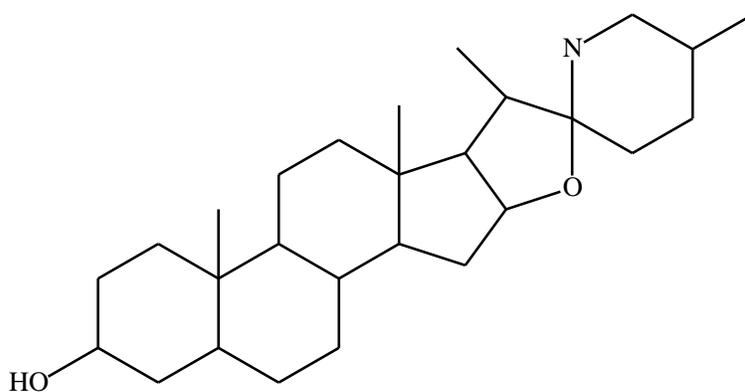
En cuanto a sus características espectrales, las agliconas con el núcleo espirosolano se reconocen en sus espectros de masas de impacto electrónico por los fragmentos m/z 114 y 138, los cuales se originan por el mismo mecanismo de los iones m/z 115 y 139 de las sapogeninas esteroides, solo que en lugar del átomo de oxígeno del anillo pirano, los alcaloides tipo espirosolano, contienen un átomo de nitrógeno (ver figura 3.17).

Los alcaloides con núcleo 3-aminoespirosolano también se reconocen en sus espectros de masas por los fragmentos m/z 56, 114 y 138.

En el espectro de RMN- ^1H (determinado generalmente en metanol perdeuterado) el H-3 resuena alrededor de 3.5 ppm como un multiplete, si existe un sustituyente 3-O-glicosilo, o resuena alrededor de 2.6 ppm si existe un grupo 3-amino. El protón H-16 se observa como un multiplete alrededor de 4.3 ppm; y los protones H-26 resuenan en señales separadas alrededor de 2.6 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C el C-3 resuena alrededor de 80 ppm si es un compuesto 3-Oglicosilado, o alrededor de 52 ppm si es un compuesto 3-aminado. El C-16 resuena alrededor de 79 ppm, el C-22 alrededor de 100 ppm, y el C-26 alrededor de 56 ppm.



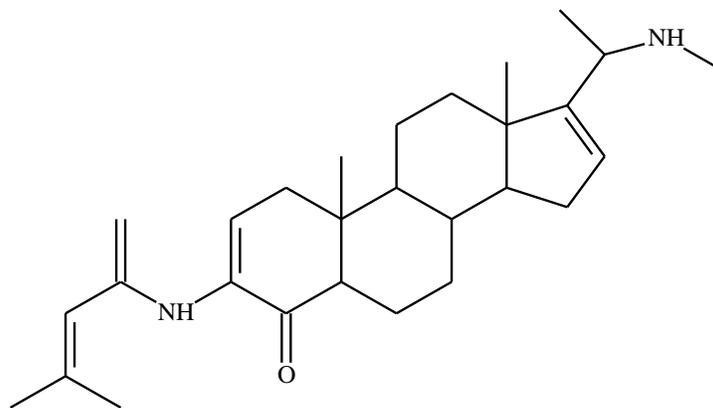
Solasodina (tipo solasodano)



Tomatidina

Figura 3.32. Estructuras químicas de alcaloides esteroidales naturales.

En Colombia existen varias especies de *Solanum* potencialmente útiles para la obtención de precursores esteroides para la síntesis de medicamentos. Por ejemplo, "cujaca" *Solanum sp.* es muy usado en el departamento de Nariño para el lavado de ropas (machacando las frutas). El "friega-platos", *Solanum mammosum*, es una planta venenosa también conocida como "mata-cucarachas", y el "lulo'e perro" *Solanum marginatum*, un arbusto que abunda en los basurales y lotes baldíos de la Sabana de Bogotá.



Sarcorucinina-F (tipo alcaloide pregnano)

Figura 3.33. Estructura química de la sarcorucinina-F, aislada de *Sarcococca ruscifolia*, activa contra células de varias líneas de células cancerosas.

Los alcaloides esteroidales presentan diversas actividades biológicas que incluyen su acción antimicrobiana, antifúngica y antimalárica. También se les ha encontrado potencial contra el cáncer. pero también se reporta su neurotoxicidad.

Referencias bibliográficas

1. Tantawy MA, Nafie MS, Elmegeed GA, Ali IA. Auspicious role of the steroidal heterocyclic derivatives as a platform for anti-cancer drugs. *Bioorg. Chem.* 2017; 73: 128–146.
2. Ferrer A, Altabella T, Arró M, Boronat A. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog. Lipid Res.* 2017; 67: 27–37.
3. Keri A, Tallmana KA, Kima H-Y, Korade Z, Genaro-Mattos TC, Wages PA, Wei Liu W, Porter NA. Probes for protein adduction in cholesterol biosynthesis disorders: Alkynyl lanosterol as a viable sterol precursor. *Redox Biol.* 2017; 12: 182–190.
4. Rabelo VWH, Correia Romeiro N, Alvarez Abreu P. Design strategies of oxidosqualene cyclase inhibitors: Targeting the sterol biosynthetic pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017; 171: 305-317.
5. Esche R, Scholz B, Engel KH. Online LC–GC Analysis of Free Sterols/Stanol and Intact Steryl/ Stanyl Esters in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61: 10932–10939.
6. András N, Helenkár A, Vasanits-Zsigrai A, Záray G, Molnár-Perl I. The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry *J. Chromatog. A* 2011; 1218: 8264–8272.
7. Kisner HJ, Brown CW, Kavarnos GJ. Simultaneous Determination of Triglycerides, Phospholipids and Cholesteryl Esters by Infrared Spectrometry. *Anal. Chem.* 1982; 54: 1479.

8. Martinez A., Estudio Químico y de Actividad Biológica de Esponjas Marinas del Género *Ircinia*, Tesis de Doctor en Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1996.
9. Andrási N, Helenkár A, Záray Gy, Vasanits A, Molnár-Perl I. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples. *J. Chromatog. A* 2011; 1218: 1878–1890.
10. Robinson, T.; "The Organic Constituents of Higher Plants", Cordus Press, North Amherst MASS, 1983.
11. De Jesus Raposo MF, Costa de Morais RMS, Miranda AM, de Morais B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 2013; 93: 479–486.
12. Fernando IPS, Sanjeewa KKA, Kima HS, Kima SY, Lee SH, Lee WW, Jeon YJ. Identification of sterols from the soft coral *Dendronephthya gigantea* and their anti-inflammatory potential. *Envir. Toxicol. Pharmacol.* 2017; 55: 37–43.
13. Nguyen TT, Nguyen DH, Zhao BT, Le DD, Min BS, Kim YH, Woo MH. Triterpenoids and sterols from the grains of *Echinochloa utilis* Ohwi & Yabuno and their cytotoxic activity. *Biomed. Pharmacoth.* 2017; 93: 202–207.
14. Choi NH, Jang JY, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Nguyen VT, Min BS, Dang QL, Kim JC. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. *Pest. Biochem. Physiol.* 2017; 141: 103–108.
15. Su YD, Cheng CH, Wen ZH, Wu YC, Sung PJ. New anti-inflammatory sterols from a gorgonian *Pinnigorgia sp.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26: 3060–3063.
16. Sarma NS, Krishna MS, Pasha SG, Prakasa TS, Venkateswarlu RY, Parameswaran PS. Marine Metabolites: The Sterols of Soft Corals. *Chem. Rev.* 2009; 109: 2803–2828.
17. Cheng ZB, Xiao H, Fan CQ, Lu YN, Zhang G, Yin S. Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassilobs*. *Steroids* 2013, 78: 1353–1358.
18. Czajkowska-Szczykowska D, Morzycki JW, Wojtkielewicz.A. Pd-catalyzed steroid reactions. *Steroids* 2015; 97: 13–44.
19. Brownholland DP, Covey DF. Synthesis of side-chain oxysterols and their enantiomers through crossmetathesis reactions of D22 steroids. *Steroids* 2017; 121: 22–31.
20. Singh B, Singh JP, Singh N, Kaur A. Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. *Food Chem.* 2017; 233: 540–549.
21. Mangas S, Bonfill M, Osuna L, Moyano E, Tortoriello J, Cusido *et al.* The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. *Phytochemistry* 2006; 67: 2041–2049.

22. Sastre F, Ferreirab F, Pedreschi F. A systematic approach for the chromatographic fractionation and purification of major steroid saponins in commercial extracts of *Yucca schidigera* Roezl . J. Chromatog. B 2017; 1046: 235–242.
23. Xia YG, Guo XD, Liang J, Yang BY, Kuang HX. Screening and identification of steroidal saponins from *Anemarrhena asphodeloides* employing UPLC tandem triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. Steroids 2017; 125: 67–80.
24. Zaki AA, ZulfikarA, Wang YH, Yasser EA, Shabana K, Khan IA. Cytotoxic steroidal saponins from *Panicum turgidum* Forssk. Steroids 2017; 125: 14–19.
25. Nguyen TM, Nguyen TC, Hoang LTA, Nguyen XN, Bui HT, Chau VM, *et al.* Steroidal saponins from *Datura metel*. Steroids 2017; 121: 1-9.
26. Sadeghi M, Zolfaghari B, Senatore M, Lanzotti V. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity. Food Chem. 2013; 141: 1512–1521.
27. Wang W, Meng H. Cytotoxic, anti-inflammatory and hemostatic spirostane-steroidal saponins from the ethanol extract of the roots of *Bletilla striata*. Fitoterapia 2015; 101: 12–18.
28. Liu ZH, Yan H, Si YA, Ni W, Chen Y, He L, Liu HY. Bioactive spirostane glycosides from *Tacca plantaginea*. Steroids 2016; 106: 86–92.
29. Ramos-Enríquez MA, Vargas-Romero K, Rárová L, Strnad M, Iglesias-Arteaga MA. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of 23(23') E-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins. Steroids 2017; 128: 85-88.
30. Wen S, Chen Y, Lu Y, Wang Y, Ding L, Jiang M. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. Fitoterapia 2016; 112: 74–84.
31. Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrason. Sonochem. 2017; 34: 540–560.
32. Osorio AA, López MR, Jiménez IA, Moujir LM, Rodríguez ML, Bazzocchi IL. *Elaeodendron orientale* as a source of cytotoxic cardenolides. Phytochemistry 2014; 105: 60–67.
33. Dalla S, Baum M, Dobler S. Substitutions in the cardenolide binding site and interaction of subunits affect kinetics besides cardenolide sensitivity of insect Na,K-ATPase. Insect Biochem. Mol. Biol. 2017; 89: 43-50.
34. Huang H, Yang Y, Lv C, Chang W, Peng C, Wang S, Ge G, Han L, Zhang W, Liu R. Pharmacokinetics and tissue distribution of five bufadienolides from the Shexiang Baoxin pill following oral administration to mice. J. Ethnopharm. 2015; 161: 175–185.
35. Queiroz de Sousa L, da Conceição Machado K, de Carvalho Oliveira SF, da Silva Araújo L, dos Santos Monção-Filho E, de Carvalho Melo-Cavalcante AA. *et al.* Bufadienolides

- from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na/K-ATPase inhibition. *Toxicon* 2017; 127: 63-76.
36. Rodríguez C, Rollins-Smith L, Ibáñez R, Durant-Archibold AA, Gutiérrez M. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *J. Ethnopharm.* 2017; 198: 235–254.
 37. Rascón-Valenzuela LA, Velázquez C, Garibay-Escobar A, Vilegas W, Medina-Juárez LA, Gámez-Meza N, Robles-Zepeda RE. Apoptotic activities of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J. Ethnopharm.* 2016; 193: 303–311.
 38. Yang CW, Chang HY, Hsu HY, LeeYZ, Chang HS, Chen IS, Lee SJ. Identification of anti-viral activity of the cardenolides, Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors, against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 332: 129–137.
 39. Huq MM, Jabbar A, Rashid MA, Hasan CM. A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of *Nerium oleander*. *Fitoterapia* 1999; 70: 5-9.
 40. Begum S, Siddiqui BS, Sultana R, Zia A, Suria A. Bioactive cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry* 1999; 50: 435-438.
 41. Patiño D. Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales. 1a. edición. Ediciones Tercer Mundo, Bogotá, 1984, pp. 141-151.
 42. Takashi M. Carotenoids in Marine Animals. *Mar. Drugs* 2011; 9: 278-293.
 43. Mínguez-Mosquera MI, Homero-Méndez D, Pérez-Gálvez A. Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods. In: *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, 2nd. Edition, W. Jeffrey Hurst ed., CRC Press, Chapter 6, Boca Ratón-London-New York, 2008.
 44. Poojary MM, Barba FJ, Aliakbarian B, Donsì F, Pataro G, Dias DA, Juliano P. Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Mar. Drugs* 2016; 14: 214.
 45. Zhong L, Gustavsson KE, Oredsson S, Głęb B, Yilmaz JL, Olsson ME. Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI+-MS. *Food Chem.* 2016; 210: 541-550.
 46. Lu Q, Huang X, Lv S, Pan S. Carotenoid profiling of red navel orange “Cara Cara” harvested from five regions in China. *Food Chem.* 2017; 232: 788-798.
 47. Takaichi S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* 2011; 9: 1101-1118.
 48. Lin J, Huang L, Yu J, Xiang S, Wang J, Zhang J, Yan X, Cui W, He S, Wang Q. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Reverses Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice and Inhibits Acetylcholinesterase in Vitro. *Mar. Drugs* 2016; 14: 67.
 49. Vlíchec C, Forján E, Cuaresma M, Bédmar F, Garbayo I, Vega JM. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. *Mar. Drugs* 2011; 9: 319-333.

50. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin: A Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Mar. Drugs* 2011; 9: 447-465.
51. Sugawara T, Ganesan P, Li Z, Manabe Y, Hirata T. Siphonaxanthin, a Green Algal Carotenoid, as a Novel Functional Compound. *Mar. Drugs* 2014; 12: 3660-3668.
52. Jastrzebska I, Morzycki JW. Some observations on solasodine reactivity. *Steroids* 2017; 127: 13-17.
53. Zhou LN, Ge XL, Dong TT, Gao HY, Sun BH. Antibacterial steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica*. *Chin. J. Nat. Med.* 2017; 15(7): 540-545.
54. Siddiqui NA, Parvez MK, Al-Rehaily AJ, Al Dosari MS, Alam P, Shakeel F, Hattan A, Harb A. High-performance thin layer chromatography based assay and stress study of a rare steroidal alkaloid solanopubamine in six species of *Solanum* grown in Saudi Arabia. *Saudi Pharm. J.* 2017; 25: 184-195.
55. Zhang P, Shao L, Shi Z, Zhang Y, Du J, Cheng K, Yu P. Pregnane alkaloids from *Sarcococca ruscifolia* and their cytotoxic activity. *Phytochem. Lett.* 2015; 14: 31-34.
56. Hameed A, Jiaz S, Mohammad IS, Muhammad KS, Akhtar N, Khan HMS. Aglycone solanidine and solasodine derivatives: A natural approach towards cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 94: 446-457.
57. Da Silva DC1, Andrade PB, Valentão P, Pereira DM. Neurotoxicity of the steroidal alkaloids tomatine and tomatidine is RIP1 kinase- and caspase-independent and involves the eIF2a branch of the endoplasmic reticulum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017; 171: 178-186.
58. Liu H, Kong X, Chen J, Zhang H. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Stichopus horrens* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids. *Aquaculture* 2018; 491 358-367
59. De Jesus SS, Ferreira GF, Fregolente LV, Filho RM. Laboratory extraction of microalgal lipids using sugarcane bagasse derived green solvents. *Algal Res.* 2018; 35: 292-300.
60. Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC. Analytical methods for cholesterol quantification. *J. Food Drug Anal.* 2019; 27: 375-386.
61. Liao PC, Lai MH, Hsu KP, Kuo YH, Chen J, Tsai MC, Li CX, Yin XJ, Jeyashoke N, Chao KP. Identification of β -Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66 (41): 10748-10759.
62. Liu JS, Deng LJ, Tian HY, Ruan ZX, Cao HH, Yed WC, Zhang DM, Yu ZL. Anti-tumor effects and 3D-quantitative structure-activity relationship analysis of bufadienolides from toad venom. *Fitoterapia* 2019; 134: 362-371.
63. Khalid M, Rahman S, Bilal M, Hafiz MN, Huang D. Biosynthesis and biomedical perspectives of carotenoids with special reference to human health-related applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019; 17: 399-407.

64. Cheng D, Zhang Y, Liu H, Zhang H, Tan K, Ma H, Li S, Zheng H. An improving method for extracting total carotenoids in an aquatic animal *Chlamys nobilis*. Food Chem. 2019; 280: 45–50.
65. Piovesana A, Rodrigues E, Noreña CPZ. Composition analysis of carotenoids, phenolic compounds, and antioxidant activity from hibiscus calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. Phytochem. Anal. 2019; 30: 208-217.
66. Abate-Pella D, Freund DM, Slovin JP, Hegeman AD, Cohen JD. An improved method for fast and selective separation of carotenoids by LC–MS. J. Chromatog. B 2017; 1067: 34-37.
67. Bukowski MR, Voeller K, Jahns L. Simple and sensitive dilute-and-shoot analysis of carotenoids in human plasma. J. Chromatog. B 2018; 1095: 32–38.
68. Vila AE, Hornero-Méndez D, Azziz G, Lareo C, Saravia V. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. Biotechnol. Rep. 2018; 20: e00306.
69. Noronha Matos KA, Praia Lima D, Pereira Barbosa AP, Zerlotti Mercadante A, Chisté RC. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. Food Chem. 2019; 272: 216–221.
70. Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. Arch. Biochem. Biophys. 2018; 652: 18–26.
71. Nascimento et al., Microalgae carotenoids intake: influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and antioxidant enzymes. Food Res. Int., 108 (2020) 108770.

Capítulo 4

Alcaloides



En los organismos vivos se encuentran además de los metabolitos primarios nitrogenados, como las proteínas y los aminoácidos, muchas sustancias secundarias nitrogenadas, entre las cuales son de interés farmacéutico los alcaloides, por sus notables actividades biológicas, particularmente sobre el sistema nervioso.

Se conocen más de 25.000 alcaloides naturales, que comprenden desde estructuras simples como la coniina, un alcaloide de la cicuta, hasta estructuras complejas como la neurotoxina batracio toxina de la piel de una rana colombiana (Figura 4.1).

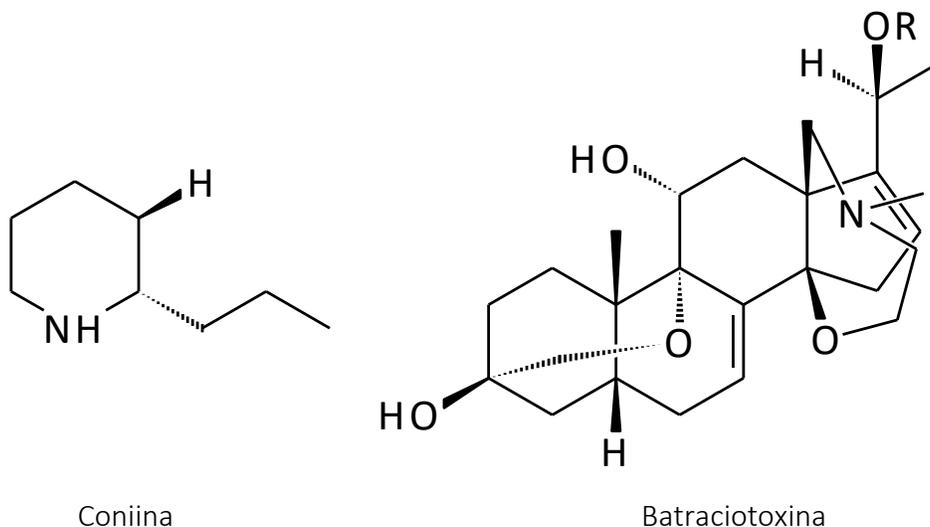


Figura 4.1. Estructuras químicas de dos alcaloides naturales: coniina y batraciotoxina.

El interés por estos compuestos es debido a que desde tiempos antiguos han sido utilizados para la caza, la guerra, como euforizantes, psicodélicos, estimulantes, o como remedios contra diferentes enfermedades, además por sus propiedades farmacológicas y tóxicas comprobadas son muy importantes para el conocimiento del químico farmacéutico.

A continuación, se profundizará sobre aspectos relacionados con la biogénesis, los métodos de análisis y la identificación o caracterización, como una aproximación al conocimiento químico de este amplio grupo de sustancias naturales.

Definición

Los alcaloides naturales son sustancias de origen biológico que además de carbono, hidrógeno, y oxígeno; contienen nitrógeno. Como definición, puede afirmarse que:

Los alcaloides son sustancias:

- De carácter alcalino (como su nombre lo indica)
- Con por lo menos un átomo de N en un heterociclo

- Que presentan actividad biológica
- Que se encuentran especialmente en las plantas superiores

Un ejemplo de estas sustancias es la cocaína (figura 4.2). Existen sin embargo sustancias nitrogenadas naturales que no cumplen alguna de estas cuatro características, como por ejemplo la piperina, presente en las semillas de la pimienta negra, que tiene carácter neutro, y la mecalina que contiene nitrógeno, pero en una cadena (no en un anillo); sin embargo, ambas sustancias tienen actividad biológica.

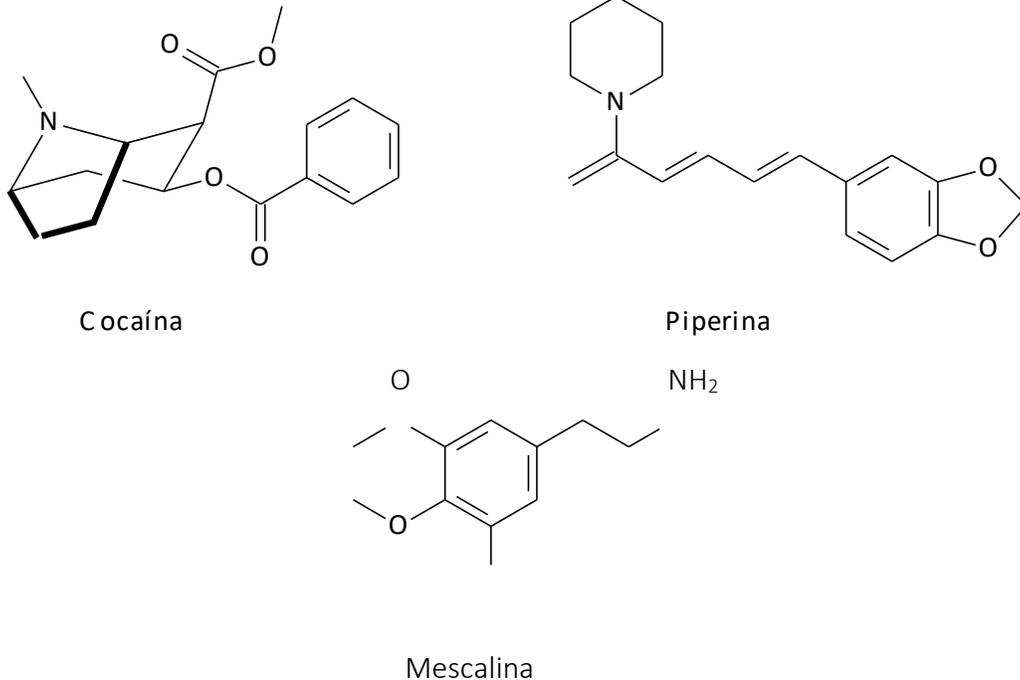
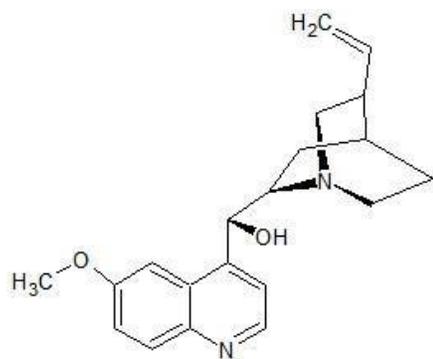
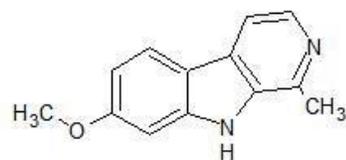


Figura 4.2. Estructuras químicas de alcaloides: cocaína, piperina y mecalina.

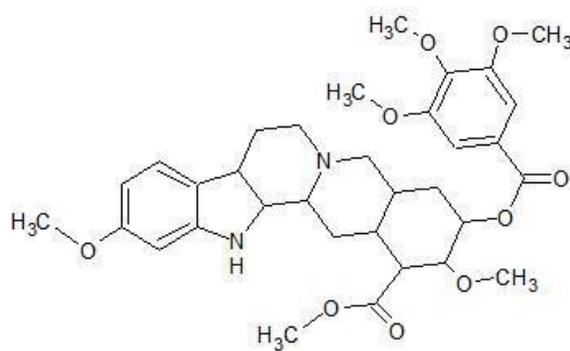
La Figura 4.3. muestra las estructuras químicas de algunos alcaloides naturales presentes en drogas vegetales.



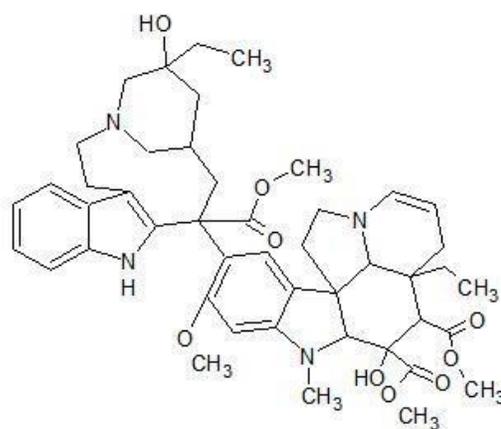
Quinina



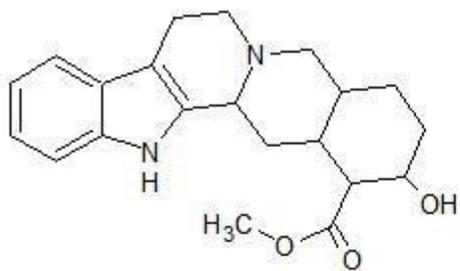
Harmina



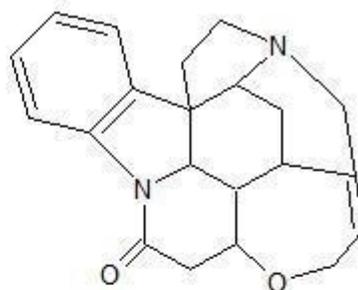
Reserpina



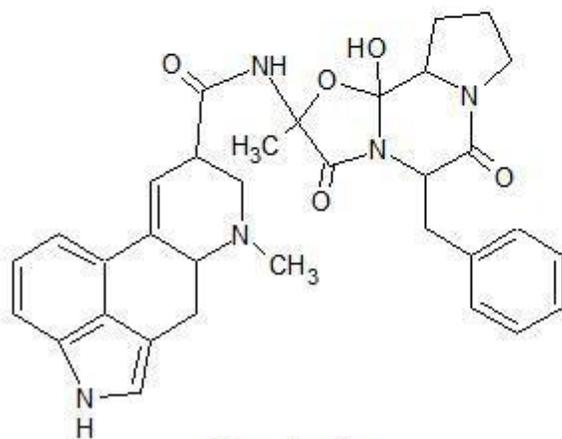
Vincalocoblastina



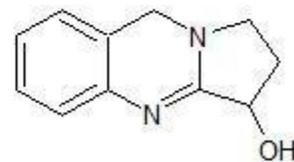
Yohimbina



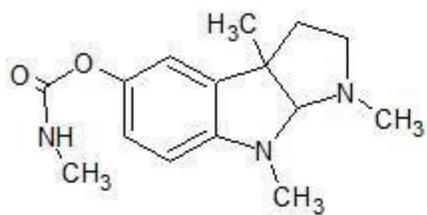
Estricnina



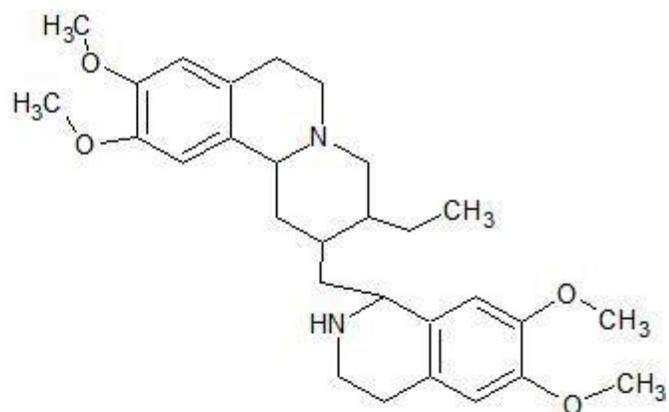
Ergotamina



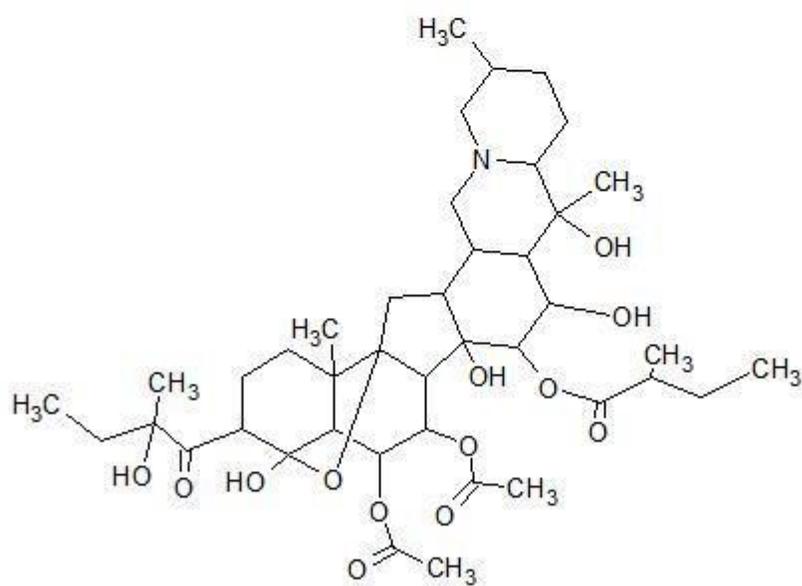
Vasicina



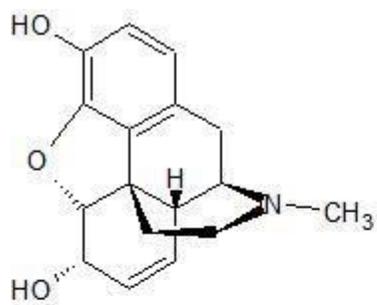
Fisostigmina



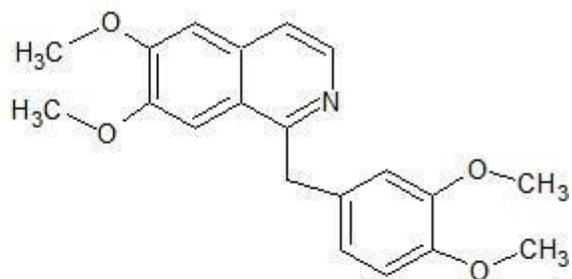
Emetina



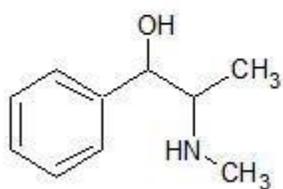
Protoveratrina-A



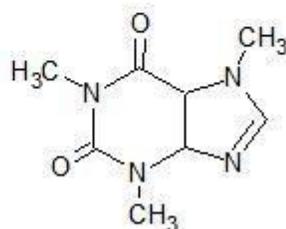
Morfina



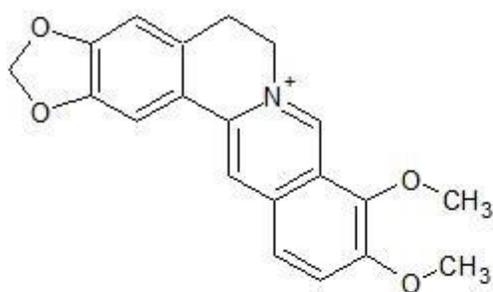
Papaverina



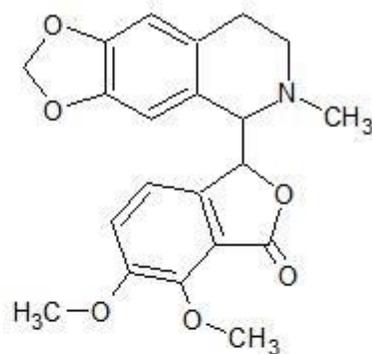
Efedrina



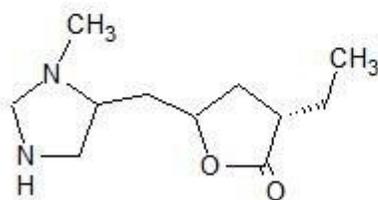
Cafeína



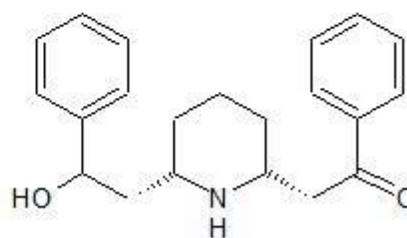
Berberina



Hidrastina



Pilocarpina



Lobelina

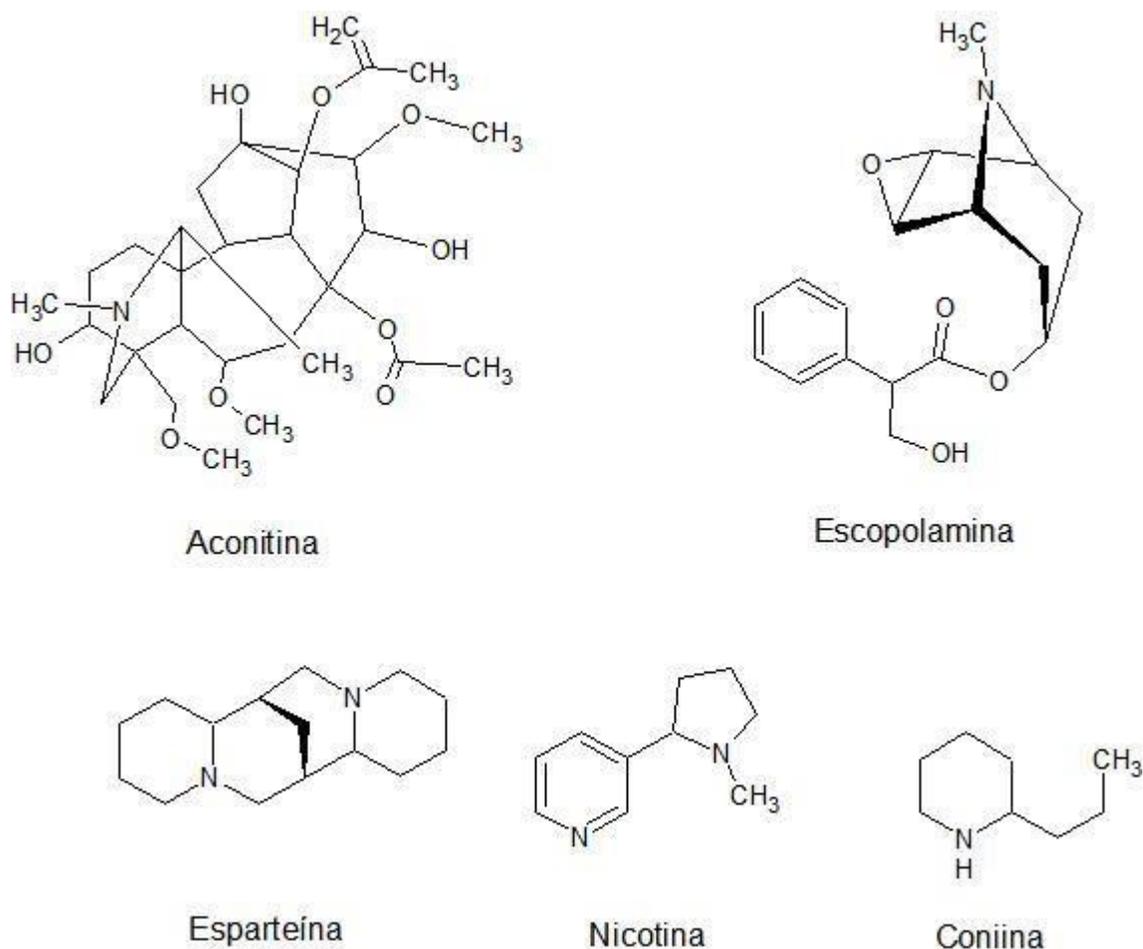


Figura 4.3. Estructuras químicas de varios alcaloides naturales.

Función biológica

Existen evidencias experimentales obtenidas a través de diferentes estudios, que sugieren que los alcaloides son producidos por muchas plantas, para defenderse de diferentes plagas y depredadores, es decir como mecanismo de defensa vegetal. Esto explica los hallazgos de que muchas de estas sustancias naturales presentan actividades antibacteriana, antimicótica, paralizante, etc.

Otras hipótesis sugieren que algunos alcaloides naturales son productos de desecho del metabolismo vegetal, o que son reservas químicas de nitrógeno para los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas que los producen.

Clasificación

Debido a la gran cantidad de alcaloides que se han aislado e identificado de fuentes naturales, se hizo necesario clasificarlos para su estudio. Existen fundamentalmente dos sistemas de clasificación basados en la fuente biológica o en aspectos estructurales químicos.

La clasificación biológica, los clasifica por el género y familia especialmente, y así entonces se habla de los alcaloides de las amarilidáceas, los alcaloides del peyote, los alcaloides del opio, los alcaloides del tabaco, etc.

La clasificación química toma en cuenta la presencia de ciertos núcleos químicos, por ejemplo:

- Alcaloides pirrolizidínicos (p. ej. europina)
- Alcaloides pirrolidínicos (p. ej. higrina)
- Alcaloides piridínicos (p. ej. nicotina)
- Alcaloides piperidínicos (p. ej. conhidrina)
- Alcaloides tropánicos (p. ej. cocaína)
- Alcaloides indólicos (p. ej. gramína)
- Alcaloides β -carbolínicos (p. ej. harmina), etc.

Otra clasificación muy útil desde el punto de vista bioquímico clasifica los alcaloides de acuerdo a su aminoácido precursor biosintético:

1. Alcaloides alifáticos

- derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos)
- derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos)

2. Alcaloides aromáticos

- derivados del ácido nicotínico (piridinas)
- derivados de la fenilalanina y la tirosina (isoquinoleinas)
- derivados del triptófano (indólicos, quinoleinas)
- derivados del ácido antranílico (quinoleinas)
- derivados de la histidina (imidazoles)

3. Alcaloides de origen diverso

- alcaloides terpénicos y esteroidales

- alcaloides diversos (purinas, macrociclos, etc.)

Otra clasificación, que es útil para fines experimentales, clasifica los alcaloides dentro de cuatro grupos: alcaloides amínicos, alcaloides fenólicos, alcaloides de amonio cuaternario y alcaloides N-óxido.

Los **alcaloides amínicos**, son aquellos que contienen nitrógeno en grupos funcionales amina primaria, secundaria o terciaria, por lo que son de carácter alcalino, son solubles en solventes orgánicos de mediana polaridad, son insolubles en agua, y forman sales con ácidos minerales.

Un ejemplo es la anabasina (Figura 2).

Los **alcaloides fenólicos**, como su nombre lo indica, son aquellos que contienen en su estructura uno o varios hidroxilos fenólicos. Estos alcaloides son generalmente solubles en soluciones acuosas de bases minerales fuertes, pero insolubles en soluciones acuosas de bases débiles. Además, son solubles en solventes orgánicos de mediana polaridad, insolubles en agua, y forman sales con ácidos minerales diluidos en agua. Son ejemplos la tiramina, la dopamina, laurifolina, etc.

Los **alcaloides de amonio cuaternario** contienen un átomo de nitrógeno tetra sustituido (funcionalidad de amonio cuaternario), siendo por lo tanto sustancias iónicas. Por lo anterior, estos son en soluciones acuosas ácidas, básicas y neutras, ya que permanecen ionizadas en todo el rango de pH. Son insolubles en la mayoría de solventes orgánicos. Un ejemplo es el hidróxido de berberina.

Algunos autores clasifican los alcaloides naturales de acuerdo con su precursor biosintético, por ejemplo: alcaloides derivados de fenilalanina, alcaloides derivados de tirosina, alcaloides derivados de triptófano, alcaloides derivados de ácido glutámico, alcaloides derivados de ácidos nucleicos, alcaloides derivados de terpenoides, alcaloides derivados de policétidos, etc.

Finalmente, es importante mencionar que varios autores, dividen los alcaloides en cuatro grandes grupos:

- Alcaloides verdaderos
- Protoalcaloides
- Pseudoalcaloides
- Alcaloides imperfectos

Los **alcaloides verdaderos** cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide: son formados a partir de aminoácidos, tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal.

Los **protoalcaloides** son aminas simples con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos.

Los **pseudoalcaloides** presentan algunas de las características de la definición de alcaloide, pero no son derivados de aminoácidos.

Los **alcaloides imperfectos** son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

No se consideran alcaloides los aminoácidos, las betalainas, los péptidos, los amino azúcares, las vitaminas nitrogenadas, las porfirinas, algunas bases como la tiamina ampliamente distribuida en los seres vivos y las alquilaminas de bajo peso molecular.

Distribución y estado natural

Los alcaloides naturales se encuentran principalmente en plantas angiospermas, en forma de sales de ácidos orgánicos como láctico, tartárico, málico, cítrico, etc.; y también enlazados a carbohidratos (glicósidos).

Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta. Las familias de plantas más destacadas incluyen las euforbiáceas, las rubiáceas, las compuestas, las solanáceas, las boragináceas, las apocináceas, las ramnáceas, las cactáceas, rutáceas, leguminosas, lauráceas, anonáceas, menispermáceas, berberidáceas, ranunculáceas, etc.

Ensayos de reconocimiento

Los alcaloides se pueden reconocer rápidamente en el laboratorio, mediante ensayos de precipitación y cromatografía en capa fina.

Los ensayos de precipitación se basan en la capacidad de los átomos de nitrógeno de muchos alcaloides, para unirse a metales pesados, formando sólidos insolubles en agua acidificada. Por esto se les denomina ensayos de precipitación. La figura 4.4. muestra la probable reacción que ocurre entre los alcaloides y los metales pesados, por formación de complejos insolubles.

Los ensayos de precipitación han sido muy utilizados en la búsqueda y el hallazgo de muchos de los alcaloides naturales conocidos. Existen muchos reactivos, dentro de los cuales se destacan los reactivos de Dragendorff, de Mayer, de Valser, el reineckato de amonio, etc. Es muy importante tener en cuenta que, por contener metales pesados, este tipo de ensayos deben usarse de manera racional y adecuadamente, por los efectos tóxicos para la salud y el medio ambiente de estos metales pesados; por esto lo recomendable es

utilizar solo uno de ellos como el reactivo de Wagner (solución de yodo y yoduro de potasio), de acuerdo a las necesidades de análisis.

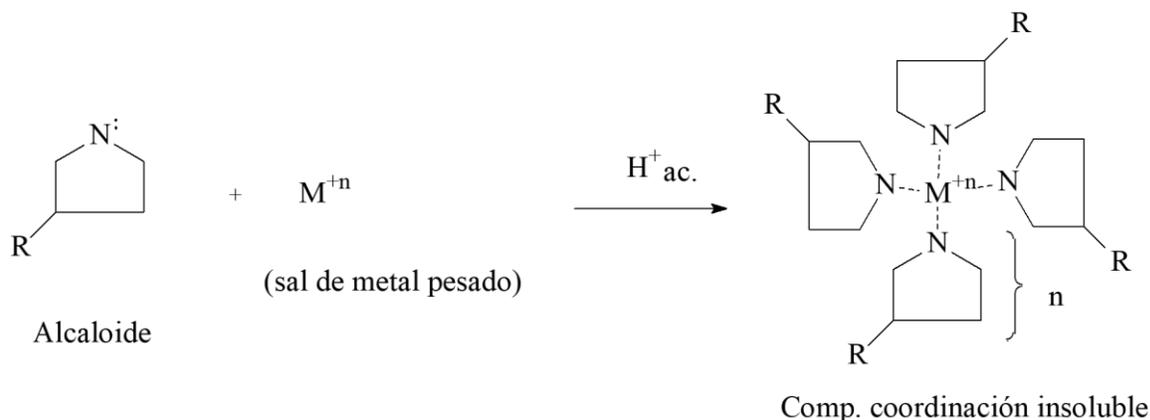


Figura 4.4. Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.

Extracción

Por la propiedad alcalina que presentan la mayoría de alcaloides, debido al nitrógeno amínico; los alcaloides pueden formar fácilmente sales con ácidos minerales como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, etc. Estas sales son solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos de mediana polaridad; mientras que las formas básicas (alcaloides base), son solubles en solventes de mediana polaridad, e insolubles en agua. Esta característica es muy útil en los procesos de extracción, a partir de muestras biológicas.

Antes de la extracción, generalmente la muestra vegetal se seca y se muele, y luego se somete a un proceso de eliminación de las sustancias lipídicas (desengrase), las cuales interfieren la formación de sales con soluciones acuosas de ácidos minerales. Para estos procesos iniciales de extracción, también se utilizan los cartuchos de extracción en fase sólida, los cuales contienen diferentes materiales porosos que permiten una extracción más selectiva de los compuestos de interés.

Extracción con alcohol

Una vez desengrasado el material biológico, se puede someter a extracción con alcohol, preferiblemente etanol, dada su baja toxicidad frente al metanol. Este proceso puede realizarse a temperatura ambiente o con calentamiento, y con agitación. El extracto crudo que se obtiene además de contener los alcaloides solubles en alcohol, contiene otras sustancias no alcaloidales, por lo cual es recomendable combinar esta técnica de extracción con otra como la extracción con ácidos o bases, para obtener extractos alcaloides libres de

otras sustancias neutras. La extracción con ultrasonido y etanol al 52%, a temperatura ambiente, ha sido reportada como muy eficiente para el caso de alcaloides tipo berberina.

Extracción con solventes eutécticos NADES

El uso de los solventes orgánicos generalmente usados para la extracción de alcaloides, como el cloroformo y el diclorometano, los cuales son costosos, tóxicos y contaminantes del medio ambiente, se está viendo desplazado gracias al uso de los solventes eutécticos DES. El solvente DES obtenido de combinar cloruro de colina con ácido levulínico y agua, es un ejemplo de un solvente extractor para alcaloides naturales.

Extracción con ácidos

Una vez desengrasada la muestra, se somete a agitación con soluciones acuosas diluidas de un ácido mineral como el HCl. El tiempo de extracción y la cantidad de solución ácida a utilizar, los determina el tamaño de la muestra a extraer. Además de la agitación mecánica, el uso de un baño ultrasonido o un sistema de extracción asistido con microondas, favorecen la formación de las sales de alcaloides solubles en agua, acelerando y haciendo más eficiente el proceso de extracción. Luego de esto la suspensión se filtra y el material vegetal residual se puede re-extraer nuevamente con más solución ácida, hasta extraer todo el material alcaloidal de la muestra. El filtrado ácido se basicifica, con soluciones acuosas de amoníaco o una base mineral como NaOH, hasta llevar la solución a un pH mayor de 8. En estas condiciones los alcaloides recuperan su forma básica, se hacen insolubles en el medio acuoso alcalino, y se pueden extraer por partición con un solvente orgánico, el cual generalmente es cloroformo o diclorometano. La fase orgánica se recupera, se seca con un desecante como el sulfato de sodio anhidro, y se lleva a sequedad para obtener el extracto total de alcaloides (extracto crudo de alcaloides). Este método es recomendado por algunos autores para extraer alcaloides de hojas y ramas. La 4.5. muestra un diagrama simplificado de este método de extracción.

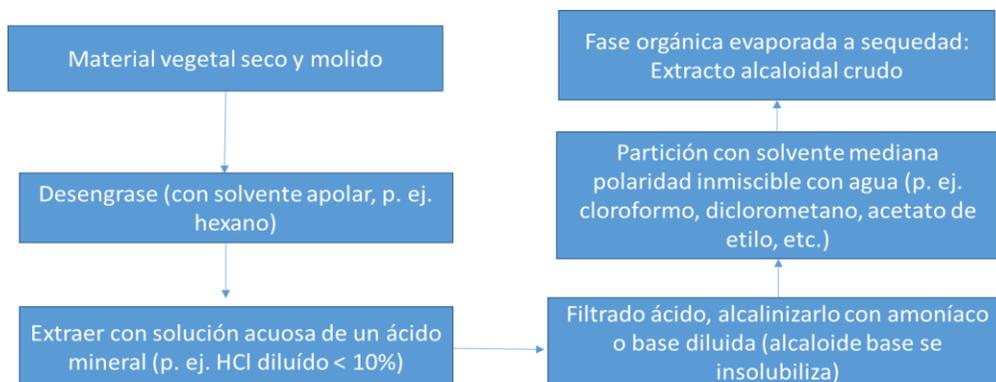


Figura 4.5. Diagrama de flujo que resume el proceso de extracción de alcaloides naturales con soluciones acuosas de ácidos minerales diluidos.

Extracción con bases

La muestra vegetal desengrasada, se somete a agitación con soluciones acuosas de bases como el amoniaco o NaOH. De esta manera, los alcaloides que se encuentren naturalmente en forma de sales son convertidos a sus formas básicas, por lo que este método de extracción es más ventajoso para cuando se desea hacer análisis de control de calidad, especialmente en muestras vegetales con bajo contenido de alcaloides.

Una vez basificado el material vegetal y liberados lo alcaloides del mismo, se puede proceder a acidificar la mezcla para formar las sales solubles en agua, filtrar, y la fase acuosa ácida trabajarla como en el método de extracción con ácidos. La figura 4.6 resume este método de extracción.



Figura 4.6. Diagrama de flujo simplificado para la extracción de alcaloides naturales con soluciones acuosas de bases minerales diluidas.

Extracción con fluidos supercríticos

Esta técnica de extracción presenta ventajas sobre los métodos clásicos de extracción descritos anteriormente, por ejemplo, es ambientalmente segura, y permite la extracción de compuestos térmicamente inestables. Como fluido supercrítico se utiliza ampliamente el dióxido de carbono, para extraer cafeína del café, alcaloides tipo pirrolizidina, quinolina, isoquinolina, piridínicos, indólicos, fenantrénicos, etc.

Técnicas de separación e identificación

Las técnicas clásicas de análisis y separación cromatográfica incluyen la cromatografía en capa fina en cromatoplasmas de sílica gel. Se cuenta además con diferentes eluentes para el análisis de los alcaloides en drogas vegetales. La tabla 1 muestra una serie de algunas de las fases móviles más utilizadas para este propósito.

Tabla 1. Fases móviles utilizadas para el análisis CCF de alcaloides de diferentes drogas vegetales.

Eluente	Droga alcaloidal
Tolueno-Acetato de etilo-Dietilamina 7:2:1	Mayoría, incluye alc. de la quina, del acónito, de efedra, etc.
Acetato de etilo-Metanol-Agua 100:13.5:10	<i>Colchicum, Rauwolfia</i>
Acetato de etilo-Metanol 9:1, 3:1	<i>Vinca, Catharanthus</i>
Butanol-Acetato de etilo-Acido fórmico-Agua 3:5:1:1	<i>Mahoniae</i>
Butanol-Acido acético-Agua 4:4:1	<i>Catharanthus</i>
Ciclohexano-Cloroformo-Acido acético 45:45:10	<i>Berberis</i>

Para determinar cuantitativamente el contenido de alcaloides de una muestra biológica, o de un producto fitoterapéutico que contenga alcaloides, la mejor opción de análisis es la técnica de cromatografía HPLC, mejor aún si está acoplada a otras técnicas de identificación como la espectroscopia UV (detectores de arreglo de diodos DAD), y la espectrometría de masas.

Con el desarrollo de las técnicas cromatográficas instrumentales, particularmente la técnica HPLC, se cuenta con mejores sistemas y condiciones experimentales para la separación y aislamiento de alcaloides naturales. Adicionalmente, el uso de técnicas acopladas como HPLC a diferentes detectores como espectrómetros ultravioleta-visible UV-VIS, detectores de arreglo de diodos DAD, y espectrómetros de masas, permite análisis y separaciones más rápidas y más eficientes, que las obtenidas con las técnicas cromatográficas clásicas. Una técnica interesante y novedosa combina la CCF con espectrometría de masas, se ha desarrollado para determinar los adulterantes de la cocaína como son cafeína, benzocaína, lidocaína y fenacetina. Otra técnica combina la CCF de alta resolución (sigla inglesa: HPTLC) con un detector de fluorescencia para cuantificar alcaloides tipo ergotamina.

Al revisar la literatura científica más reciente, se encuentra que la técnica combinada de HPLC bien sea en su forma normal, o en su forma ultra-HPLC, con espectrómetros de masas que permiten obtener los espectros de masas tándem MS/MS, es cada vez más utilizada. Con estas técnicas es posible no solo la separación, sino también la cuantificación e identificación de los alcaloides por sus espectros de masas. Este tipo de dispositivos se utiliza con excelentes resultados para la separación e identificación de alcaloides de diferentes fuentes naturales, y para estudios farmacocinéticos. Por ejemplo, para alcaloides del acónito, del tropano, de sófora, tipo estricnina, tipo colchicina y de *Equisetum*.

Además de las técnicas con HPLC, también se cuenta con técnicas analíticas como la cromatografía en contracorriente y la electroforesis capilar.

Cuando no se cuenta con estas técnicas instrumentales, se pueden utilizar otras técnicas para realizar análisis cuantitativos aproximados, como por ejemplo la valoración mediante técnicas volumétricas basadas en las propiedades ácido-base de los alcaloides (valoraciones ácido-base), y mediante técnicas como la espectroscopia UV-visible mediante curvas de calibración con estándares de referencia (marcadores). Estas últimas permiten determinar el contenido de alcaloides totales, con buena aproximación y con utilidad para muchos procesos de control de calidad de productos que contengan alcaloides.

Un ejemplo de métodos sencillos es la valoración del contenido del alcaloide boldina, a partir de la droga seca. En este procedimiento se extrae la droga de acuerdo a la metodología de Bladt-Rickl, se fracciona por CCF preparativa una porción pesada del extracto. Se recupera la banda de R_f correspondiente a la boldina, y se cuantifica disolviendo en un volumen conocido de solvente, y leyendo la absorbancia a 315 nm. El porcentaje de boldina en la droga se calcula por interpolación en una curva de calibración realizada con un estándar de boldina.

Para el proceso de caracterización de los alcaloides, las técnicas de RMN protónica y de carbono-13, se constituyen en herramienta indispensable, especialmente para los trabajos de investigación relacionados con el hallazgo de nuevos compuestos. Tanto las versiones en una dimensión como la RMN bidimensional, son muy utilizadas para propósitos de la caracterización de los alcaloides y los productos naturales en general. Es importante anotar el gran potencial que tiene el desarrollo de las nuevas estrategias experimentales sobre el metabolismo vegetal, en especial las que involucran la resonancia magnética nuclear y los estudios de metabolómica, ya que estos desarrollos permitirán contar con procesos experimentales más rápidos y confiables para el estudio de los alcaloides y los productos naturales en general.

Biogénesis

El origen biosintético de muchos alcaloides ha sido establecido gracias al uso de elementos marcados como el carbono-13, el cual se puede seguir por RMN de carbono-13. Sin embargo, algunas etapas intermedias son hipotéticas, por lo que hablaremos de ahora en adelante de biogénesis.

Los alcaloides naturales derivan principalmente de aminoácidos como ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido antranílico, ácido nicotínico; y en menos proporción asparagina, prolina y ácido glutámico. Fenilalanina, tirosina y ácido antranílico, derivan del ácido shikímico; mientras que el triptófano deriva del ácido antranílico, es decir también de ácido shikímico.

Las figuras 4.7 y 4.8 muestran esquemas simplificados de la biogénesis de alcaloides aromáticos tipo BIQ bencilisoquinolinas, BBIQ bisbencilisoquinolinas, aporfinas, morfina (opio) y relacionados, etc.

Otros alcaloides aromáticos, como alcaloides tipo quinolina, indólicos, tipo harmano, se originan según el esquema de la figura 4.9.

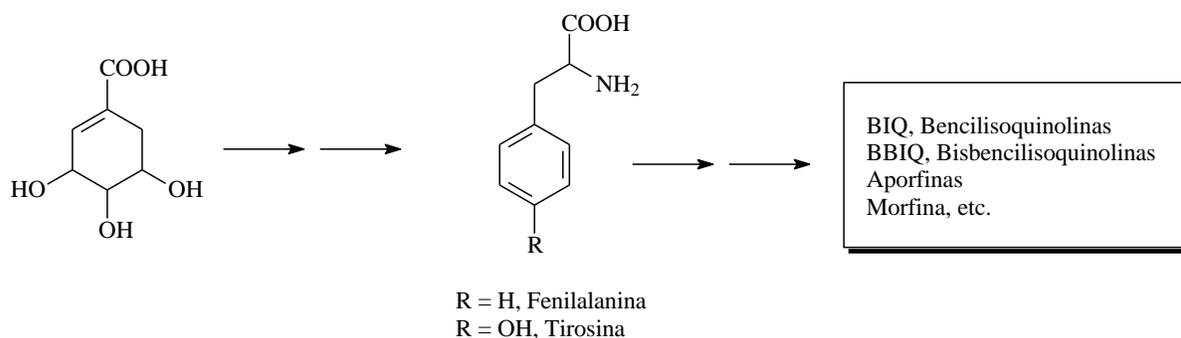
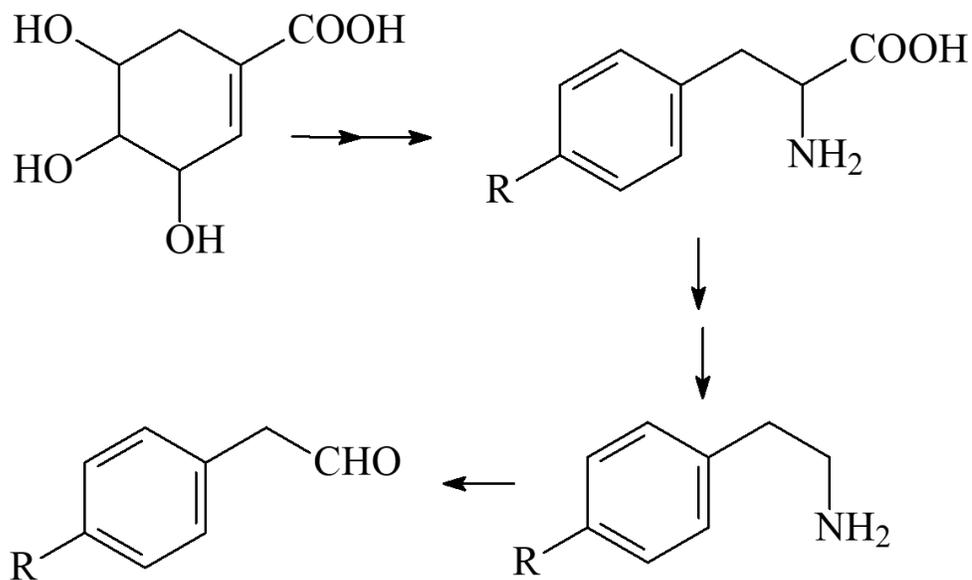
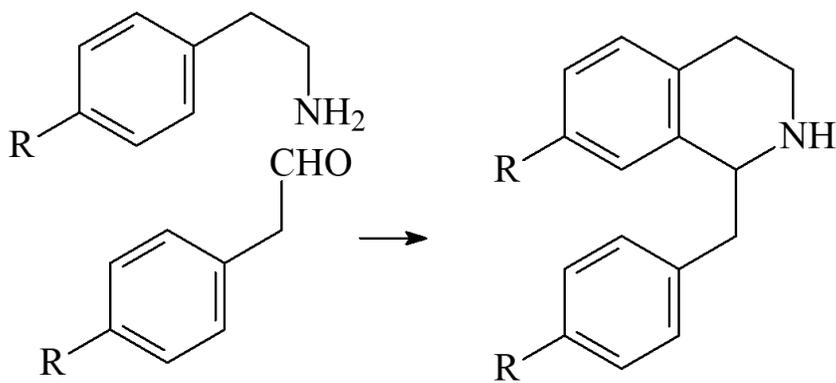


Figura 4.7. Esquema biogénico que explica el origen de diferentes clases de alcaloides a partir del ácido shikímico y los aminoácidos aromáticos fenil alanina y tirosina.





Núcleo bencilisoquinolinas

Figura 4.8. Esquema de la biogénesis del núcleo característico de alcaloides tipo bencilisoquinolina BIQ, a partir de ácido shikímico y los aminoácidos aromáticos fenilalanina (R = H) y tirosina (R = OH).

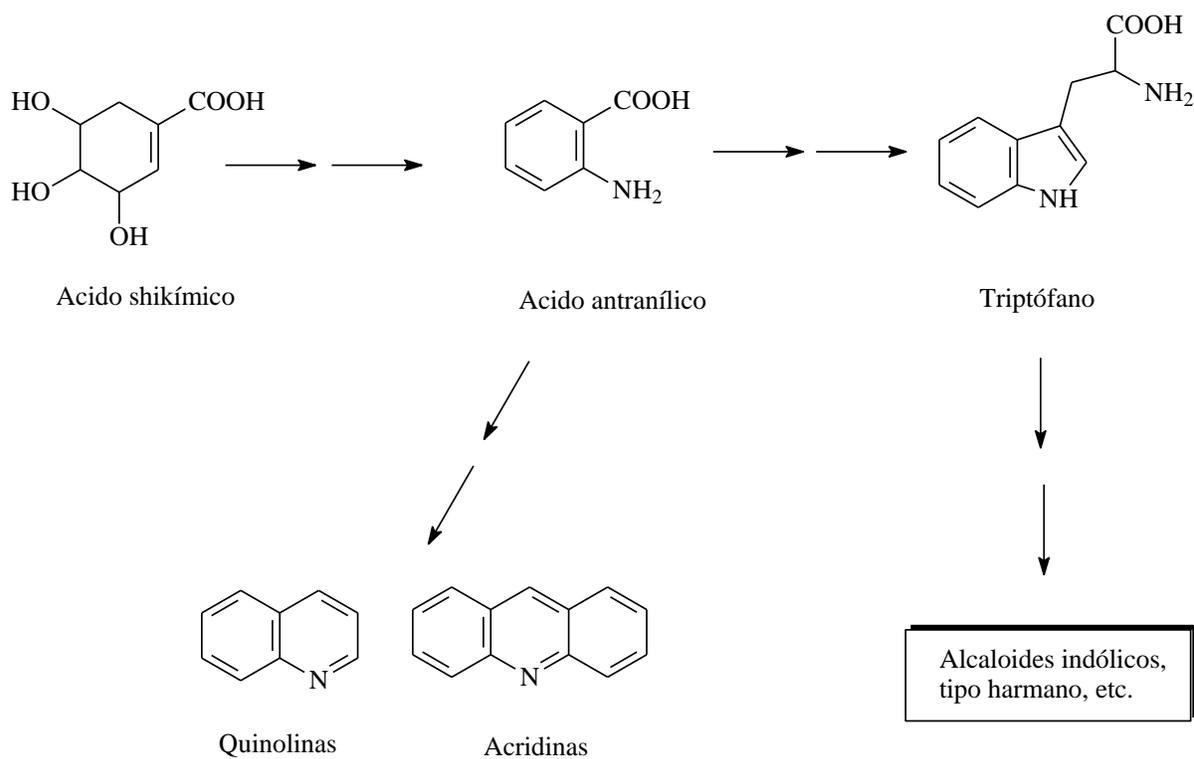
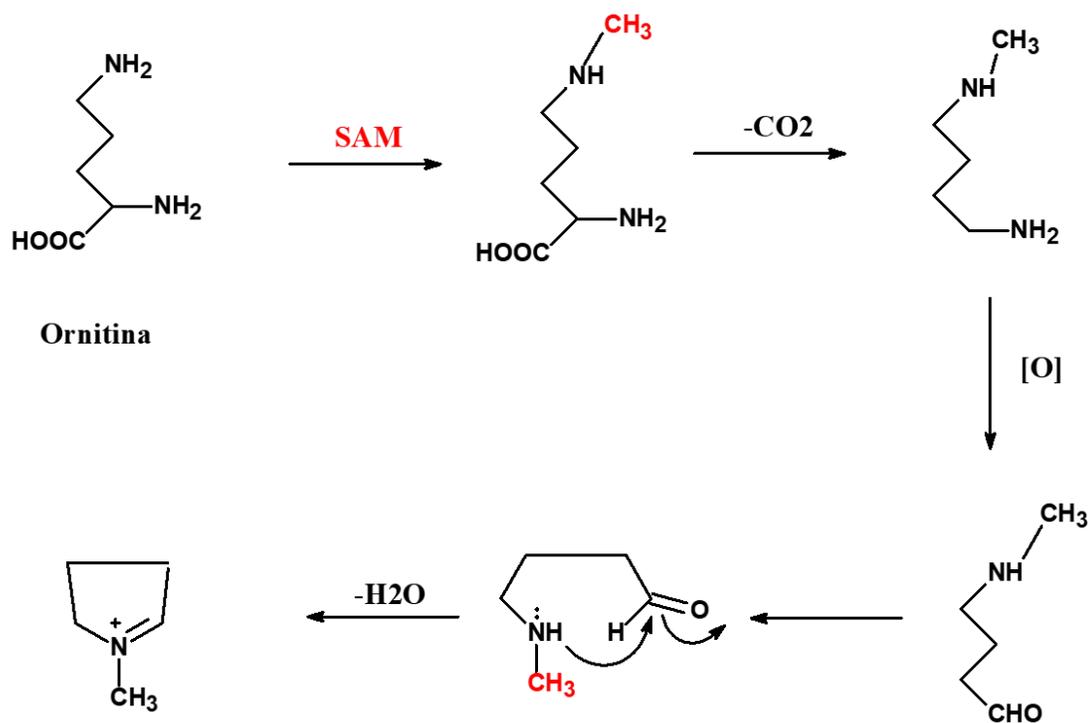


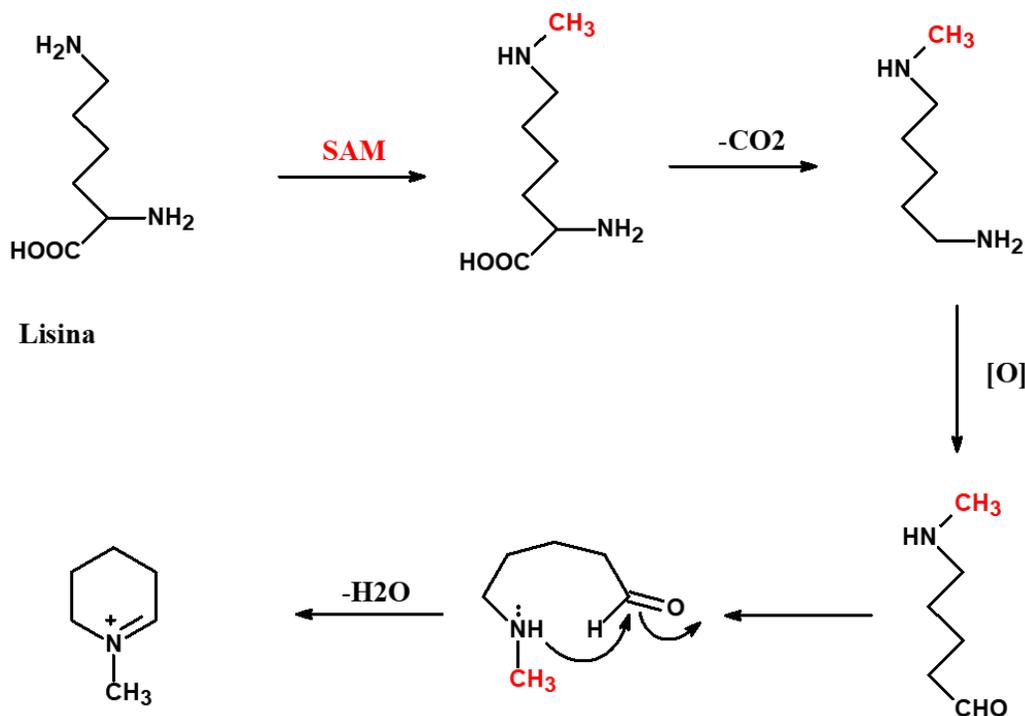
Figura 4.9. Esquema biogénico general que explica el origen de alcaloides tipo quinolina, acridina, indólicos, harmano, etc.; a partir de ácido shikímico, y con intermedios como los aminoácidos triptófano y ácido antranílico.

Por otro lado, a partir de los aminoácidos no aromáticos ornitina (figura 4.10) y lisina (figura 4.11), se originan diversos alcaloides que tienen los anillos N-metilpirrolidina (anillo de 5) y piperidina (anillo de 6), como son los alcaloides tipo pirrolidina, pirrolozidina, del tropano, esparteína y lupina, del lycopodio, entre otros (18).



Catión N-metilpirrolidinio

Figura 4.10. Esquema biogénico que explica la formación del anillo N-metilpirrolidina, característico de diferentes alcaloides naturales, a partir del aminoácido ornitina.



Catión N-metilpiperidinio

Figura 4.11. Esquema biogénico que explica la formación del anillo N-metilpiperidina, característico de diferentes alcaloides naturales, a partir del aminoácido lisina.

La biogénesis de alcaloides aromáticos como bencilisoquinolinas y no aromáticos como monoterpenindólicos, es motivo de investigación para el aprovechamiento industrial de los alcaloides naturales.

Interés farmacéutico de los alcaloides

Sin duda, dentro de las diferentes clases de productos naturales estudiados, los alcaloides constituyen no solo un grupo abundante de sustancias con variaciones estructurales diversas y con diferentes actividades biológicas. Al revisar la literatura científica se encuentran abundantes trabajos relacionados con el uso y el potencial de muchos alcaloides contra diferentes enfermedades.

La tabla 4.1. resume los nombres y los usos de diferentes alcaloides naturales.

Tabla 4.1. Nombres de algunos alcaloides naturales y usos reportados.

Alcaloide	Fuente	Actividad farmacológica más destacada
Aconitina	<i>Aconitum variegatum</i> , ranunculáceas	Antinociceptiva, efectos cardio vasculares
Alcaloides de areca	<i>Areca catechu</i> , arecáceas	Activación de la función cerebral
Atropina	<i>Atropa belladonna</i> , solanáceas	Anti colinérgica
Barbamina	<i>Berberis amurensis</i> , berberidáceas	Efectos leucogénicos
Berberina	Gén. <i>Berberis</i> , berberidáceas	Anti diabética
Brucina	<i>Strychnus nux-vomica</i> , loganiáceas	Analgésica, antiinflamatoria
Bufotenina	<i>Amanita muscaria</i> (hongo), amanitáceas	Incrementa la presión sanguínea
Cafeína	<i>Thea sinensis</i> , teáceas; <i>Coffea sp</i> , rubiáceas	Analgésica y estimuladora Sistema Nervioso Central (SNC)
Capsaicina	<i>Capsicum annum</i> y <i>C.</i> <i>frutescens</i> , solanáceas	Activa sobre neuronas sensoras
Catuabina-A	<i>Trichillia catigua</i> , meliáceas	Mejora el balance nutricional y tiene efectos anti depresivos
Colina	Amplio número de plantas	Componente de membrana mitocondrial y de acetilcolina
Cytisina	<i>Laburnum anagyroides</i> , leguminosas	Disminuye riesgos en la salud cardio vascular y respiratoria de fumadores
Cocaína	<i>Erythroxylon coca</i> y <i>E.</i> <i>truxillense</i> , eritroxiláceas	Estimulante del sistema nervioso central SNC

Alcaloide	Fuente	Actividad farmacológica más destacada
Codeína	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Analgésico opioide
Coniína	<i>Conium maculatum</i> , umbelíferas	Estimulante SNC
Cuscohigrina	<i>Atropa belladonna</i> , solanáceas	Inhibe células nerviosas y disminuye la actividad neuronal
Dihidroquinina	<i>Cinchona officinalis</i> , rubiáceas	Inhibe sistema nervioso parasimpático
Dihidroquinidina	<i>Cinchona officinalis</i> , rubiáceas	Inhibe sistema nervioso parasimpático
Ecgonina	<i>Erythroxylon coca</i> , eritroxiláceas	Estimulante SNC
Efedrina	Gén. <i>Ephedra</i> , efedráceas	Estimulante del sistema simpático
Emetina	<i>Psychotria ipecacuanha</i> , rubiáceas	Antiviral, anticáncer, antiparasitaria, contraceptiva
Equimidina y equihumilina	<i>Alkanna orientalis</i> , boragináceas	Antiinflamatoria, demulcente, anestésico local, anti plasmodial
Ergina	<i>Argyreia nervosa</i> , convolvuláceas	Psicodélica
Ergotamina	<i>Claviceps purpurea</i> , clavicipitáceas (hongo parásito)	Vaso constrictor y α - adrenoreceptor antagonista
Escopolamina	<i>Hyocyamus niger</i> , solanáceas	Efectos sedantes, antieméticos y amnésicos
Esparteína	<i>Cystisus scoparium</i> y <i>Lupinus luteus</i> , fabáceas	Antibacterial, anti hongos y anti arritmica
Estaquidrina	<i>Chrysantemum morifolium</i> , compuestas	Efecto cardiovascular, antipirético y antibacterial

Alcaloide	Fuente	Actividad farmacológica más destacada
Estricnina	<i>Strychnus nux-vomica</i> , loganiáceas	Estimulante del cerebelo
Higrina	<i>Erytroxilon coca</i> , eritroxiláceas	Estimulante del SNC y tonificador del tracto gastrointestinal
Hordenina	<i>Hordeum vulgare</i> , poáceas	Promueve la energía cognitiva
Lobelina	<i>Lobelia inflata</i> , lobeliáceas	Bronquitis crónica y asma
Mescalina	<i>Laphophora williamsii</i> , cactáceas	Liberación de neurotransmisores
Morfina	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Analgésico opioide
Narcotina	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Control medular de la tos
Narceína	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Analgésica, antitusiva
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i> , solanáceas	Efectos modificadores del comportamiento
Oxiacantina	<i>Berberis asiática</i> , berberidáceas	Inhibición de per oxidación lipídica
Pancreatistatina	Amarilidáceas	Anti cáncer
Papaverina	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Relajación muscular
Peletierina	<i>Punica granatum</i> , litráceas	Antiparasitaria
Pilocarpina	<i>Pilocarpus microphyllus</i> , rutáceas	Estimulante del sistema parasimpático
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i> , rubiáceas	Antimalárica, anti pirética, analgésica, anti inflamatoria, anti viruela

Alcaloide	Fuente	Actividad farmacológica más destacada
Quinidina	<i>Cinchona officinalis</i> , rubiáceas	Antimalárica
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i> , apocináceas	Anti hipertensiva
Ricinina	<i>Ricinus communis</i> , euforbiáceas	Estimulante SNC, antibacterial
Sanguinarina	<i>Sanguinaria canadensis</i> , <i>Argemone mexicana</i> , papaveráceas	Antimicrobiana, anti hongos, anti inflamatoria, adrenolítica, simpatolítica
Senecionina	<i>Senecio vulgaris</i> , compuestas	Antidiabética, antihipertensiva
Swainsonina	<i>Swainsona canescens</i> , fabáceas	Inhibidora de α -mannosidasa
Tebaína	<i>Papaver somniferum</i> , papaveráceas	Anti inociceptiva
Veratrina	<i>Veratrum sabadilla</i> , melantiáceas	Estimulante de secreción de renina
Vinblastina	<i>Cataranthus roseus</i> , apocináceas	Anti cáncer, enfermedad de Hodgkin
Vincristina	<i>Cataranthus roseus</i> , apocináceas	Antineoplásica
Yohimbina	<i>Pausinystalia yohimbe</i> , rubiáceas	Colinérgica (parasimpático) y adrenérgica (simpático)

En el caso particular del cáncer, se presentan estudios de potencial uso terapéutico. También se investigan otros usos potenciales que incluyen actividad contra tuberculosis, antiinflamatorios, antiparasitarios, anti Alzheimer y anti microbianos, entre otros. Es interesante anotar que se ha observado sinergia entre ciertos alcaloides como los tipo camptotecina con flavonoides como la quercetina, contra cáncer mamario, e inclusive se han sintetizado alcaloides flavonoides con potencial acción antidiabética.

Los alcaloides en general tienen diferentes actividades biológicas sobre el organismo humano. Incrementan la actividad de la corteza prefrontal, el tálamo, y el sistema visual,

efecto anti colinérgico como inhibidores competitivos del receptor muscarínico de acetilcolina. Se usan en la estimulación del sistema simpático porque actúan directamente sobre receptores α y β , generando actividades anti psicótica e anti hipertensiva, como agentes bloqueadores α 2-adrenérgicos, con actividad anti diurética media, y como agentes neoplásicos. Además, muestran propiedades antiinflamatorias, demulcentes, bloqueadoras de ganglios, antiplasmódicas, insecticidas y hepatoprotectoras.

Referencias bibliográficas

1. Funayama S, Cordell GA. Alkaloids. A Treasury of Poisons and Medicines, Academic Press, London, 2015.
2. Arango G. J., Alcaloides y compuestos nitrogenados, Universidad de Antioquia 2001.
3. Sanabria, A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1983.
4. Che D, Cheng J, Ji Z, Zhang S, Li G, Sun Z, You J. Recent advances and applications of polydopamine-derived adsorbents for sample pretreatment. Trends Anal. Chem. 2017; 97: 1-14.
5. Klein-Júnior LC, Vander Heyden Y, Teresinha Henriques A. Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices. Trends Anal. Chem. 2016; 80: 66–82.
6. Brandão GHA, Rigo G, Roque AA, Souza ACD, Scopel M, Nascimento CAO, Tasca T, Pereira CG, Giordani RB. Extraction of bioactive alkaloids from *Melocactus zehntneri* using supercritical fluid. J. Supercrit. Fluids 2017; 129: 28–35.
7. Bladt S., Rickl V. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas 2nd ed. 1996. 2nd printing 2009 Edition, Springer.
8. De Carvalho TC, Tosato F, Souza LM, Santos H, Merlo BB, Ortiz RS. *et al.* Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. Forensic Sci. Internat. 2016; 262: 56–65.
9. Oellig C. Lysergic acid amide as chemical marker for the total ergot alkaloids in rye flour – Determination by high-performance thin-layer chromatography– fluorescence detection. J. Chromatog. A, 2017; 1507: 124–131.
10. Ng SW, Ching CK, Chan AY, Mak TW. Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids (aconitum alkaloids, solanaceous tropane alkaloids, sophora alkaloids, strychnos

- alkaloids and colchicine) in human urine and herbal samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. B* 2013; 942–943: 63–69.
11. Cramer L, Ernst L, Lubienski M, Papke U, Schiebel HM, Jerz G, Beuerle T. Structural and quantitative analysis of *Equisetum* alkaloids. *Phytochemistry* 2015; 116: 269–282.
 12. Xu Y, Li Y, Zhang P, Yang B, Wu H, Guo X, Li Y, Zhang Y. Sensitive UHPLC–MS/MS quantitation and pharmacokinetic comparisons of multiple alkaloids from Fuzi- Beimu and single herb aqueous extracts following oral delivery in rats. *J. Chromatog. B* 2017; 1058: 24–31.
 13. Mao Z, Wang X, Liu Y, Huang Y, Liu Y, Di X. Simultaneous determination of seven alkaloids from *Rhizoma Corydalis Decumbentis* in rabbit aqueous humor by LC–MS/MS: Application to ocular pharmacokinetic studies. *J. Chromatog. B* 2017;1057: 46–53.
 14. Khatib M, Pieraccini P, Innocenti M, Melani F, Mulinacci N. An insight on the alkaloid content of *Capparis spinosa* L. root by HPLC/DAD-MS, MS/MS and ¹H qNMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; 123: 53–62.
 15. Leitão GG, Pereira JPB, de Carvalho PR, Ropero DR, Fernandes PD, Boylan F. Isolation of quinoline alkaloids from three *Choisya* species by high-speed countercurrent chromatography and the determination of their antioxidant capacity. *Rev. Brasil. Farmacog.* 2017; 27: 297–301.
 16. Li L, Xu L, Chen M, Zhang G, Zhang H, Chen A. Simultaneous separation and determination of four *Uncaria* alkaloids by capillary electrophoresis using dual cyclodextrin system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 141: 39–45.
 17. Deborde C, Moing A, Roch L, Jacob D, Rolin D, Giraudeau P. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* 2017; 102–103: 61–97.
 18. Cordell GA. Fifty years of alkaloid biosynthesis in Phytochemistry. *Phytochemistry* 2013; 91: 29–51.
 19. Marín-Sáez J, Romero-González R, Garrido Frenich A. Multianalysis determination of tropane alkaloids in cereals and solanaceae seeds by liquid chromatography coupled to single stage Exactive-Orbitrap. *J. Chromatog. A*, 2017; 1518: 46–58.
 20. Schlaager S, Drager B. Exploiting plant alkaloids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 37:155–164.
 21. Kries H, O'Connor SE. Biocatalysts from alkaloid producing plants. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016; 31: 22–30.

22. Joshi P, Vishwakarma RA, Bharate SB. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. *Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer*. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 138: 273-292.
23. Havelek R, Muthna D, Tomsik P, Kralovec K, Seifrtova M, Cahlikova L. *et al.* Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biol. Interac.* 2017; 275: 121-132.
24. Mishra SK, Tripathi G, Kishore N, Singh RK, Singh A, Tiwari VK. Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 137: 504-544.
25. Kumar V, Gupta M, Sumit G, Gandhi SG, Bharate SS, Kumar A. *et al.* Anti-inflammatory chromone alkaloids and glycoside from *Dysoxylum binectariferum*. *Tetrahedron Lett.* 2017; 58: 3974-3978
26. Koolen HHF, Pral EMF, Alfieri SC, Marinho JVN, Serain AF, Hernandez-Tasco AJ. *et al.* Antiprotozoal and antioxidant alkaloids from *Alternanthera littoralis*. *Phytochemistry* 2017; 134: 106-113.
27. Tibebu Lemma M, Mahmoud Ahmed A, Tamer Elhady M, Thi Ngo H, Le-Huy Vu T, Kim Sang T. *et al.* Medicinal plants for *in vitro* antiplasmodial activities: A systematic review of literature. *Parasitol. Internat.* 2017; 66: 713–720.
28. Jiang Y, Gao H, Turdu G. Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: A review. *Bioorg. Chem.* 2017; 75: 50–61.
29. Ma F, Du H. Novel deoxyvasicinone derivatives as potent multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis, and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 140: 118-127.
30. Pinto NCC, Campos LM, Evangelista ACS, Silva TP, Melob RCN, de Lourençoc CC. *et al.* Antimicrobial *Annona muricata* L. (sour sop) extract targets the cell membranes of *Gram*-positive and *Gram*-negative bacteria. *Ind. Crops Prod.* 2017; 107: 332–340.
31. Tang Q, Ji F, Wang J, Guo L, Li Y, Bao Y. Quercetin exerts synergetic anti-cancer activity with 10-hydroxy camptothecin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017; 109: 223–232.
32. Zhen J, Dai Y, Villani T, Giurleo D, Simon JE, Wu Q. Synthesis of novel flavonoid alkaloids as α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2017; 25: 5355-5364.
33. Dary C, Baghdikian B, Kim S, Mabrouk F, Hul S, Jabbour F, Ollivier E, Bun SS. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Stephania cambodica* using response surface methodology. *Compt. Rend. Chim.* 2017; 20: 996-1005.

34. Duan L, Dou LL, Guo L, Li P, Liu EH. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2016; 4: 2405–2411.
35. Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Mat. Today Chem.* 2018; 9: 56-72.
36. Wang M, Liu ZF, Tang H, Cheng BA. Application of alkaloids in reversing multidrug resistance in human cancers. *Chin. J Nat. Med.* 2018; 16: 561-571.

Capítulo 5

Aceites esenciales



Muchos vegetales producen sustancias de aroma y sabor agradables. Estas sustancias generalmente se encuentran como mezclas complejas de sustancias con diferente grado de volatilidad. Aunque no es posible actualmente definir límites claros en cuanto a dicha volatilidad, utilizaremos como aproximación para definir estas sustancias en tres grandes categorías: *Flavor*, perfumes y aceites esenciales. El término inglés *flavor*, equivale en español a la suma de dos efectos en nuestros sentidos: aroma y sabor. Es el efecto que sentimos por ejemplo al masticar una fruta, y muchos autores se refieren al *flavor* de las frutas frescas, en lugar del aceite esencial o perfume de las frutas frescas. El término perfume está más asociado a las sustancias de aroma agradable que se obtienen especialmente de flores frescas. Por último, el término aceite esencial o esencia, está principalmente referido a las mezclas de sustancias de aroma agradable, que se obtienen indistintamente de todas las partes de las plantas, especialmente de hojas, semillas y tallos, y pueden obtenerse muchos de ellos a partir de las muestras secas. Aunque para muchos autores es indistinto referirse a esencias y a perfumes. En términos de volatilidad, el *flavor* es más volátil que el perfume, y este a su vez es más volátil que un aceite esencial. De acuerdo con lo anterior es posible referirse mejor al *flavor* del maracuyá, que al aceite esencial o al perfume de maracuyá. Es más conveniente referirse al aceite esencial de la hierbabuena, que al *flavor* o el perfume de la hierbabuena. Finalmente, es más conveniente referirse al perfume de jazmín (flores), que al *flavor* del jazmín.

Definición

Se definen generalmente como aceites esenciales las fracciones líquidas, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes, antioxidantes, aromaterapia).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de hasta más de 50 componentes que incluyen: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.

Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, y propensos a sufrir reacciones de polimerización,

son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales o sintéticos se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, etc.).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanóicos (p.ej. clavo, canela, anís, etc.).

Aunque esta clasificación es muy general nos resultará útil para propósitos de estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo, existen clasificaciones más complejas como la de González Patiño que tienen en cuenta otros aspectos químicos.

Distribución y estado natural

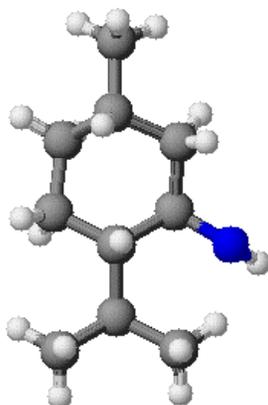
Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, pináceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajeno, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sazafrán, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes ranunculales, violales y primulales, mientras que son escasos en rutales, cornales, lamiales y asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en magnoliales, rutales, cornales y asterales.

Aunque en los aceites esenciales tanto los mono-, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal.

A continuación, se presentan algunos aspectos químicos y de actividad biológica generales sobre las clases de compuestos más comúnmente encontrados en diferentes aceites esenciales como son los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos.

Monoterpenos y sesquiterpenos



Los monoterpenos y sesquiterpenos son terpenos de 10 y 15 átomos de carbonos respectivamente, derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (GPP) y farnesilpirofosfato (FPP) respectivamente. La Figura 5.1 muestra ejemplos de monoterpenos y sesquiterpenos naturales. De acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc.

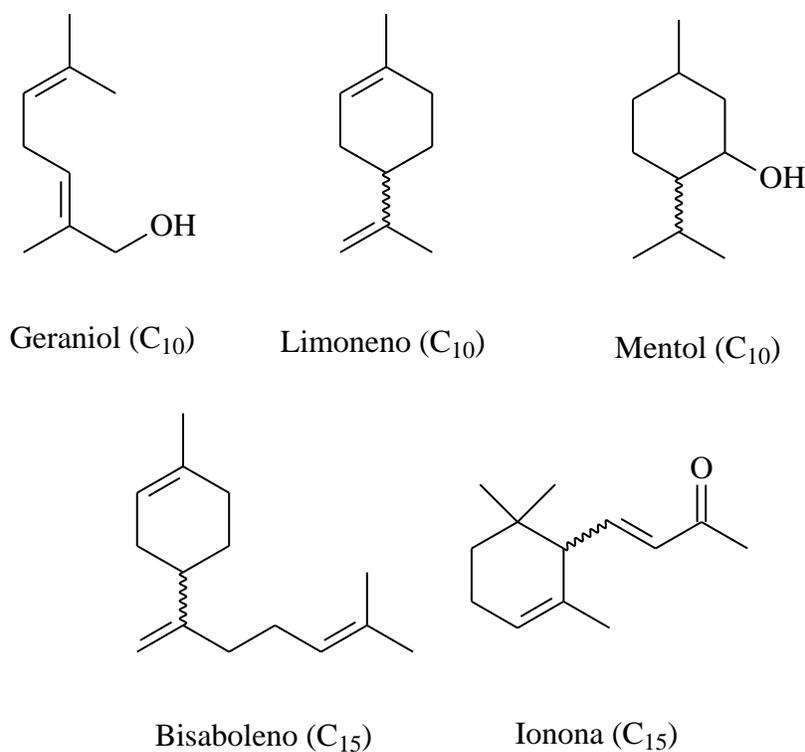


Figura 5.1. Ejemplos de mono- y sesquiterpenos naturales.

Biogénesis de terpenos

Hasta hace algunos años se aceptaba que los monoterpenos y en general todos los compuestos terpenoides naturales se biosintetizaban por la ruta de la acetilcoenzima a través de un intermedio común que es el ácido mevalónico (sigla inglesa MVA). Sin embargo, recientemente se tienen evidencias que algunos terpenoides no se originan solo por esta ruta, sino también por dos rutas alternas, una ruta que se denomina la ruta modificada del ácido mevalónico y una ruta alterna que puede involucrar piruvato, gliceraldehído-3-fosfato y un intermedio de 5 átomos de carbono: el metileritritolfosfato (sigla inglesa MEP). La figura 5.2. resume dos de las tres rutas conocidas ahora, y muestra como la ruta clásica del ácido mevalónico ocurre en el citosol de las células vegetales y da origen a terpenoides C_{15n} (n = impar), mientras que la ruta del metileritritol fosfato ocurre en los plastidios y da origen especialmente a terpenoides C_{10n}.

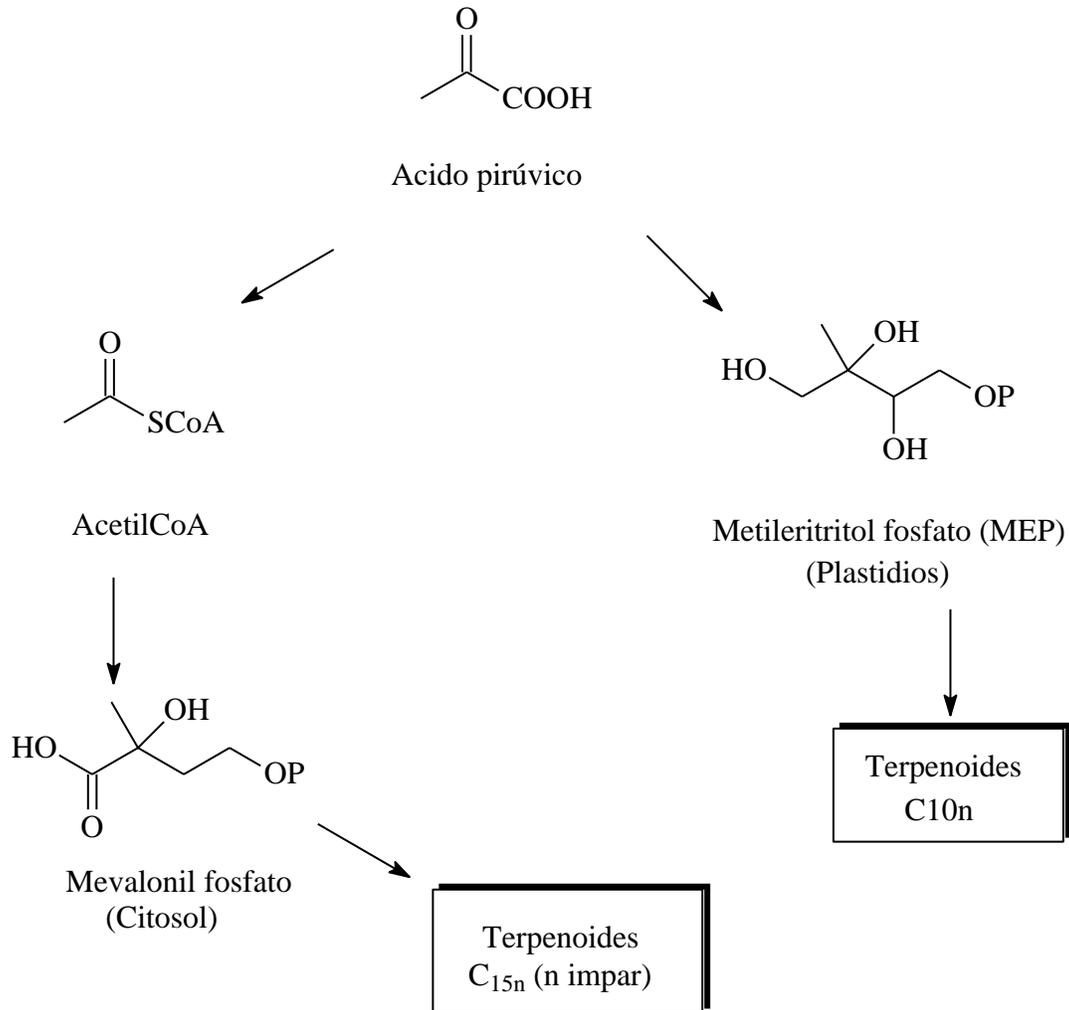


Figura 5.2. Esquema biogénico para dos rutas que conducen a terpenoides.

Biogénesis del ácido mevalónico

La Figura 5.3 esquematiza el proceso de biogénesis del ácido mevalónico. Inicialmente se condensan dos moléculas de acetilCoA, con la participación hipotética de una β -cetotilasa y una enzima condensante. Enseguida esta unidad es atacada por otra unidad de acetilCoA que ha perdido un H- α . La hidrólisis de una de las dos funciones tioéster da lugar a la β -hidroxi- β -metilglutarilcoenzima-A. Una segunda hidrólisis del otro grupo tioéster seguida de dos reducciones sucesivas con una reductasa NADPH-dependiente se llega al ácido mevalónico.

Biogénesis de IPP y DMAPP

El ácido mevalónico es el precursor de las dos unidades básicas que dan origen a los terpenoides: Isopentenilpirofosfato (IPP) y γ,γ -dimetilalilpirofosfato (DMAPP) tal como se esquematiza en la Figura 5.4.

Inicialmente, una molécula de ácido mevalónico es pirofosfatada por dos unidades de ATP para originar mevalonil-pirofosfato. Enseguida la molécula sufre un proceso concertado de descarbonatación con la participación de otra molécula de ATP. De esta manera se origina una molécula de Isopentenilpirofosfato (IPP). La simple isomerización del enlace doble del IPP da origen a la unidad de DMAPP. Estos dos intermedios también son generados a través de las rutas alternas del ácido mevalónico modificado, y del metileritritol fosfato.

Condensación cabeza-cola de IPP y DMAPP

Una unidad de IPP puede condensarse con muchas unidades DMAPP mediante un proceso de condensación comúnmente denominado condensación "cabeza-cola", siendo la cabeza la función pirofosfato y la cola el extremo donde están ubicados los metilos. La Figura 5.5 esquematiza el proceso de condensación de dos moléculas de 5 átomos de carbono (IPP y DMAPP) para dar origen a una molécula de 10 átomos de carbono: Geranilpirofosfato. Esta sustancia es el precursor inmediato de todos los monoterpenos naturales. La condensación de geranilpirofosfato con una nueva unidad IPP da origen al farnesilpirofosfato, el cual es el precursor de todos los sesquiterpenos naturales.

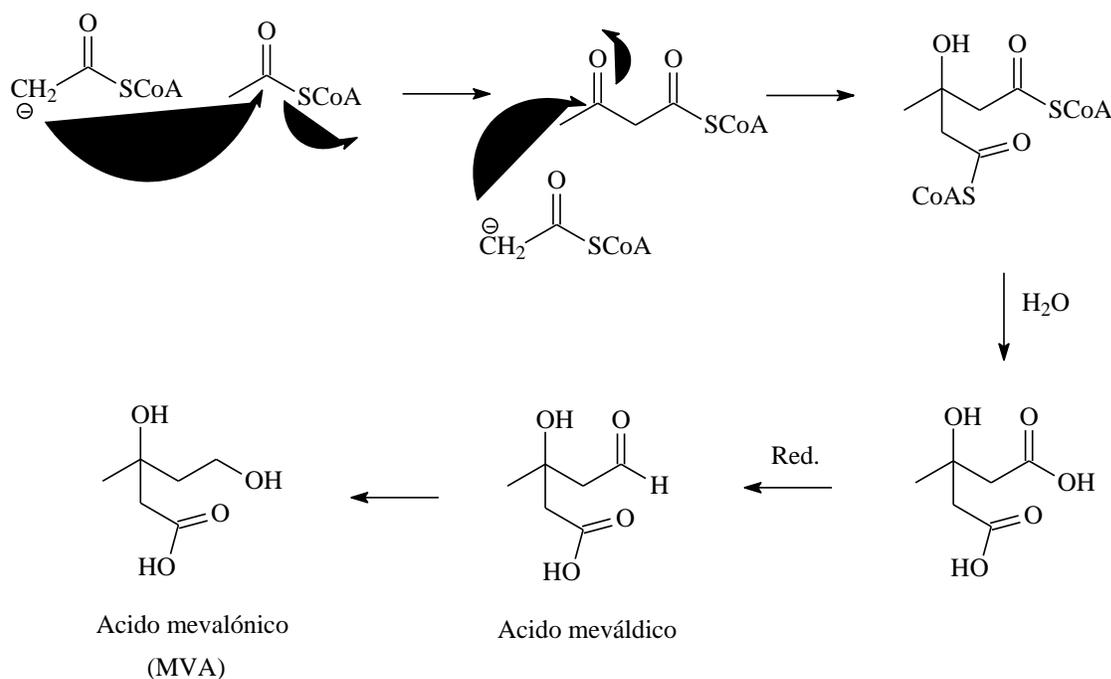


Figura 5.3. Biogénesis del ácido mevalónico.

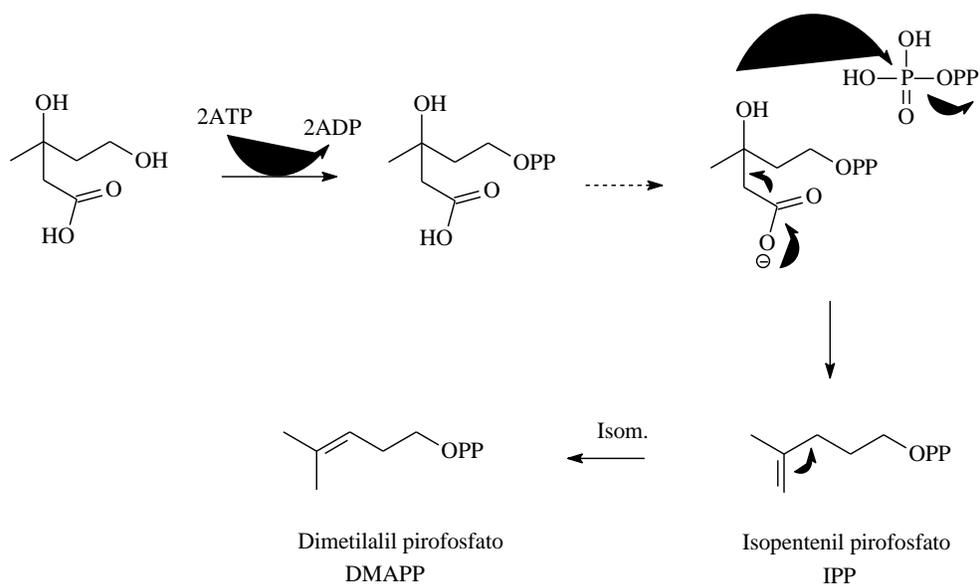


Figura 5.4. Biogénesis de las unidades isoprénicas básicas: Isopentenilpirofosfato (IPP) y γ,γ -Dimetilalilpirofosfato (DMAPP).

Biogénesis de monoterpenos en *Mentha piperita*

La Figura 5.6. esquematiza las relaciones biogénicas entre varios componentes monoterpenoides del aceite esencial de *Mentha piperita*. Nótese como la piperitona puede originarse por tres rutas diferentes.

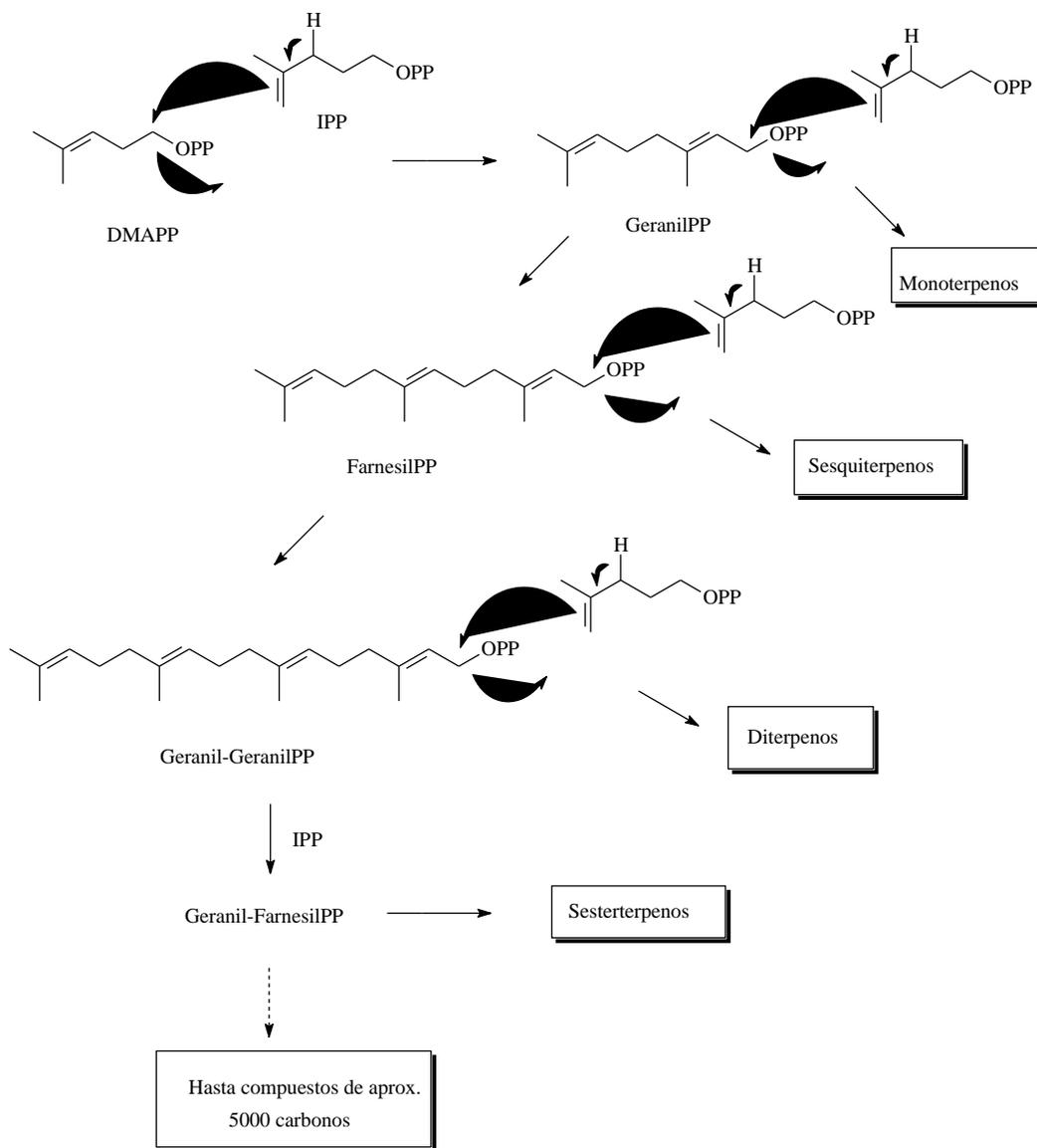


Figura 5.5. Formación biogénica de los terpenoides a partir de IPP y DMAPP.

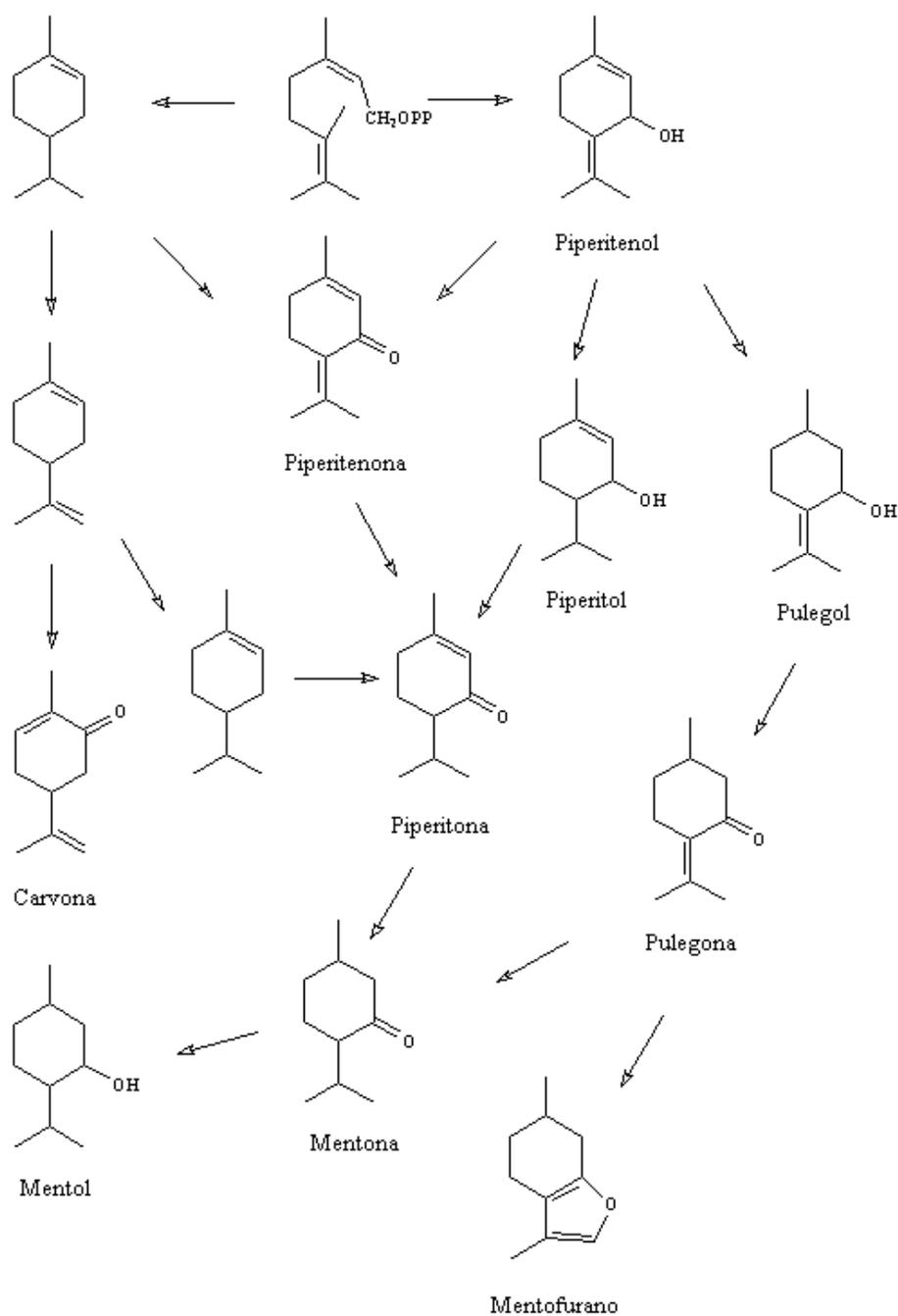


Figura 5.6. Relaciones biogénicas de monoterpenos presentes en el aceite esencial de *Mentha piperita*.

Ejemplos de monoterpenos y sesquiterpenos naturales

La Figura 5.7 muestra varios ejemplos de monoterpenos naturales representantes de varias clases de esqueletos como el mentano, pinano, canfano, etc.

La Figura 5.8 muestra ejemplos de sesquiterpenos naturales con varias clases de esqueletos (bisabolano como el bisaboleno, cadinano como el α -cadineno, etc.)

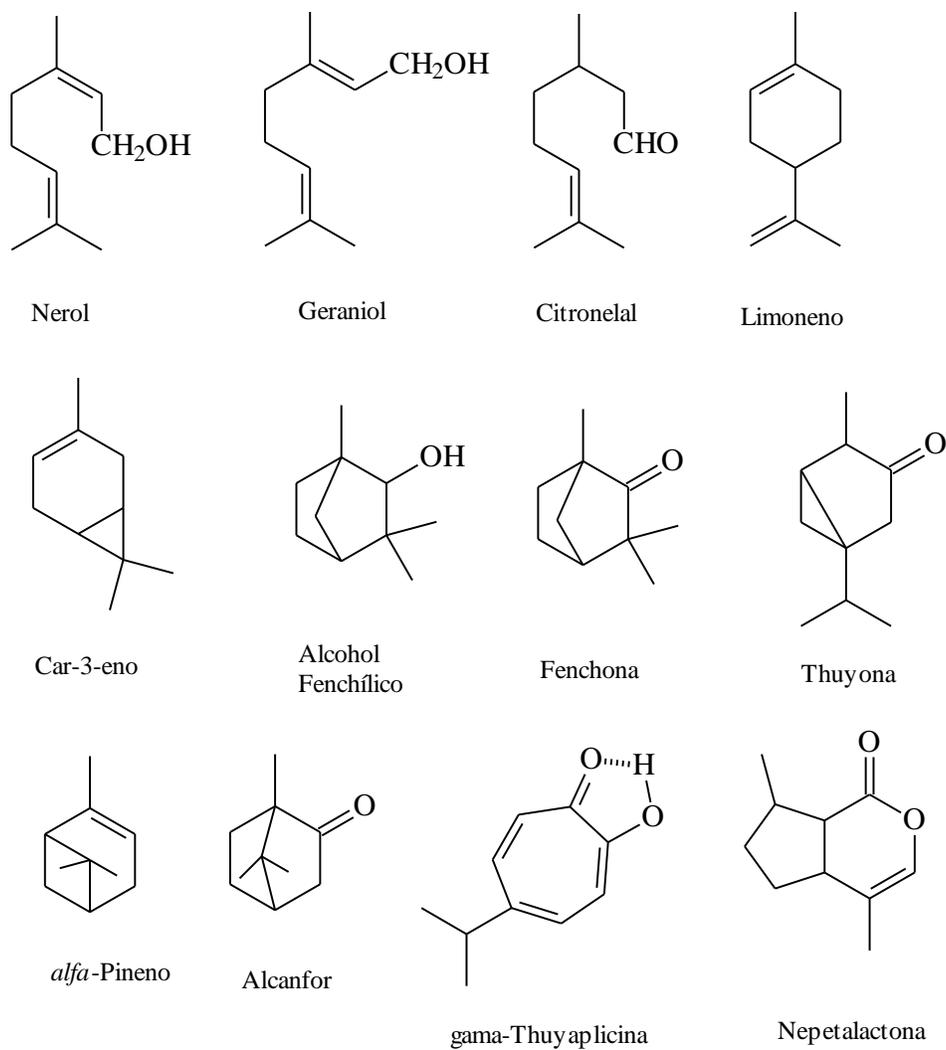
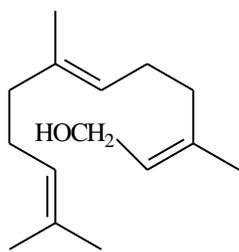
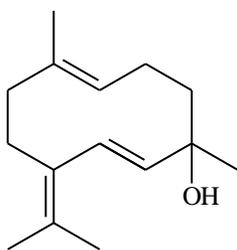


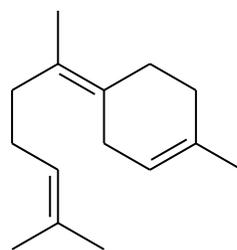
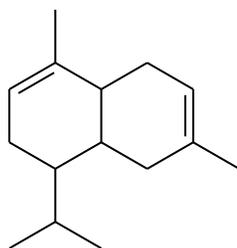
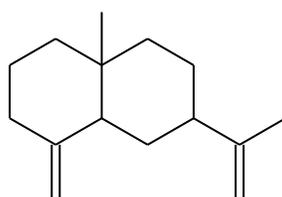
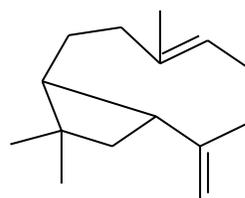
Figura 5.7. Ejemplos de monoterpenos.



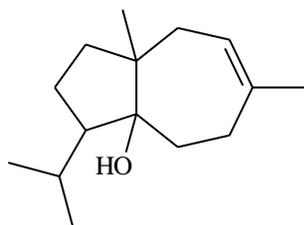
Farnesol



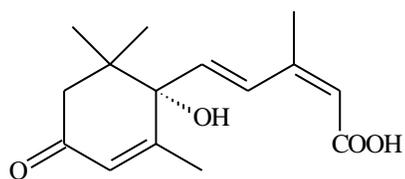
Nerolidol

*gamma*-Bisaboleno*alfa*-Cadineno*beta*-Selineno

Cariofileno



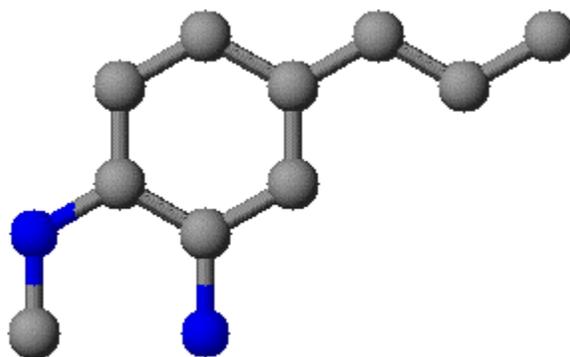
Carotol



Acido abscísico

Figura 5.8. Ejemplos de sesquiterpenos.

Fenilpropanos



Los fenilpropanos son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizadas por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico. La Figura 5.9 muestra varios ejemplos de fenilpropanoides ampliamente distribuidos. Nótese como la cadena lateral puede presentar varios estados de oxidación (grupos metilo, hidroximetileno, aldehído y carboxilo) e insaturación. El anillo aromático generalmente está sustituido en los carbonos 3, 4 y 5, siendo estos sustituyentes grupos hidroxilo, metoxilo o metiléndioxi, principalmente.

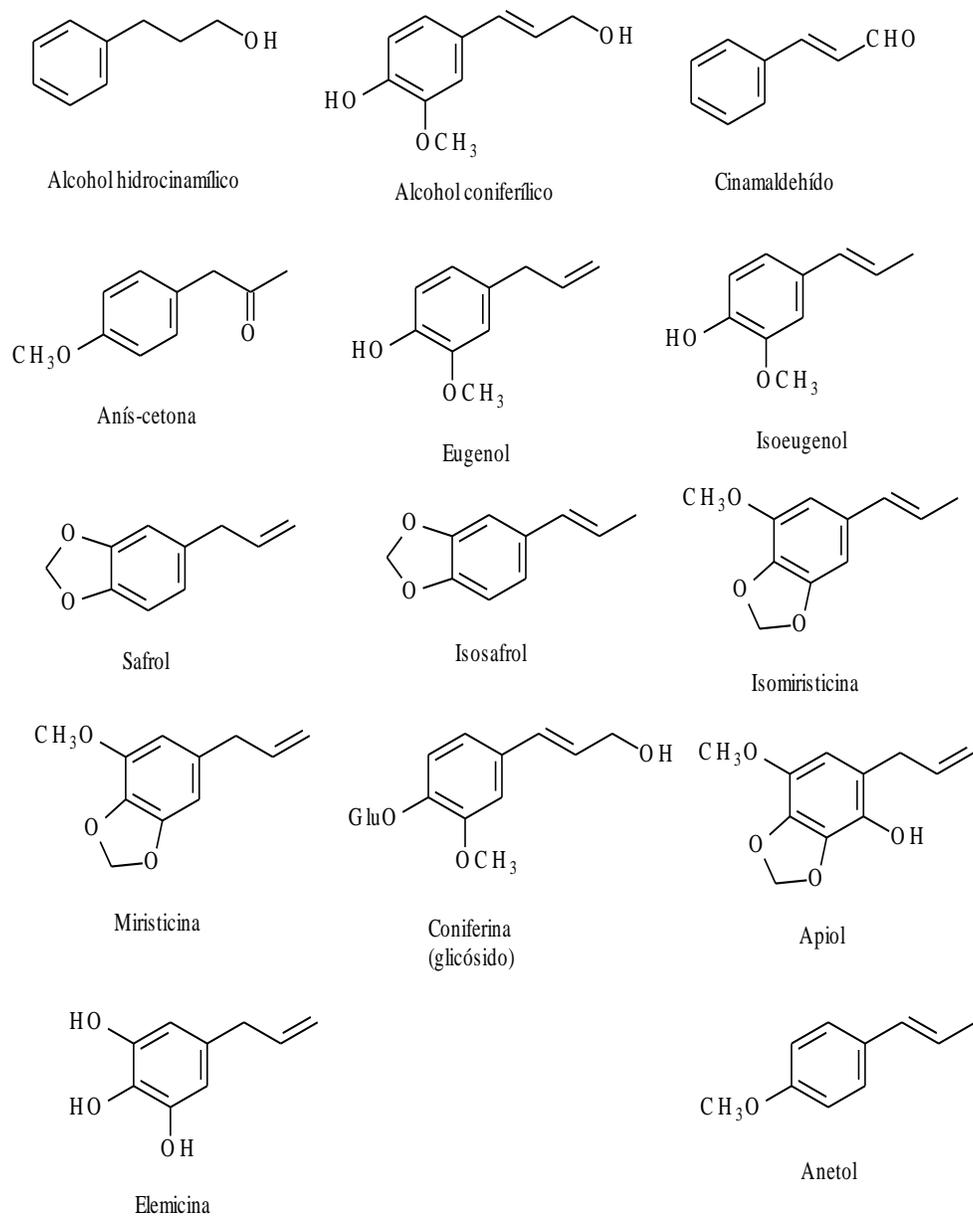


Figura 5.9. Ejemplos de fenilpropanos naturales presentes en aceites esenciales.

Biogénesis de fenilpropanos

Los fenilpropanos presentes en los aceites esenciales se originan biogenéticamente a partir del ácido shikímico, como se describió en el capítulo 2.

Extracción y aislamiento de componentes de aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes, *enfleurage*, con fluidos supercríticos y con solventes eutécticos.

En el método de **expresión**, el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos.

En la **destilación por arrastre con vapor de agua**, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, a la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

En el método de **extracción con solventes**, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Este proceso se hace generalmente mediante un dispositivo Soxhlet, o también con ayuda de un microondas o un equipo de ultrasonido. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles. Esta técnica de extracción es muy utilizada también para la obtención de aceites vegetales ricos en triglicéridos. Sin embargo, es factible el remplazar los solventes orgánicos tóxicos por otros líquidos menos contaminantes y menos riesgosos para la salud y el medio ambiente. Por ejemplo, para la extracción se pueden utilizar mezclas de diferentes proporciones de un aceite vegetal con un solvente orgánico. Esta mezcla tiene al menos tres ventajas sobre el uso de solo solventes orgánicos para la extracción, la primera es que permite disminuir la viscosidad del aceite vegetal, para facilitar el análisis del aceite esencial obtenido. Por otro lado, al tener un punto de ebullición más alto el aceite vegetal, se pueden usar mayores temperaturas para la extracción, lo que favorece la solubilización de los diferentes componentes de los aceites esenciales. Los solventes orgánicos más usados tienen puntos de ebullición más bajos, y no permiten el uso de temperaturas más altas. Adicionalmente, se disminuirían los costos al usar aceites vegetales para remplazar total o parcialmente los solventes orgánicos para la extracción.

En el método de enflorado o *enfleurage*, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es muy usada para la obtención de perfumes florales (rosa, jazmín, azahar, etc.).

El método de **extracción con fluidos supercríticos** es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo, bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones. Actualmente se utiliza en procesos de obtención a nivel industrial.

Además de la extracción con fluidos supercríticos, existen técnicas de extracción novedosas como la extracción asistida por microondas y con ultrasonido. Estos métodos se reconocen como métodos eficientes de extracción, y reducen significativamente los tiempos de extracción, aumentan el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales. Aunque son métodos muy utilizados a nivel de laboratorio, también se utilizan a escala industrial.

Más recientemente se está investigando el uso potencial de los **solventes eutécticos viscosos** (sigla inglesa DES). Un ejemplo de esto es el uso de los líquidos DES preparados con cloruro de colina y alcanodiolos como el propanodiol y el butanodiol. Estos solventes resultan muy ventajosos desde los puntos de vista económico, ambiental y para la salud.

Métodos de separación y análisis

Como se mencionó, la mayoría de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos se encuentran presentes en los aceites esenciales de diversas plantas. A partir de dichos aceites es posible realizar su aislamiento mediante la utilización de uno o varios métodos cromatográficos tales como la cromatografía en columna, en capa fina y HPLC. Para las cromatografías en columna y en capa fina se utiliza ampliamente la sílica gel como fase estacionaria. Como fase móvil se emplean solventes apolares puros o mezclados tales como: Tolueno-acetato de etilo 93:7, y mezclas hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones, una mezcla recomendable es hexano-acetato de etilo 4:1. Es importante mencionar que en la literatura científica se encuentran reportes de casos específicos, en los cuales se utilizan

ciertos solventes para separar componentes de aceites esenciales, este es el caso del 1,3-butanodiol, con el cual se pueden separar el limoneno (terpeno no oxigenado) y el linalool (terpeno oxigenado), mediante un proceso de extracción líquido-líquido.

Los fenilpropanos de aceites esenciales se extraen con la misma metodología descrita anteriormente para mono- y sesquiterpenos. Sin embargo, debido a su anillo aromático presentan ventajas en su detección por CCF y HPLC pues absorben luz ultravioleta (254 nm) y no requieren ser revelados con agentes químicos, ni necesitan ser derivatizados, y por lo tanto pueden aislarse y analizarse más fácilmente.

La técnica de análisis utilizada más ampliamente en el análisis de la composición química de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Sin embargo, también se utilizan técnicas de separación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, y la cromatografía de gases (CG), así como también combinaciones "ON-LINE" HPLC-CG-EM. Estos mismos métodos se utilizan para el análisis de los perfumes florales.

La cromatografía de gases, gracias al desarrollo de columnas capilares de alta resolución permite analizar mezclas complejas presentes en aceites esenciales, e identificar los componentes a partir de los tiempos de retención a través de los denominados Índices de Retención de Kovats (I_k). Estos valores son característicos para cada componente y existen bases de datos con los índices de muchos componentes de aceites esenciales.

Los valores I_k se determinan en dos columnas cromatográficas una polar (por ejemplo, CARBOWAX 20M) y una apolar (por ejemplo, OV-101 también llamada DB-1).

Adicionalmente, la técnica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas, permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Así mismo existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo cual el índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas son criterios para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales, no solo monoterpenos sino también otros tipos de sustancias características de dichos aceites.

Más recientemente se han desarrollado columnas cromatográficas quirales para la separación de componentes ópticamente activos, y se han desarrollado métodos para el análisis combinado HPLC-Espectrometría de Masas y HPLC-RMN de mezclas de sesquiterpenos.

Ensayos de reconocimiento

Debido a la diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en los componentes mono- y sesquiterpénicos de un aceite esencial no existe una prueba específica para su reconocimiento. Sin embargo, existen unos pocos procedimientos experimentales que permiten reconocer algunos de ellos por su coloración con diferentes reactivos, su absorción de luz UV de 254 nm y su Rf en cromatografía en capa fina.

Otros reactivos útiles para revelar monoterpenos y sesquiterpenos son anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina-ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico.

Los monoterpenos y sesquiterpenos en un buen número se pueden caracterizar químicamente a partir de los datos de cromatografía de gases y los espectros de masas tal como se anotó anteriormente, pero cuando existen dudas de tal caracterización se recurre a los métodos espectrales como Infrarrojo, Ultravioleta y Resonancia Magnética Nuclear.

Espectroscopia infrarrojo

El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C cis y trans, etc. Para determinar el espectro basta con colocar una gota del componente en una celda de NaCl. Por ejemplo, en el espectro infrarrojo del 3-p-menten-7-al presente en el aceite de comino. La banda intensa en 1725 cm^{-1} indica un grupo carbonilo no conjugado. La banda a 2710 cm^{-1} se asigna a la tensión C-H de un protón aldehídico. El doblete centrado en 1375 cm^{-1} indica un grupo isopropilo, y la banda de intensidad media en 817 cm^{-1} indica un enlace doble trisustituído.

Para el caso de los fenilpropanos, y por tratarse de sustancias con anillo aromático, sus espectros infrarrojos muestran las señales características de estos compuestos y dan información sobre el tipo de sustitución del anillo aromático además de los grupos funcionales presentes en la molécula. Por ejemplo, el espectro IR del eugenol muestra entre otras bandas en 3500 (ancha) debida al grupo hidroxilo, 1510 característica de aromáticos, y tres bandas en 990, 920 y 938 cm^{-1} características de un grupo vinilo mono sustituido. El espectro IR del cinamaldehído muestra bandas en 3330 (débil), 3050, 2820, 2750, 1660 (intensa, debida al grupo carbonilo), 975, 740 y 695 cm^{-1} entre otras.

Espectroscopia ultravioleta

El espectro UV de los monoterpenos y sesquiterpenos permite el reconocimiento de grupos funcionales y grupos cromóforos. Por ejemplo, el limoneno presenta un máximo de absorción en 262 nm.

A diferencia de la mayoría de mono- y sesquiterpenos, los fenilpropanos absorben luz UV con máximos alrededor de 254 nm dependiendo de los grupos cromóforos presentes en la

molécula. Por ejemplo, el isoeugenol muestra máximos en 260 (15850) y 305 (7000), el safrol en 286 nm, la miristicina en 276 nm, el isosafrol en 264 nm, el ácido trans-cinámico en 273 nm y el ácido cis-cinámico en 264 nm.

Resonancia Magnética Nuclear

Gracias a los desarrollos de la RMN se cuenta con bases de datos de los espectros, especialmente de RMN-¹³C para los monoterpenos y sesquiterpenos más distribuidos. Además, con el desarrollo de software comercial para la predicción de los espectros de RMN, se cuenta ya con herramientas muy útiles en la asignación estructural de compuestos como monoterpenos y sesquiterpenos, y de todos los metabolitos secundarios en general. A continuación, se presentan como referencia los desplazamientos químicos de los carbonos de varios monoterpenos como son: geraniol, linalool, mirceno, *cis*-citral, *trans*-citral, mentano, mentol, α -terpineol, α -pineno, β -pineno, limoneno, carvona, cineol, alcanfor, α -terpineno y pulegona; y varios sesquiterpenos como: Farnesol, β -bisaboleno, *trans*-retinal, 9-*cis*-retinal y 11-*cis*-retinal.

Los espectros de RMN-¹H de los fenilpropanos muestran señales de protones aromáticos alrededor de 6-8 ppm cuyas multiplicidades y constantes de acoplamiento permiten realizar una asignación estructural clara aún con espectros de baja resolución. En el espectro RMN-¹H del anetol, se aprecia una señal doblete alrededor de 1.9 ppm debida a los protones del grupo metilo, un singlete en 3.9 debido a los protones del grupo metoxilo, una señal compleja alrededor de 6.1 ppm debida a los dos protones olefínicos en disposición trans entre sí, y un doblete alrededor de 6.9 ppm característico de los 4 protones de un anillo aromático p-di sustituido.

Los espectros de RMN-¹³C son muy útiles para la asignación estructural de los componentes de aceites esenciales. Las figuras 5.10 y 5.11 muestran los desplazamientos químicos de las señales de los carbonos de varios ejemplos estructurales comunes de mono- y sesquiterpenos.

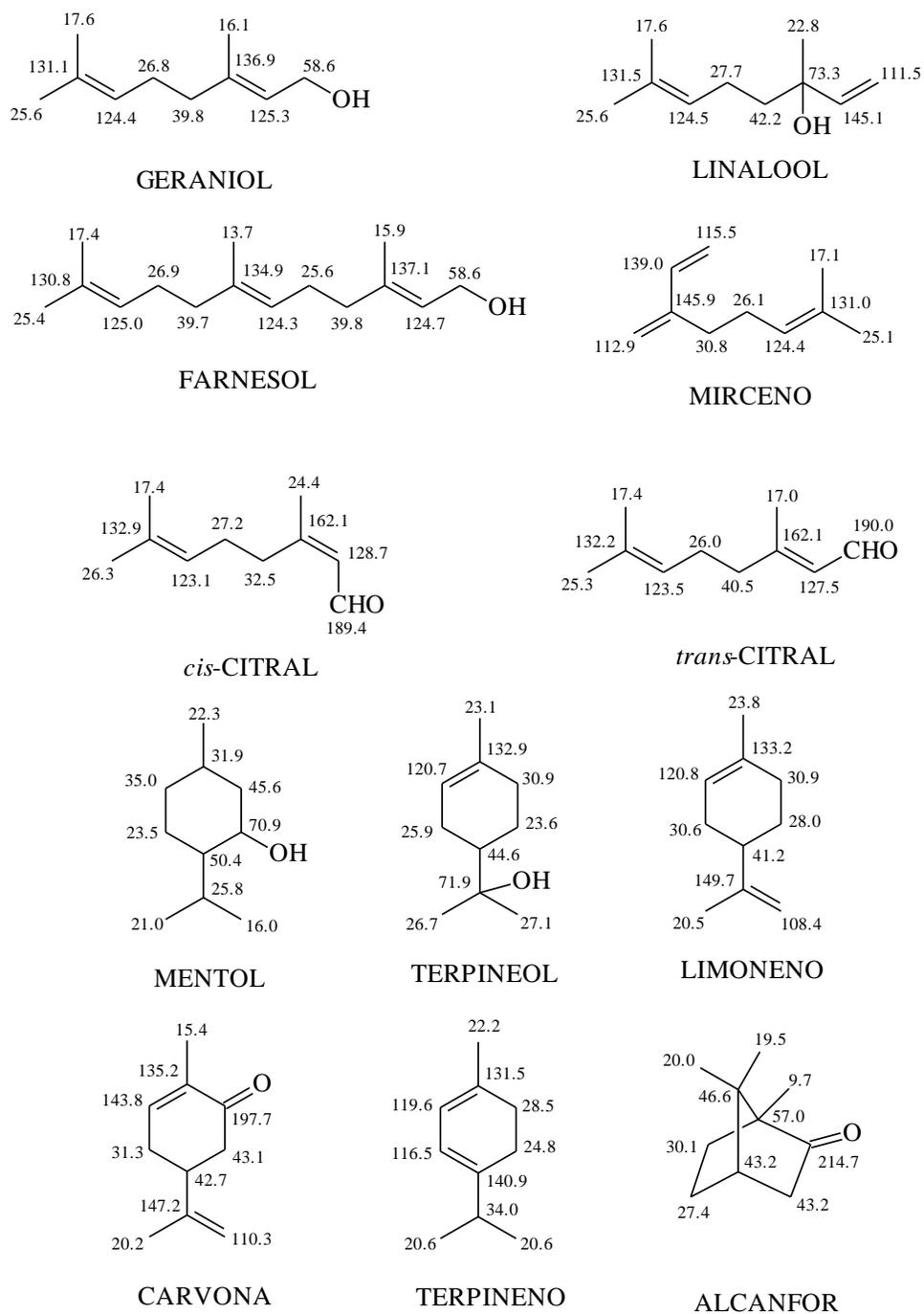


Figura 5.10. Desplazamientos químicos (ppm) de varios mono- y sesquiterpenos.

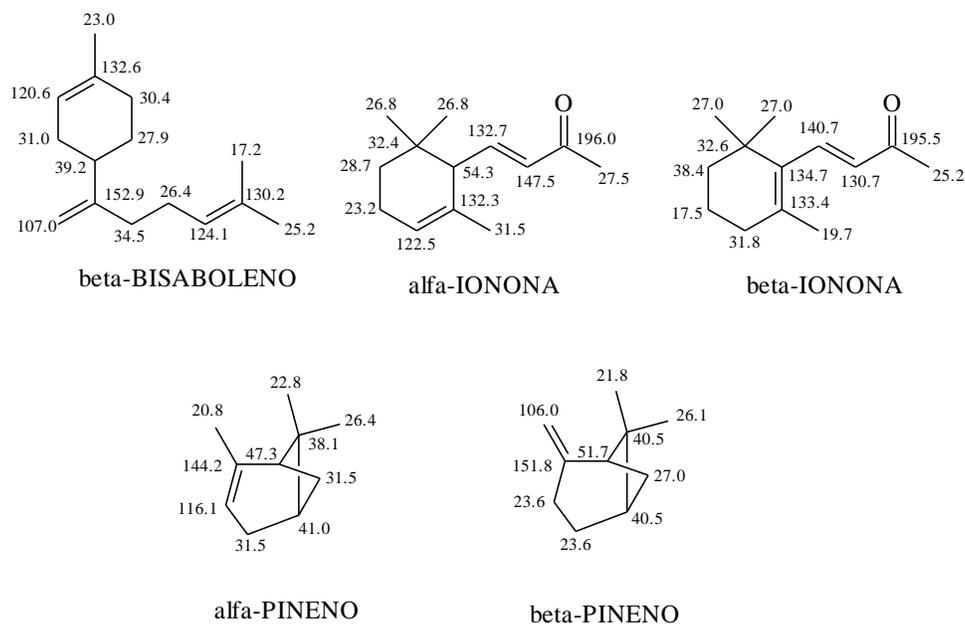


Figura 5.11. Desplazamientos químicos (ppm) de varios mono- y sesquiterpenos.

A manera de ejemplo de la utilidad de los softwares predictores de RMN, se presentan a continuación en la figura 5.12. los desplazamientos químicos en ppm para el limoneno reportado en la literatura, el calculado con el software predictor ACD labs/CNMR®, y el calculado con la herramienta en línea nmrdb.org:

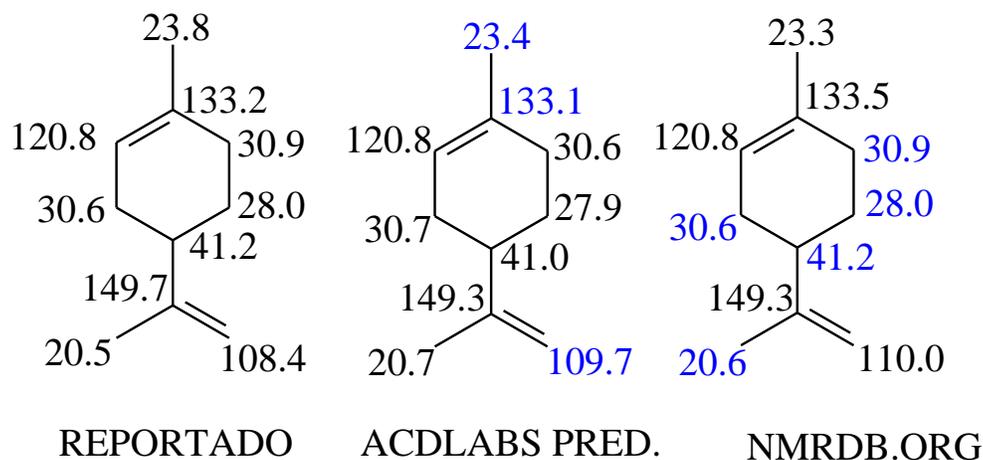


Figura 5.12. Valores de desplazamientos químicos de las señales de carbono-13 del limoneno, reportados y calculados con software predictor.

Adicionalmente, el desarrollo reciente de los métodos bidimensionales homo- y heteronucleares, ha permitido la determinación estructural fina de los terpenoides y demás sustancias naturales, eliminando la ambigüedad en la asignación de las señales observadas.

Espectrometría de Masas

Como se mencionó anteriormente, para determinar la composición de los aceites esenciales, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, el método más usado es la combinación de las técnicas instrumentales de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Además, los instrumentos disponibles cuentan con acceso a bases de datos extensas que incluyen los espectros de masas de muchos de los componentes presentes, por lo cual el análisis es automatizado y muy preciso. La figura 5.13, muestra los iones característicos del espectro de masas de impacto electrónico del compuesto *p*-cimen-8-ol, el cual está presente en la corteza de *Bursera schlechtendalii*, a la cual se le da uso popular como calmante.

Más recientemente, con el uso de los métodos quimiométricos, con los cuales es posible extraer más información de los datos experimentales, por ejemplo, el procesamiento de las señales de los cromatogramas en dos y tres dimensiones obtenidos. Con estos métodos es posible detectar e identificar más componentes en una mezcla, por ejemplo cuando hay solapamiento de señales.

Debido también a su anillo aromático, los fenilpropanos presentan espectros de masas con iones moleculares intensos, lo que facilita la determinación de su peso molecular.

En el caso de compuestos con grupos carboxilo e hidroxilo es conveniente derivatizarlos para obtener sustancias más volatilizables y térmicamente más estables, ya que esto facilita por ejemplo su análisis en mezclas mediante la Cromatografía de Gases o la combinación Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas.

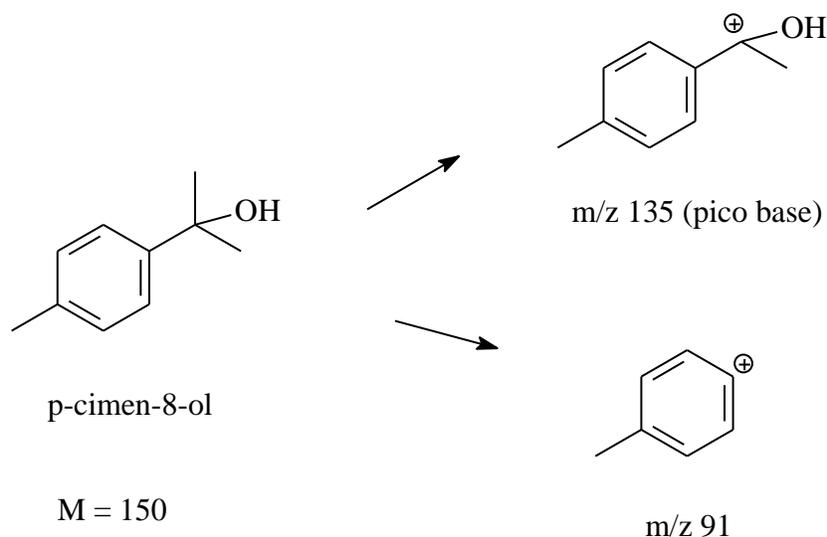


Figura 5.13. Esquema de fragmentación en espectrometría de masas de impacto electrónico del *p*-cimen-8-ol.

Ejemplos de drogas vegetales que contienen aceites esenciales

Alcanfor

El alcanfor es obtenido de la corteza de *Cinnamomum camphora* L., nativo de Asia. Se ha usado ampliamente como analgésico, antiséptico, antiprurítico, estimulante, abortifaciente, y como supresor de lactancia. Se usa como ingrediente activo en ungüentos e inhalantes para tratar resfriados y dolor muscular. Su aplicación en la piel produce sensación de calor. Se reporta su toxicidad por ingestión accidental o mala administración. Se absorbe rápidamente a nivel intestinal y produce irritación, dolor abdominal, náuseas, y convulsiones.

Albahaca

El aceite de albahaca se obtiene de *Ocimum basilicum* y ha sido utilizado en la medicina tradicional como un estimulante del sistema nervioso central y para el tratamiento de desórdenes nerviosos menores, dolor de cabeza y dolores musculares. Es de gran valor en estados de ansiedad, ya que se dice que clarifica y fortalece la mente.

Es un repelente de insectos y suaviza las picaduras. Tiene actividad antimicrobiana a bajas diluciones. En ensayos realizados en la India mostró buenos resultados en el tratamiento antibacterial del acné. También se usa como enjuague bucal contra el mal aliento. En las zonas rurales africanas se usa una infusión de las hojas para tratar las quemaduras causadas por el sol.

Las plantas del género *Ocimum*, presentan potencial para el tratamiento de hiperglicemias, posiblemente debido a la presencia del eugenol, inclusive se ha incorporado extractos acuosos de estas plantas en nanopartículas de plata, con resultados interesantes de potencial anti diabetes. El aceite de la especie *Ocimum gratissimum*, muestra también propiedades anti leishmaniasis.

Anís

Las semillas de *Pimpinella anisum* L. contienen aceite esencial cuyo componente principal es el *trans*-anetol y presenta actividad insecticida.

A nivel farmacéutico, la semilla de anís se usa como resaltador del sabor de preparados medicinales. La Farmacopea Europea determina que la droga debe contener 2% de aceite esencial, el cual contiene de 75-95% de *trans*-anetol. El aceite contiene además cantidades menores de metilchavicol, *p*-anisaldehído, γ -himacaleno, α -zingibereno, *trans*-2-metilbutirato de pseudoisoeugenol y 2-metilbutirato de epoxipseudoeugenilo.

Se tienen reportes del aceite esencial como carminativo, antiséptico, diurético, y digestivo. En la medicina popular se usa para el insomnio y la constipación. El aceite incrementa la resistencia pulmonar en eventos de congestión broncopulmonar. También presenta efectos

antifúngicos y antibacteriales. El trans-anetol incrementa la movilidad intestinal. El extracto acuoso de semillas de anís también muestra actividad citotóxica contra células de melanoma.

Bergamota

Citrus bergamia, es una fruta típica que abunda en la región de Calabria (Italia). Es conocida como una fuente importante de flavonoides y limonoides. Se ha reportado el uso potencial del jugo de la fruta en la terapia contra la artritis, y para dislipidemias.

Buchú

Corresponde al aceite obtenido de *Agathosma betulina* que tiene no solo una fragancia agradable, sino que es de importancia cosmética para la piel. Se han realizado diferentes estudios que muestran que los extractos y el aceite esencial presentan buena actividad antimicrobiana contra varios patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. También se reporta que presenta buena actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias. Por cromatografía en capa fina de alta resolución se puede diferenciar esta especie de otras del mismo género.

Canela

La droga corresponde a la corteza desecada de *Cinnamomum zeylanicum*, Laurácea. El aceite esencial contiene cinamaldehído y eugenol entre otros. El aceite esencial de la especie relacionada *Cinnamomum cassia*, junto con el de timo han mostrado potencial uso contra el hongo *Aspergillus flavus*, el cual es conocido por producir sustancias cancerígenas.

Cardamomo

Corresponde al aceite obtenido de las semillas de *Elettaria cardamomum*, el cual ayuda a la digestión y estimula el apetito. Se le atribuyen propiedades afrodisíacas y que ayuda a aclarar la mente de ruido y confusión. El extracto metanólico de las semillas de esta planta presenta potencial como ansiolítico.

Cidrón

Corresponde a *Aloysia citriodora* (sinónimo *Lippia citriodora*), además del uso como aromatizante de la esencia de esta planta se ha evaluado su uso como insecticida, junto a otros aceites esenciales.

Cilantro

Corresponde a *Coriandrum sativum* L. Las hojas y tallos de esta planta han mostrado actividad larvicida sobre *Aedes aegypti*. Se reporta también que las hojas frescas pueden ser útiles para el manejo de la enfermedad de Alzheimer, para disminuir los niveles de colesterol en sangre y su actividad anticolinesterasa. Además de su uso como aromatizante, las hojas y tallos presentan propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas.

Clavo

El clavo *Syzigium aromaticum* L. tiene un gran potencial como preservativo de alimentos especialmente contra bacterias patogénicas. El clavo comercial son las flores secas, que se usan ampliamente como condimento o especial en muchos alimentos y aplicaciones farmacéuticas. El aceite esencial se usa para el cuidado dental. Es activo contra bacterias asociadas a las caries dentales y la enfermedad periodontal. También es activo contra bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, y *Staphylococcus aureus*. También se reportan estudios sobre actividades antifúngica, antialérgica, anti cáncer, anti mutagénica y contra *Tripanosoma cruzi*.

Comino

Corresponde a las semillas de *Cuminum cyminum* L., de la familia de las umbelíferas. Su aceite esencial contiene α -pineno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, α -terpineno, limoneno, β -felandreno, 1,8-cineol, p-cimeno, γ -terpineno, 3-p-menten-7-al, mirtenal, cuminaldehído, felandral, 1,3-p-mentadien-7-al, cis-sabineno hidrato, trans-sabineno hidrato, α -terpineol, alcohol cumínico, β -cariofileno, β -farneseno y β -bisaboleno.

Se ha reportado que el cuminaldehído tiene efectos protectores sobre la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson. También se reportan estudios *in vivo* e *in vitro* de la actividad anticancerígena potencial del aceite esencial. La actividad antioxidante está relacionada con los flavonoides presentes en la planta. También se mencionan propiedades anti diabéticas, anti hipertensivas, inmuno modulatorias y anti candidiasis del aceite.

Hierba de limón

Corresponde a *Cymbopogon citratus*. Se han reportado propiedades antimicrobianas y anti inflamatorias, por lo cual se elaboran productos para uso tópico en el tratamiento de lesiones de la piel y de las mucosas. El extracto de la planta entera, presenta potencial actividad antimalárica.

Eucalipto

En las diferentes especies del género *Eucalyptus*, el aceite esencial contiene como componente mayoritario al 1,8-cineol. Este compuesto presenta propiedades interesantes como por ejemplo protección contra el virus de influenza. También se usa como remedio analgésico y antipirético contra la gripa, el resfriado y la congestión nasal.

Jengibre

Corresponde a *Zingiber officinalis*. El rizoma de esta planta es usado ampliamente como condimento. El aceite esencial contiene sesquiterpenos, compuestos carbonílicos, alcoholes,

monoterpenos, los cuales contribuyen al aroma y sabor del jengibre. El extracto de jengibre también se utiliza ampliamente como medicina herbaria, con propiedades anti inflamatorias, anti cancerosas, y antimicrobianas. El efecto saludable del jengibre se atribuye a la presencia de metabolitos secundarios que reducen los niveles de colesterol en el plasma sanguíneo, en el hígado, y en la placa aterosclerótica de la aorta. Además, los compuestos tales como los gingeroles, shogaoles, paradoles y la zingerona, presentan actividad antioxidante.

Lavanda

El aceite esencial de *Lavandula angustifolia* contiene 1,8-cineol, cis- β -ocimeno, linalool, acetato de 1-octen-3-ilo, alcanfor, linalool, acetato de linalilo y acetato de lavandulilo. La planta es ampliamente conocida como medicina herbaria por sus propiedades antioxidantes, anti fúngicas, bactericidas, citotóxicas, antisépticas, anti inflamatorias y analgésicas.

El aceite de lavanda está aprobado por la Agencia de Medicinas Europea EMA como una hierba medicinal contra el estrés y la ansiedad. La acción ansiolítica del linalool ha sido comparada a la producida por el valium™.

Matricaria

Corresponde a *Matricaria chamomilla*. Es una droga vegetal de aplicación medicinal amplia, principalmente por sus propiedades anti inflamatorias, antisépticas, y antiespasmódicas. Se aplica en campos como la dermatología, otorrinolaringología, gastro enterología, neumología, pediatría y radioterapia. El aceite esencial contiene como componentes mayoritarios óxidos de bisabolol A y B, óxido de bisabolona A, y camazuleno.

Menta

Entre las diferentes especies, *Mentha piperita* contiene un aceite esencial que se utiliza para saborizar alimentos y bebidas. Este aceite ha demostrado resultados prometedores para inhibir hongos patógenos, como los que afectan productos post cosecha. Los compuestos comúnmente encontrados incluyen el mentol, eucaliptol, acetato de mentilo y limoneno. Este aceite es reconocido para uso seguro y de bajo riesgo para los consumidores.

Naranja

El aceite de la cáscara de naranja *Citrus aurantium*, y de otras especies del mismo género, contienen citral, α -terpineol, citronelal, geraniol, y linalool. En general los aceites esenciales de diferentes especies de *Citrus* se reconocen por sus propiedades ansiolíticas. El extracto de las flores de esta planta presenta propiedades anti inflamatorias y anti complemento.

Orégano

Corresponde a *Origanum vulgare*, Labiatae, su aceite esencial contiene principalmente sabineno, β -cariofileno, espatulenol, γ -eudesmol, germacreno-D, p-cimeno, terpinén-4-ol, entre otros. El aceite presenta propiedades anti bacterianas.

Perejil

El aceite esencial de *Petroselinum crispum*, contiene miristicina, apiol, α - y β -pineno y limoneno entre otros. El apiol, que es uno de los más abundantes, es considerado de riesgo cancerígeno y genotóxico, pero menos que su similar el safrol.

Pino

Existen alrededor 115 especies de pinos, género *Pinus*, familia Pináceas. Los pinos son conocidos por el uso de su madera y por sus aceites esenciales característicos. La especie *Pinus nigra* contiene en su aceite esencial α -cadinol, óxido de manool, germacreno-D, E-cariofileno, limoneno, α -terpineol, α -pineno, entre otros. Pero la composición química del aceite varía de especie a especie y de acuerdo a la ubicación geográfica.

Ruda

La planta *Ruta graveolens* ha mostrado actividades biológicas que incluyen: antihelmíntica, abortiva, antiparasitaria, antiinflamatoria, antidiarreica, anti-reumática, antifebril, anti ulcera, repelente, antidiabética y antimicrobiana. Dos compuestos cetónicos constituyen el 80% del aceite esencial: 2-undecanona y 2-nonanona.

Salvia

Salvia officinalis es una muy conocida hierba aromática utilizada como té. Se reconoce su uso para el tratamiento de resfriados y enfermedades bronquiales. También se ha encontrado que sus extractos tienen propiedades antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y antidiabética. Los metabolitos más abundantes incluyen los monoterpenos β -tuyona, 1,8-cineol, y alcanfor, los cuales se usan como agentes antimicrobianos.

Sándalo

El sándalo como ocurre con otros aceites esenciales corresponde a las esencias de varias especies de planta del género *Santalum*. La esencia de sándalo contiene como componentes principales al α - y β -santalol. Al evaluar la acción hipoglucémica *in vivo*, tanto del aceite como del α -santalol, se encuentra evidencias de sinergismo con los otros componentes del aceite. Los otros componentes incluyen: cis y α -trans-bergamotol, cis-epi- β -santalol, cis-lanceol, cis-nuciferal, β -santaleno, entre otros. También se ha reportado su potencial para la curación de heridas. También se reporta que α -santalol y el aceite entero tienen acción potencial contra cáncer e infecciones por hongos en la piel.

Toronjil

Melissa officinalis ha sido utilizada desde hace mucho tiempo por sus propiedades sedativas, digestivas, analgésicas, antibacteriales, antivirales y antioxidantes.

Esta planta ha sido utilizada ampliamente como fragancia para vino, té y cerveza, y como planta medicinal contra diferentes enfermedades como desórdenes gastrointestinales y nerviosos, y contra el reumatismo, especialmente en Europa. El eugenol presente en su aceite esencial tiene actividad antiespasmolítica, y una fracción de taninos presentó actividad antiviral.

La esencia contiene principalmente limoneno, β -citronelal, β -citral, α -citral, cariofileno y germacreno-D, y muestra potencial para uso contra diabetes. Es importante recordar que la composición química del aceite es variable dependiendo del sitio de recolección, por ejemplo una muestra recolectada en Marruecos, contiene entre sus componentes mayoritarios el acetato de geranilo, y presentó actividad contra diferentes microorganismos.

Yerba mate

Corresponde a las hojas del *Ilex paraguayensis*, Fam. aquifoliaceae. En la fracción arrastrada por destilación con vapor de agua se identificaron entre otros: linalool, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, geraniol, nerolidol, geranilacetona y eugenol, siendo el nerolidol activo contra la bacteria *Streptococcus mutans* causante de las caries dentales.

Ylang-Ylang

La planta denominada Ylang-ylang corresponde a *Cananga odorata*, y es nativa del sur de Asia. Se reportan usos para dolor abdominal, curación de heridas, recuperación postparto, diarrea, malaria y dolor en la espalda. También se usa su esencia como antidepresivo y contra la menopausia. Entre los componentes de la esencia se han reportado: acetato de benzoato de metilo, éter metílico de p-cresol, acetato de 3-metil-2-butén-1-ilo, entre otros.

Referencias bibliográficas

1. Wang HF, Yih KH, Yang CH, Huang KF. Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. J. Food Drug. Anal. 2017; 1 -9.
2. Fornasari CH, Secco D, Ferreira Santos R, da Silva TRB, Gurgacz F. Efficiency of the use of solvents in vegetable oil extraction at oleaginous crops. Renew. Sustain. Energy Rev. 2017; 80: 121–124.

3. Martin L, Skinner C, Marriott RJ. Supercritical extraction of oil seed rape: Energetic evaluation of process scale. *J. Supercrit. Fluids* 2015; 105: 55–59.
4. Stratakos AC, Koidis A, Chapter 4: Methods for Extracting Essential Oils Essential Oils in Food Preservation. *Flavor Saf.* 2016: 31-38.
5. Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017; 34: 540–560.
6. Ye L, Ly X, Yu H. Engineering microbes for isoprene production *Metab. Engin.* 2016; 38: 125-138.
7. Wagner H., Bladt S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* 2nd ed. 1996. Second printing 2009 Edition, Springer.
8. Vatanparast J, Andalib-Lari F. Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation. *NeuroToxicology* 2017, 60: 299–307.
9. Adiba Antora R, Mohd Salleh R. Antihyperglycemic effect of *Ocimum* plants: A short review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2017; 7: 755–759.
10. Le TB, Beaufay C, Nghiem DT, Mingeot-Leclercq MP, Quetin-Leclercq J. In Vitro Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Vietnamese Plants. *Molecules* 2017; 22: 1071.
11. Malapermal V, Botha I, Babu S, Krishna N, Mbatha JN Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) using silver nanoparticles. *Saudi J. Biol. Sci.* 2017; 24: 1294–1305.
12. Iannarellia R, Capriolia G, Sutb S, Dall’Acquab S, Fiorinic D, Vittoria S, Maggi F. Valorizing overlooked local crops in the era of globalization: the case of aniseed (*Pimpinella anisum* L.) from Castignano (central Italy). *Ind. Crops Prod.* 2017; 104: 99–110.
13. Andallu B, Rajeshwari CU. Aniseeds (*Pimpinella anisum* L.) in Health and Disease. *Nuts Seeds Health Dis. Prev.* 2011: 175-181.
14. Marino A., Paterniti I, Cordaro M, Morabito R, Campolo M, Navarra M, *et al.* Role of natural antioxidants and potential use of bergamot in treating rheumatoid arthritis. *PharmaNutrition* 2015; 3: 53–59.
15. Giglio RV, Patti AM, Nikolic D, Li Volti G, Al-Rasadi K, Katsiki N. *et al.* The effect of bergamot on dyslipidemia. *Phytomedicine* 2016: 23: 1175–1181.

16. Mavimbela T, Viljoen A, Vermaak I. Differentiating between *Agathosma betulina* and *Agathosma crenulata* – A quality control perspective. *J. Appl. Res. Med. Arom. Plants* 2014; 1: e8–e14.
17. Pekmezovic M, Rajkovic K, Barac A, Senerovic L, Arsenijevic VA Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochem. Eng. J.* 2015; 99: 131–137.
18. Masoumi-Ardakani Y, Mahmoudvand H, Mirzaei A, Esmaeilpour K, Ghazvini H, Khalifeh S, Sepehri G. The effect of *Elettaria cardamomum* extract on anxiety-like behavior in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 87: 489–495.
19. Benelli G, Pavela R, Canale A, Cianfaglione K, Ciaschetti G, Conti F. *et al.* Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitol. Intern.* 2017; 66: 166–171.
20. Elemike EE, Onwudiwe DC, Ekennia AC, Ehiri RC, Nnaji NJ. Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations. *Mat. Sci. Engin. C* 2017; 75: 980–989.
21. Pirbalouti AG, Salehi S, Craker L. Effect of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil from the aerial parts of coriander. *J. Appl. Res. Med. Arom. Plants* 2017; 4: 35–40.
22. El-Maati MFA, Mahgoub SA, Labib SM, Al-Gaby AMA, Ramadana MF. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *Eur. J. Integr. Med.* 2016; 8: 494–504.
23. Zanusso Junior G, Massago M, Teston APM, Morey AT, Toledo MJO. Efficacy of some essential oils in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trop. J. Pharm. Res.* 2017; 16 (6): 1307-1316.
24. Taghizadeh M, Ostad SN, Asemi Z, Mahboubi M, Hejazi S, Sharafati-Chaleshtori R. Sub-chronic oral toxicity of *Cuminum cyminum* L.'s essential oil in female Wistar rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2017; 88: 138-143.
25. Minoeianhaghighi MH, Sepehrian L, Shokri H. Antifungal effects of *Lavandula binaludensis* and *Cuminum cyminum* essential oils against *Candida albicans* strains isolated from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J. Mycol. Méd.* 2017; 27: 65—71.

26. Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Usai D, Liakos I, Garzoni A. A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2017; 152: 385–392.
27. Chukwuocha UM, Fernández-Rivera O, Legorreta-Herrera M. Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. *J. Ethnopharmacol.* 2016; 193: 517–523.
28. Li Y, Xu Y, Lai Y, Liao S, Liu N, Xu P. Intranasal co-administration of 1,8-cineole with influenza vaccine provide cross-protection against influenza virus infection. *Phytomedicine* 2017; 34: 127-135.
29. Khaw KY, Parat MO, Shaw PN, Falconer JR. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules* 2017; 22: 1186.
30. Si W, Chen YP, Zhang J, Chen ZY, Chung HY. Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids. *Food Chem.* 2018; 239: 1117–1125.
31. Beale DJ, Morrison PD, Karpe AV, Dunn MS. Chemometric Analysis of Lavender Essential Oils Using Targeted and Untargeted GC-MS Acquired Data for the Rapid Identification and Characterization of Oil Quality. *Molecules* 2017; 22: 1339.
32. Rashed MMA, Tong Q, Nagi A, Li JP, Khan NU, Chen L. *et al.* Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities. *Ind. Crops Prod.* 2017; 100: 236–245.
33. López V, Nielsen B, Solas M, Ramírez MJ, Jäger AK. Exploring Pharmacological Mechanisms of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Central Nervous System Targets. *Front. Pharmacol.* 2017; 8, Article 280.
34. Molnar M, Mendešević N, Šubarić D, Banjari I, Jokić S. I. Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. *Chem. Cent. J.* 2017; 11:78.
35. Hashempur MH, Ghasemi MS, Daneshfard B, Ghoreishi PS, Lari ZN, Homayouni K, Zargaran A. Efficacy of topical chamomile oil for mild and moderate carpal tunnel syndrome: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complem.Ther. Clin. Pract.* 2017; 26: 61-67.
36. Rima de Oliveira KA, Ramos Berger LR, de Araújo SA, Saraiva Camara MP, de Souza EL. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit

- Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. Food Microbiol. 2017; 66: 96-103.
37. De Sousa DP, Soares Hocayen PA, Nalone Andrade L, Andreatini R. A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. Molecules 2015; 20: 18620-18660.
 38. Shen CY, Jiang JG, Huang CL, Zhu A, Zheng CY. Polyphenols from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. amara Engl. show significant anti-complement and anti-inflammatory effects. J. Agric. Food Chem. 2017; 65: 9061-9068.
 39. De Falco E, Mancini E, Roscigno G, Mignola E, Tagliatela-Scafati O, Senatore F. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. vulgare L. under Different Growth Conditions. Molecules 2013; 18: 14948-14960.
 40. Marín I, Sayas-Barberá E, Viuda-Martos M, Navarro C. Sendra E. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain. Foods 2016; 5: 18.
 41. El-Zaedi H, Martínez-Tomé J, Calín-Sánchez A, Burló F, Carbonell-Barrachina AA. Volatile Composition of Essential Oils from Different Aromatic Herbs Grown in Mediterranean Regions of Spain. Foods 2016; 5: 41.
 42. Alajlouni AM, Malahmeh AJA, Kiwamoto R, Wesseling S, Soffers AEMF, Al-Subeihi AAA. *et al.*, Mode of action based risk assessment of the botanical food-borne alkenylbenzene apiol from parsley using physiologically based kinetic (PBK) modelling and read-across from safrole. Food Chem. Toxicol. 2016; 89: 138-150.
 43. Amri I, Hanana M, Jamoussi B, Hamrouni L. Essential oils of *Pinus nigra* J.F. Arnold subsp. laricio Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. Arab. J. Chem. 2017; 10: S3877–S3882.
 44. Xie Q, Liu Z, Li Z. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of Six Pinus Taxa Native to China. Molecules 2015; 20: 9380-9392.
 45. Cheng MC, Chang WH, Chen CW, Li WW, Tseng CY, Song TY. Antioxidant Properties of Essential Oil Extracted from *Pinus morrisonicola* Hay Needles by Supercritical Fluid and Identification of Possible Active Compounds by GC/MS. Molecules 2015; 20: 19051-19065.
 46. Labib RM, Youssef FS, Ashour ML, Abdel-Daim MM, Ross SA. Chemical Composition of *Pinus roxburghii* Bark Volatile Oil and Validation of Its Anti-Inflammatory Activity Using Molecular Modelling and Bleomycin-Induced Inflammation in Albino Mice. Molecules 2017; 22: 1384.

47. França Orlanda JF, Nascimento AR. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil South. *African J. Bot.* 2015; 99: 103–106.
48. Akalın MK, Tekin K, Akyüz M, Karagöz S. Sage oil extraction and optimization by response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* 2015;76: 829–835.
49. Cvetkovikj I, Stefkov G, Acevska J, Karapandzova M, Dimitrovska A, Kulevanova S. Headspace screening. A novel approach for fast quality assessment of the essential oil from culinary sage. *Food Chem.* 2016; 202: 133–140.
50. Misra BB, Dey S. Evaluation of *in vivo* anti-hyperglycemic and antioxidant potentials of α -santalol and sandalwood oil. *Phytomedicine* 2013; 20: 409-416.
51. Han X, Beaumont C, Stevens N. Chemical composition analysis and *in vitro* biological activities of ten essential oils in human skin cells. *Biochim. Open* 2017; 5:1-7.
52. Kim TH, Hatano T, Okamoto K, Yoshida T, Kanzaki H, Arita M, Ito H. Antifungal and Ichthyotoxic Sesquiterpenoids from *Santalum album* Heartwood. *Molecules* 2017; 22: 1139.
53. Yen HF, Hsieh CT, Hsieh TJ, Chang FR, Wang CK. *In vitro* anti-diabetic effect and chemical component analysis of 29 essential oils products. *J. Food Drug Anal.*2015; 23: 124-129.
54. Rehman S, Latief R, Bhat KA, Khuroo MA, Shawl AS, Chandra S. Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques. *Arab. J. Chem.* 2017; 10: S2485–S2490.
55. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015; 5: 458 – 461.
56. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J. Agric. Food Chem.* 1993; 41: 107–111.
57. Juliastuti J, Miko A, Ramli N, Emilda E, Lajuna L, Yuniwati C. *et al.* The effect of ethanol extract of ylang-ylang flower (*Cananga odorata*) on vascular and kidney histology in menopausal mice. *Clin. Nutr. Exp.* 2017; 15: 1-8.
58. Brokl M, Fauconnier ML, Benigni C, Lognay G, du Jardin P, Focant JF. Improvement of Ylang-Ylang Essential Oil Characterization by GC×GC-TOFMS. *Molecules* 2013; 18: 1783-1797.
59. Zhao L, Chang W, Xiao Y, Liu H, Liu P. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2013; 82: 497–530.

60. Harada H, Kashiwadani H, Kanmura Y, Kuwaki T. Linalool Odor-Induced Anxiolytic Effects in Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 2018;12: 241
61. Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Becerra-Martínez E, Zárate-Reyes JA, Cruz-Durán R. Chemical profile and pharmacological effects of the resin and essential oil from *Bursera schlechtendalii*: A medicinal “copal tree” of southern Mexico. *Fitoterapia* 2018; 128: 86–92.
62. Nikpour H, Mousavi M, Asadollahzadeh H. Qualitative and quantitative analysis of *Teucrium polium* essential oil components by GC–MS coupled with MCR and PARAFAC methods. *Phytochem. Anal.* 2018; 29: 590–600.
63. Ozturk B, Gonzalez-Miquel M. Alkanediol-based deep eutectic solvents for isolation of terpenoids from *Citrus* essential oil: Experimental evaluation and COSMO-RS studies. *Sep. Purif. Technol.* 2019; 227: Article 115707.

Capítulo 6

Productos naturales marinos



A diferencia de los metabolitos secundarios de las plantas y organismos terrestres, el estudio químico y de actividad biológica de los metabolitos secundarios de los organismos marinos, es de desarrollo más reciente. Esto debido principalmente, a la dificultad de acceso que se ha tenido para su recolección. Adicionalmente, mientras con los productos terrestres, existe todo un bagaje histórico de uso para muchos de ellos, lo que ha determinado y permitido legalizar su uso para fines farmacéuticos, bien sea como materias primas o como productos activos (drogas vegetales); pero este no es el caso de la química de los productos naturales marinos. No obstante, lo anterior, es conocido que la biodiversidad marina es mayor que la biodiversidad terrestre, con organismos de tamaños tan variables que oscilan desde los microorganismos más simples hasta los más grandes cetáceos como las ballenas, con toda una gama de tamaños intermedios y de diversidad biológica. Además, gracias a que las técnicas de recolección de organismos marinos cada vez permiten el estudio de organismos marinos de los mares profundos, se están comenzando a investigar dichos organismos, lo que vislumbra un potencial de encontrar nuevos metabolitos como por ejemplo antibióticos con menor resistencia por parte de bacterias causantes de enfermedades.

Aparte de lo anterior y si se considera que en el extenso mundo marino se presentan interacciones entre los microorganismos como la simbiosis de invertebrados con microorganismos, estas relaciones simbióticas derivan en la obtención de nuevos metabolitos con diferentes actividades biológicas

Esta abundancia en biodiversidad, y los hallazgos logrados muestran que los organismos marinos, comparados con los organismos terrestres estudiados; contienen una mayor diversidad y cantidad de sustancias naturales, con muchas y diferentes actividades biológicas y con muchas variaciones en sus estructuras químicas.

Dentro de los organismos marinos más estudiados están las esponjas marinas, otros invertebrados marinos y las algas marinas. Las esponjas en particular son atractivas para su conocimiento químico, pues contienen una gran diversidad de metabolitos secundarios que incluyen especialmente terpenoides, y a diferencia de la mayoría de terpenoides terrestres, los marinos contienen halógenos, lo cual parece ser una característica distintiva de ambas fuentes naturales.

En el caso de las algas marinas, muchas de ellas son utilizadas como alimento, particularmente en los países de oriente como la China y Japón, pero adicionalmente son utilizadas en la elaboración de productos cosméticos y nutracéuticos, por sus propiedades biológicas.

Otra fuente inagotable de productos naturales son los microorganismos marinos, que se constituyen en verdaderas mini fábricas de metabolitos con diversas estructuras químicas y actividades biológicas y propiedades industriales únicas. Un ejemplo de esto son los hongos

marinos, los cuales se reconocen como una fuente de sustancias promisorias para su uso farmacéutico.

Los artículos de revisión que se publican sobre la química de los productos naturales marinos, han ido cubriendo año tras año, el creciente número de publicaciones e investigaciones. Un ejemplo de ello, son los interesantes y completos trabajos de revisión como los de Blunt y col. Estas revisiones se refieren a organismos tales como fitoplancton, algas verdes, pardas y rojas, esponjas, cnidarios, briozoos, moluscos, tunicados, equinodermos, manglares y otras plantas intertidales, y microorganismos. En forma general muestran como a diferencia de los organismos terrestres, muchos organismos marinos contienen por ejemplo m[as metabolitos halogenados, lo cual es de esperarse dada la abundancia de los halógenos en el medio marino. Sin embargo, estos trabajos muestran no solo una gran cantidad de sustancias con estructuras novedosas y algunas con una gran complejidad estructural, al compararlas con sus contrapartes terrestres; sino que también presentan una amplia gama de actividades biológicas, lo que las hace sustancias atractivas para la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos.

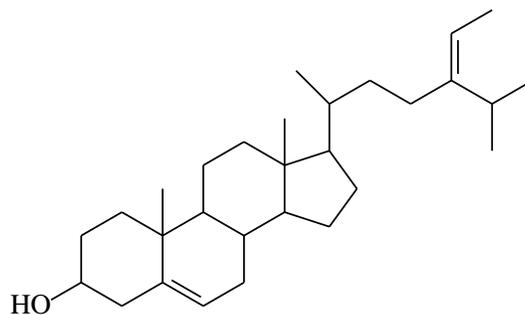
Desde el punto de vista de su actividad biológica, existen muchas sustancias aisladas de fuentes marinas, que se evalúan a nivel preclínico por su potencial antibacterial, antidiabético, antifúngico, anti-inflamatorio, antiparasitario, anti tuberculosis, y antiviral; que afectan los sistemas inmune y nervioso. Algunos de ellos se encuentran en fase clínica III, otros han sido aprobados por entidades como la FDA de los Estados Unidos. Hasta 2016, estaban disponibles comercialmente ocho medicamentos con actividad antiviral y anti cáncer, especialmente. La citarabina, un nucleósido que tiene el nombre comercial de Cytosar-U™, aprobado en 1969 contra el cáncer, la vidarabina, otro nucleósido registrado comercialmente como Vira-A™, aprobado en 1976 contra cáncer; el Ziconotide, registrado comercialmente como Prialt™, es un péptido anti cáncer aprobado en 2004; los ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3, registrados como Lovaza™, y aprobados en 2004 para tratar la hipertrigliceridemia; la trabectedina, registrada comercialmente como Yondelis™, un alcaloide tetrahidroisoquinolínico aprobado en 2007 para el tratamiento de cáncer; el mesilato de eribulina, una cetona macrocíclica comercialmente registrada como Halaven™, y aprobada en 2010 para el tratamiento de cáncer; la brentuximab vedotina, conocida comercialmente como Adcetris™, y que es un conjugado con un anticuerpo, aprobado en 2011 contra cáncer; y el iota-carragenano, comercialmente conocido como Carragelose™, que es una mezcla de polímeros sulfatados de galactosa, aprobado en 2013 como antiviral.

En cuanto a la metodología utilizada actualmente, esta es básicamente la misma mencionada en el capítulo 1, pero en particular cada día se están utilizando más las técnicas combinadas de cromatografía líquida y espectrometría de masas. Esto es muy útil y conveniente para los procesos de bioprospección. Un ejemplo de estos es la técnica combinada de cromatografía

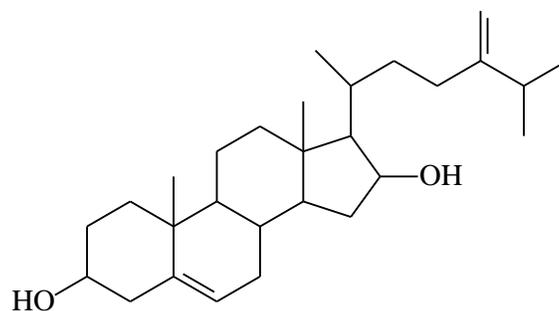
líquida HPLC con espectrometría de masas con ionización laser y espectrometría de masas de ionización *electrospray*, cuya sigla inglesa corresponde a LC-ICP-MS/ESI-MS.

A nivel general se conoce que los organismos marinos son fuente industrial de metabolitos tales como carotenoides, ácidos grasos polinsaturados (p. ej. ω -3) y compuestos fenólicos; todos ellos con propiedades útiles para la salud humana especialmente, pero además en estos organismos se siguen encontrando nuevos compuestos con potencial contra diferentes enfermedades. A continuación, se presentan algunos ejemplos representativos de las diferentes clases de metabolitos secundarios presentes en organismos marinos. Estos incluyen esteroides y terpenoides, quinonas, compuestos bromados, compuestos con nitrógeno heterocíclico, compuestos con nitrógeno y azufre.

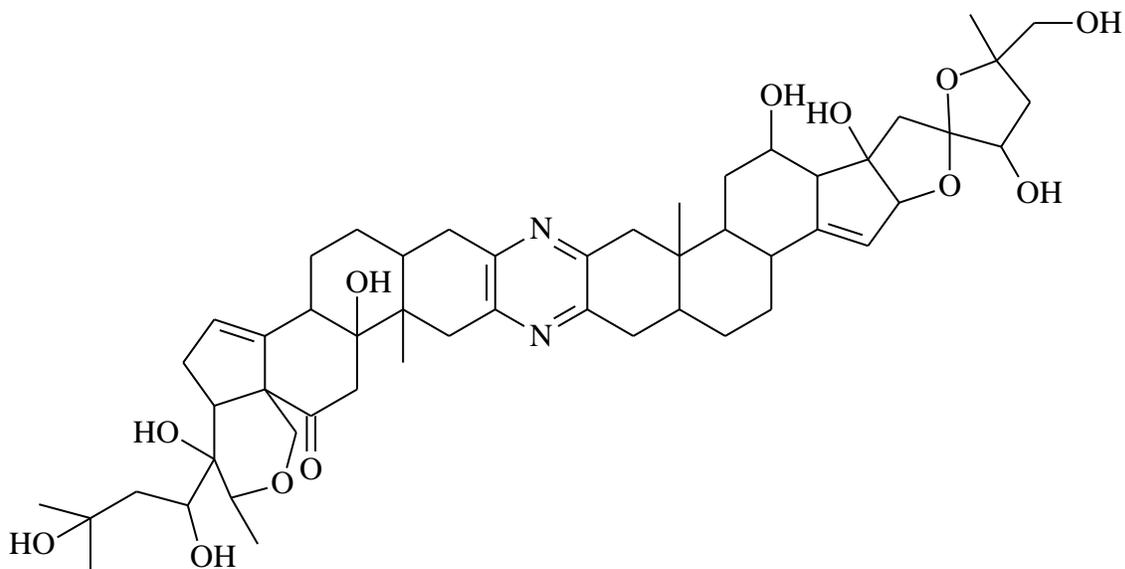
Entre la gran cantidad de esteroides aislados está el fucosterol, el cual se ha reportado como no tóxico, y que reduce los niveles de colesterol en la sangre y presenta actividad antidiabética, además presenta potencial contra enfermedades neurodegenerativas. A los esteroides también se les atribuye la capacidad de reducir la grasa en el hígado y la acumulación excesiva de grasa en el corazón. Un esteroide hidroxilado en el carbono 16, recientemente se aisló de la esponja marina *Monanchora sp.*, y presenta propiedades inmuno modulatorias.



Fucosterol

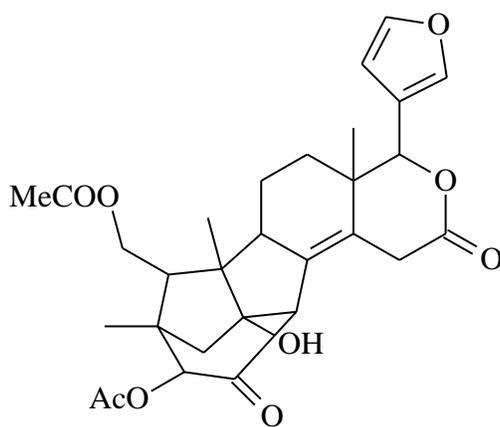
Esterol de esponja *Monanchora sp.*

La cefalostatina-20 se aisló como un componente minoritario del gusano marino *Cephalodiscus gilchristi*. Al comparar esta sustancia con las cefalostatinas más potentes, esta sustancia es entre 100 y 1000 veces menos citotóxica.

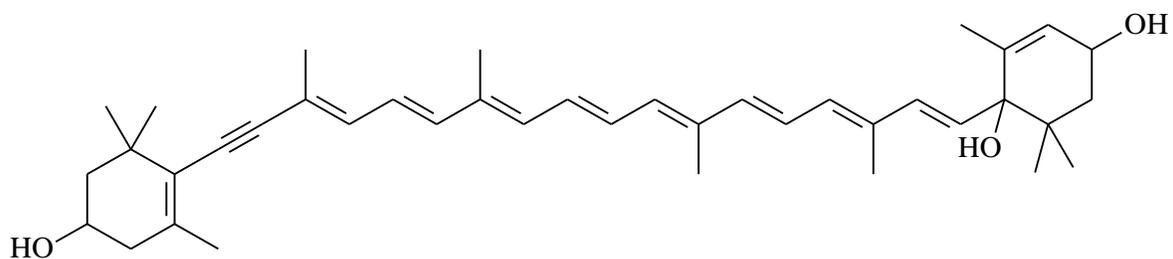


Cefalostatina-20

Los limonoides son una clase de terpenoides. La moluccensina-J junto con otros limonoides, aislados de plantas de manglares como *Ceriops tagal* presentan actividad antiviral *in vitro* y contra leucemia *in vivo*. En el caso de los carotenoides, de la estrella de mar apodada “corona de espinas” *Acanthaster planci*, se aisló el carotenoide nuevo 6'-epigobiusxantina.

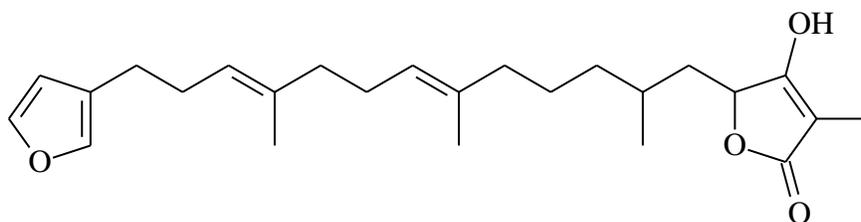


Moluccensina-J



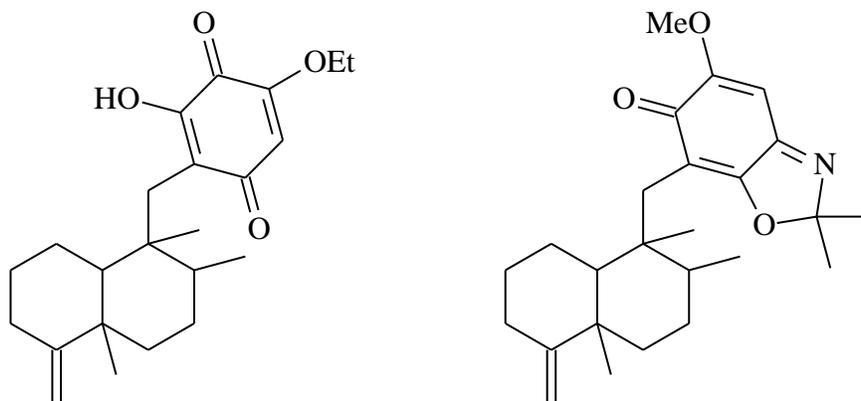
6'-epigobiusxantina

La esponja marina *Ircinia felix*, contiene sesterterpenos como la variabilina. Estos compuestos han mostrado ser una mezcla potente inhibidora de *quorum sensing*.



Variabilina

De la esponja *Smenospongia aurea* se aislaron meroterpenoides tipo friedodrimano, con mediana citotoxicidad a células tumorales. La presencia del grupo iminoquinona no tiene precedentes en la naturaleza.



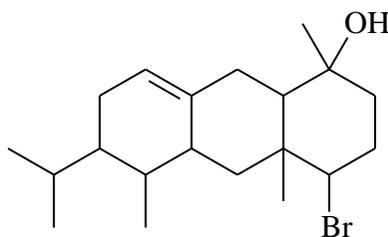
Meroditerpenos tipo friedodrimano

La presencia de los halógenos en las estructuras de diferentes metabolitos secundarios marinos es una característica distintiva frente a su contraparte terrestre, por ejemplo, el diterpeno bromado antrasfaerol, aislado de un alga roja *Laurencia sp.*

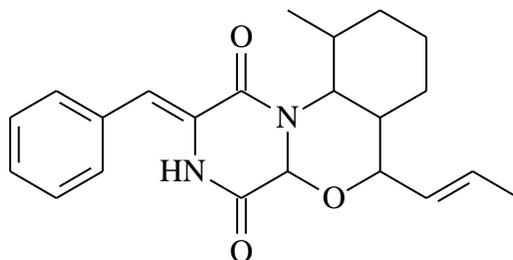
La penicilivicina, es un compuesto con nitrógeno en heterociclo aislado de un hongo *Penicillium sp.*, y presenta actividad antimigratoria potente de cáncer de seno.

La eustidina-A, aislada del tunicado *Eudistoma sp.*, tiene potencial terapéutico para el tratamiento de tumores.

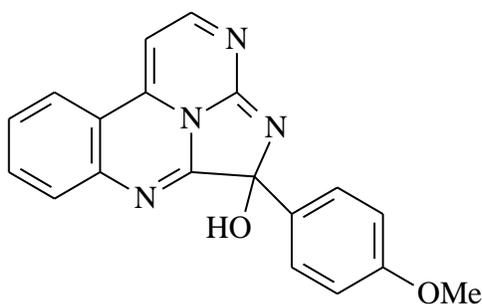
La stelletapectina-A, es un depsipéptido aislado de la esponja *Stelletta sp.* Presenta potencial contra el virus del sida.



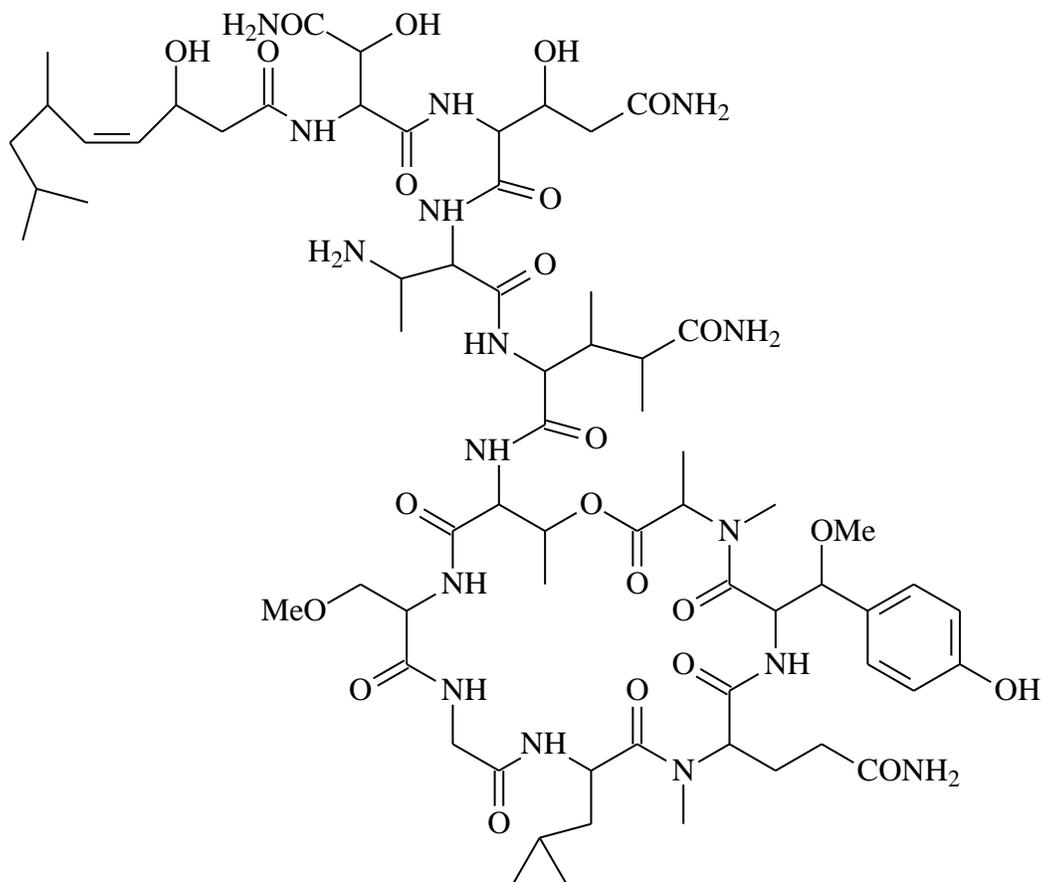
Antrasfaerol



Penicilivicina



Eustidina-A



Stellettapectina-A

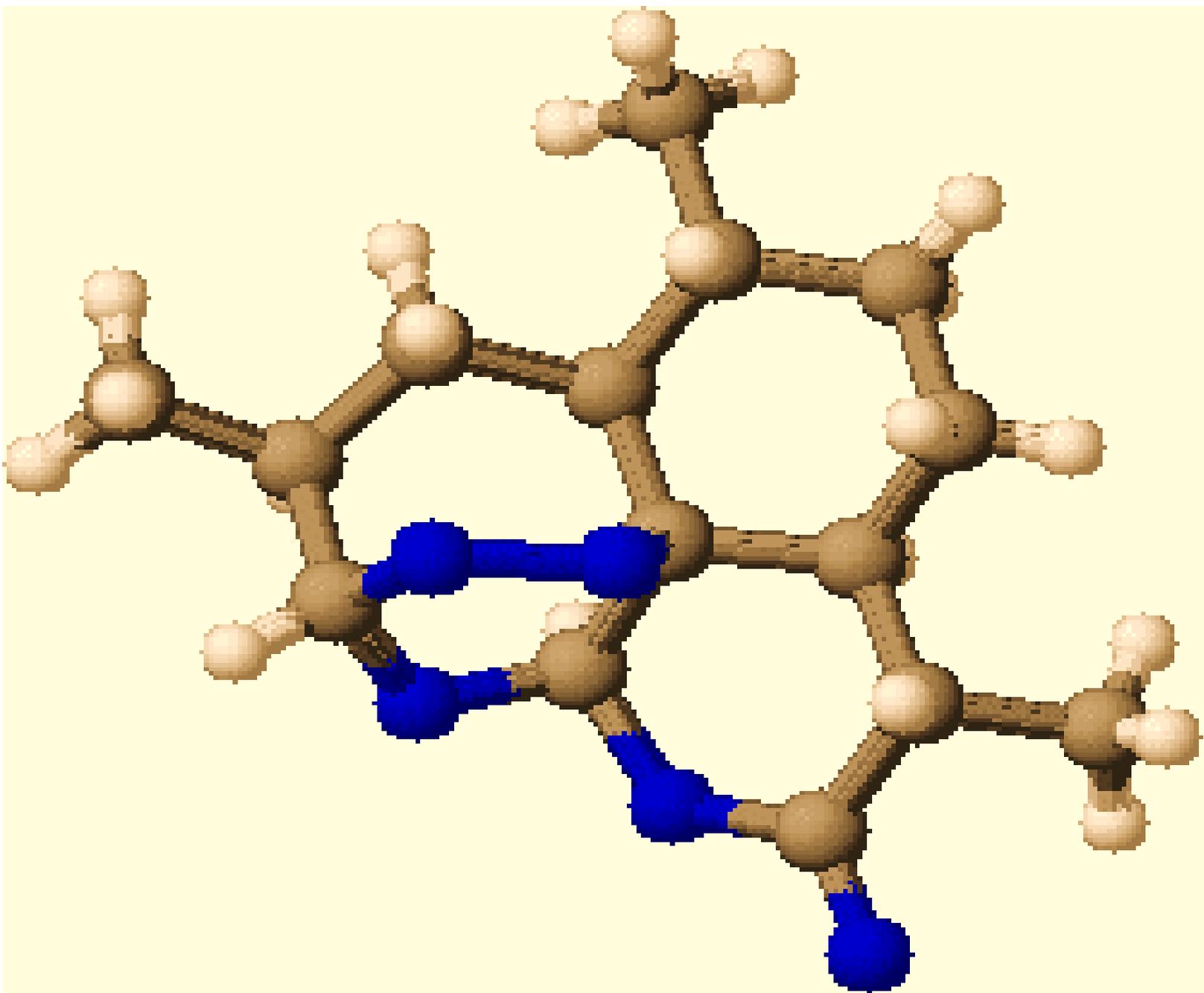
Referencias bibliográficas

1. Tortorella E, Tedesco P, Esposito FP, January GG, Fani R, Jaspars M, de Pascale D. Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. *Mar. Drugs* 2018; 16: 355.
2. Melander RJ, Liu HB, Stephens MD, Bewley CA, Melander C. Marine sponge alkaloids as a source of anti-bacterial adjuvants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26: 5863–5866.
3. Mudit M, El Sayed KA. Cancer control potential of marine natural product scaffolds through inhibition of tumor cell migration and invasion. *Drug Discov. Today* 2016; 21: 1745-1760.
4. Viera I, Pérez-Gálvez A, Roca M. Bioaccessibility of Marine Carotenoids. *Mar. Drugs* 2018, 16: 397.
5. Luo C, Ren H, Yao X, Shi Z, Liang F, Kang JX *et al.* Enriched Brain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Confer Neuroprotection against Microinfarction. *Biomedicine* 2018; 32: 50–61.

6. Oh JH, Choi JS, Nam TJ. Fucosterol from an Edible Brown Alga *Ecklonia stolonifera* Prevents Soluble Amyloid Beta-Induced Cognitive Dysfunction in Aging Rats. *Mar. Drugs* 2018; 16: 368.
7. Bromley CL, Raab A, Parker-Nance S, Beukes DR, Jaspars M, Davies-Coleman MT. Hyphenated LC-ICP-MS/ESI-MS Identification of Halogenated Metabolites in South African Marine Ascidian Extracts. *S. Afr. J. Chem.* 2018; 71: 111–117.
8. El-Hossary EM, Cheng C, Hamed MM, Nageeb A, Hamed ES, Ohlsen K. *et al.* Antifungal potential of marine natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 126: 631- 651.
9. Chen L, Hu JS, Xu JL, Shao CL, Wang GY. Biological and Chemical Diversity of Ascidian-Associated Microorganisms. *Mar. Drugs* 2018; 16: 362.
10. Demers DH, Knestrick MA, Fleeman R, Tawfik R, Azhari A, Souza A, Vesely B. *et al.* Exploitation of Mangrove Endophytic Fungi for Infectious Disease Drug Discovery. *Mar. Drugs* 2018; 16: 376.
11. Imhoff JF. Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. *Mar. Drugs* 2016; 14: 19.
12. Trincone A, Nicoletti R. Bioactive Compounds Produced by Strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of Marine Origin. *Mar. Drugs* 2016; 14: 37.
13. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2016; 33: 382 – 431.
14. Mayer AMS, Rodríguez AD, Taglialatela-Scafati O, Fusetani N. Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Mar. Drugs* 2017; 15: 273.
15. Abdelmohsen UR, Balasubramanian S, Oelschlaeger TA, Grkovic T, Quinn RJ, Hentschel U. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17: e30-e41.
16. Dyshlovoy SA, Honecker F. Marine Compounds and Cancer: 2017 Updates. *Mar. Drugs* 2018; 16: 41.

Capítulo 7

Sesquiterpénlactonas



En la búsqueda de sustancias naturales para el diseño y elaboración de nuevos medicamentos, hay diferentes sustancias terpenoides que contienen un anillo lactónico, generalmente α,β -insaturado. Estas sustancias presentan diferentes actividades biológicas, siendo particularmente citotóxicas. Aquí se incluyen terpenoides de varias clases como sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos y esteroides; que además contienen un anillo lactónico. A estas sustancias se las denomina como sesquiterpénlactonas, diterpénlactonas (p. ej. ginkgólidos), sesterterpénlactonas (p. ej. ácidos tetrónicos de esponjas marinas); withanólidos, etc. La presencia del anillo lactona en todas estas sustancias está relacionada con su actividad biológica, otro ejemplo de esto son los cardiotónicos, los cuales son esteroides naturales con un anillo lactónico, como se mencionó en el capítulo 3.

Pero son las sesquiterpénlactonas, una de las clases más estudiadas y evaluadas, y que además muestra un potencial notable para el desarrollo de nuevos medicamentos contra enfermedades como el cáncer. Por esto en este capítulo se profundizará sobre algunos aspectos químicos y de actividad biológica de estas interesantes sustancias, de las cuales, al año 2015 se habían reportado más de 6.000 en la naturaleza.

Definición

Se definen como sesquiterpénlactonas a los sesquiterpenoides (Terpenoides C_{15}) que contienen en su estructura el grupo funcional de éster cíclico, más comúnmente llamado anillo lactónico. La figura 7.1. muestra ejemplos de varias sesquiterpénlactonas naturales.

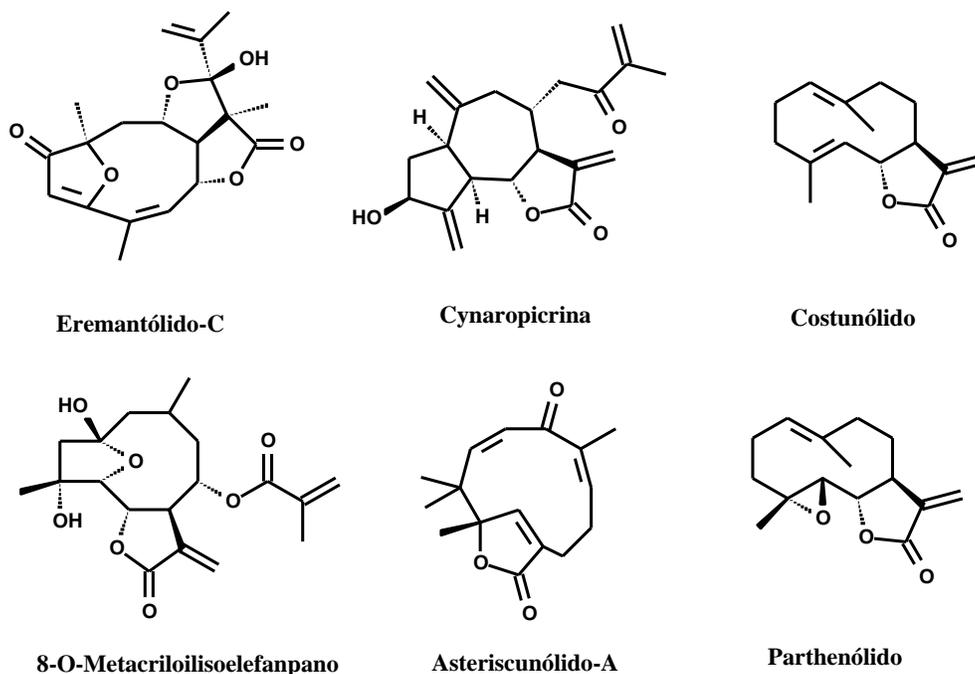


Figura 7.1. Estructuras químicas de algunas sesquiterpénlactonas naturales.

Nomenclatura

Debido a la gran diversidad estructural de las sesquiterpénlactonas, no se cuenta con unas normas claras para su nomenclatura, por esto se acostumbra a denominarlas con nombres comunes p.ej. helenalina, mexicanina, artemisinina, etc.; aunque algunos autores las nombran relacionando el núcleo básico y los sustituyentes. También se utilizan nombres comunes con la terminación *ólido*, la cual se usa para toda sustancia natural que posea un anillo lactónico p. ej. parthenólido, costunólido, etc.

La Figura 7.2. muestra varios núcleos de sesquiterpénlactonas, y la manera como se enumeran los átomos de carbono del núcleo básico.

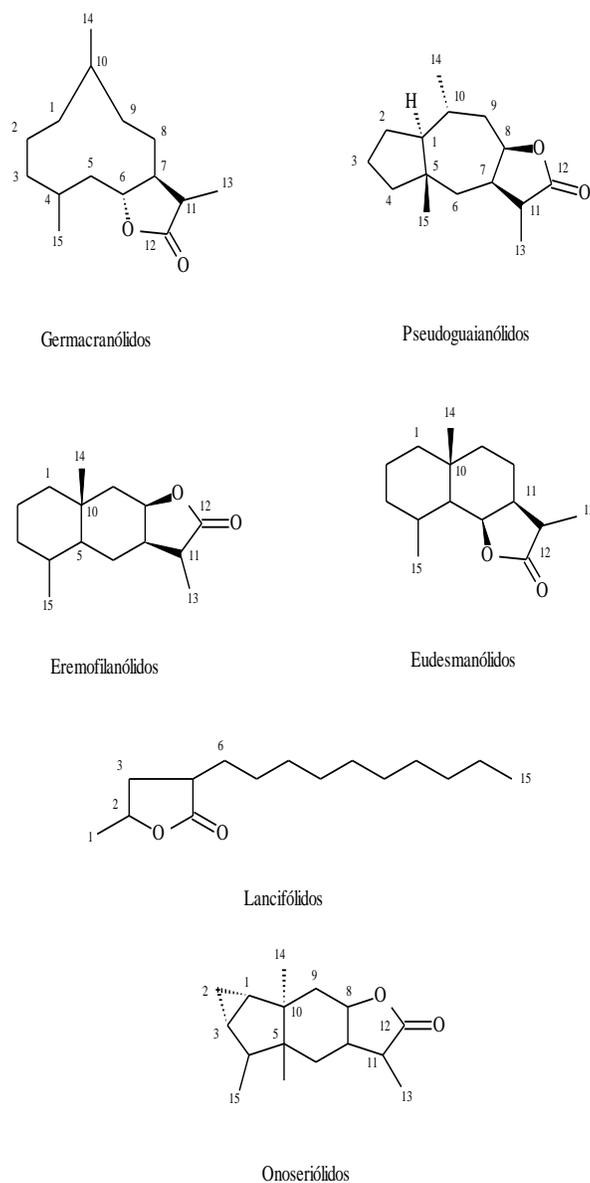


Figura 7.2. Estructuras y enumeración de los carbonos en seis núcleos de sesquiterpénlactonas.

Clasificación

Las sesquiterpenlactonas se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que poseen y agregándoles la terminación *ólido* que indica la existencia de un grupo funcional lactona (Figura 7.2); por ejemplo, las que contienen el núcleo tipo germacrano se las llama germacranólidos; las que tienen el núcleo tipo eremofilano son eremofilanólidos, las que contengan núcleo tipo eudesmano son eudesmanólidos, heliangólidos, fukinanólidos, etc.

Biogénesis

Las sesquiterpenlactonas se originan a partir de farnesilpirofosfato como los demás sesquiterpenos naturales. Es generalmente aceptado que la ruta principal para esto es a través del ácido mevalónico, pero también se propone que es la del metileritritol (1). La Figura 7.3 esquematiza la biogénesis de los intermedios I, II, III y IV, a partir de los cuales se propone el origen de la mayoría de sesquiterpenos.

La lactonización del precursor sesquiterpenoide parece producirse por un mecanismo de oxidación de un grupo metilo hasta carboxilo, la oxidación de un carbono adyacente y finalmente la deshidratación entre los grupos carboxilo e hidroxilo formados. La Figura 7.4 describe este proceso.

En una forma similar se sugiere que se originan las otras clases de sesquiterpénlactonas. La Figura 7.5 muestra las relaciones biogenéticas propuestas para las diversas clases de sesquiterpénlactonas, donde se sugiere que los germacranólidos, son los precursores de varias clases de sesquiterpénlactonas. La Figura 7.6 muestra un esquema propuesto para la biogénesis de ambrosanólidos y helenanólidos.

Distribución y estado natural

Las sesquiterpénlactonas son constituyentes característicos de plantas, particularmente de la familia de las compuestas, aunque se han encontrado en otras plantas de familias como magnoliáceas, umbelíferas y lauráceas. Las concentraciones de sesquiterpénlactonas pueden variar entre el 0.01 y el 8% del peso seco, y se las encuentra generalmente en hojas y partes aéreas. Se las puede encontrar en forma libre principalmente, y raramente en forma glicosídica

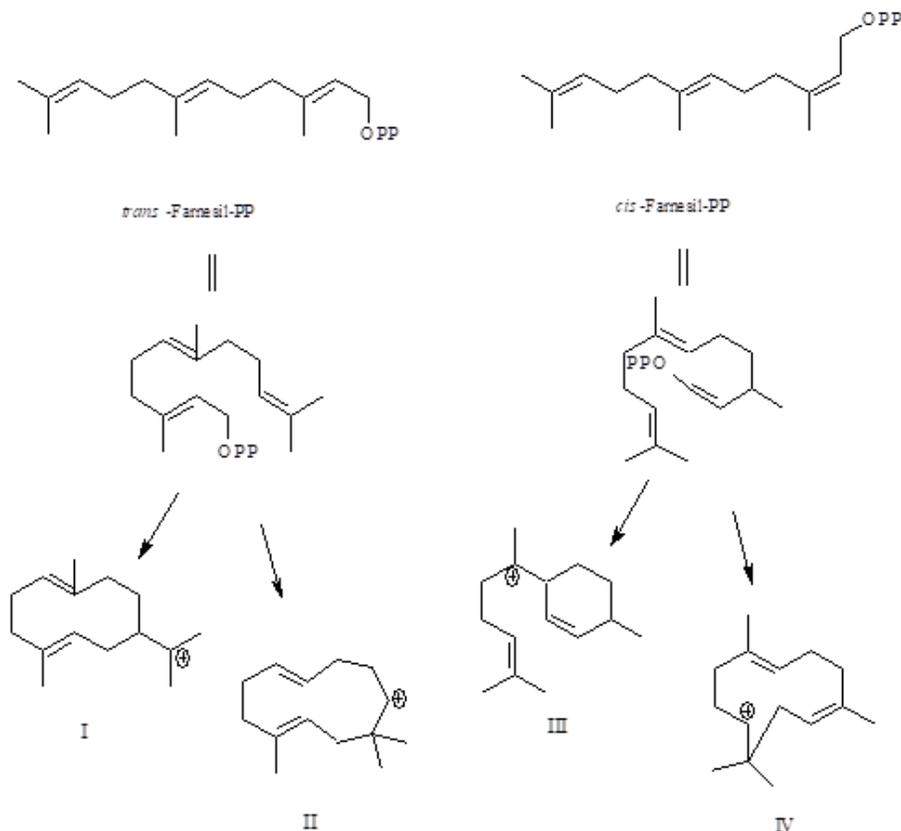


Figura 7.3. Biogénesis de los cuatro cationes precursores de sesquiterpenos.

Extracción

Debido a que la gran mayoría de sesquiterpénlactonas naturales se encuentran en forma libre en las plantas que las poseen, tienen las propiedades de solubilidad características de la gran mayoría de terpenoides, y son por lo tanto solubles en solventes relativamente apolares como cloroformo, diclorometano, benceno, éter etílico, etc. Aunque el cloroformo es el solvente más usado para su extracción, es recomendable reemplazarlo por uno como el acetato de etilo, teniendo en cuenta que este último es menos tóxico y menos contaminante que los solventes halogenados. También se utiliza para la extracción el etanol, una vez obtenido el extracto etanólico, este se concentra y se suspende en agua caliente. Al hacer partición con acetato de etilo se obtiene en la fase orgánica, el extracto crudo de sesquiterpénlactonas. Más recientemente se están comenzando a utilizar solventes eutécticos para la extracción como los obtenidos con ácido málico-ChCl (1:1), ácido málico - glucosa (1:1), ChCl-glucosa (5:2), ácido málico-prolina (1:1), glucosa-fructosa-sacarosa (1:1:1) y glicerina-prolina-sacarosa (9:4:1).

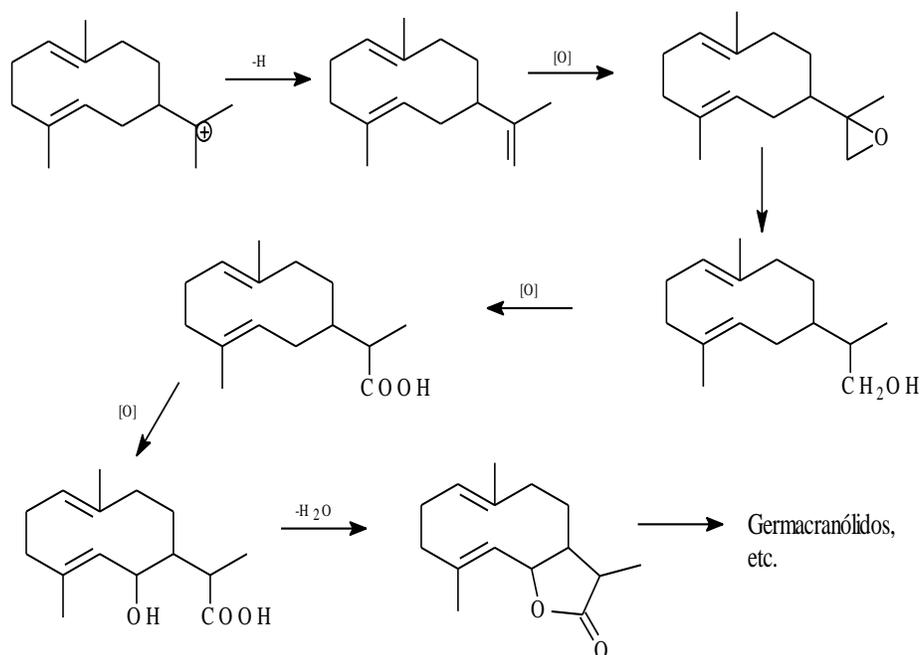


Figura 7.4. Biogénesis del anillo lactónico de sesquiterpenlactonas.

Separación y análisis cromatográfico

Las sesquiterpénlactonas pueden separarse y analizarse bien sea por cromatografía en columna o cromatografía en capa fina, utilizando sílica gel y diferentes eluentes, pero sin duda los métodos instrumentales como la cromatografía de gases y especialmente la cromatografía líquida HPLC, combinadas con detectores de ultravioleta, espectrómetros de masas, y con resonancia magnética nuclear, son los más convenientes por su eficiencia y rapidez para los análisis).

Como agente visualizador (o revelador) para los análisis por cromatografía en capa fina pueden utilizarse una solución de cloruro de aluminio al 5% en etanol, y calentamiento a 120°C durante 10-15 minutos. En estas condiciones las sesquiterpénlactonas se observan como manchas pardas o violeta, que fluorescen de color amarillo, pardo o verde bajo la luz de 366 nm. También se usa el reactivo de Zimmerman, que produce manchas de color gris a violeta.

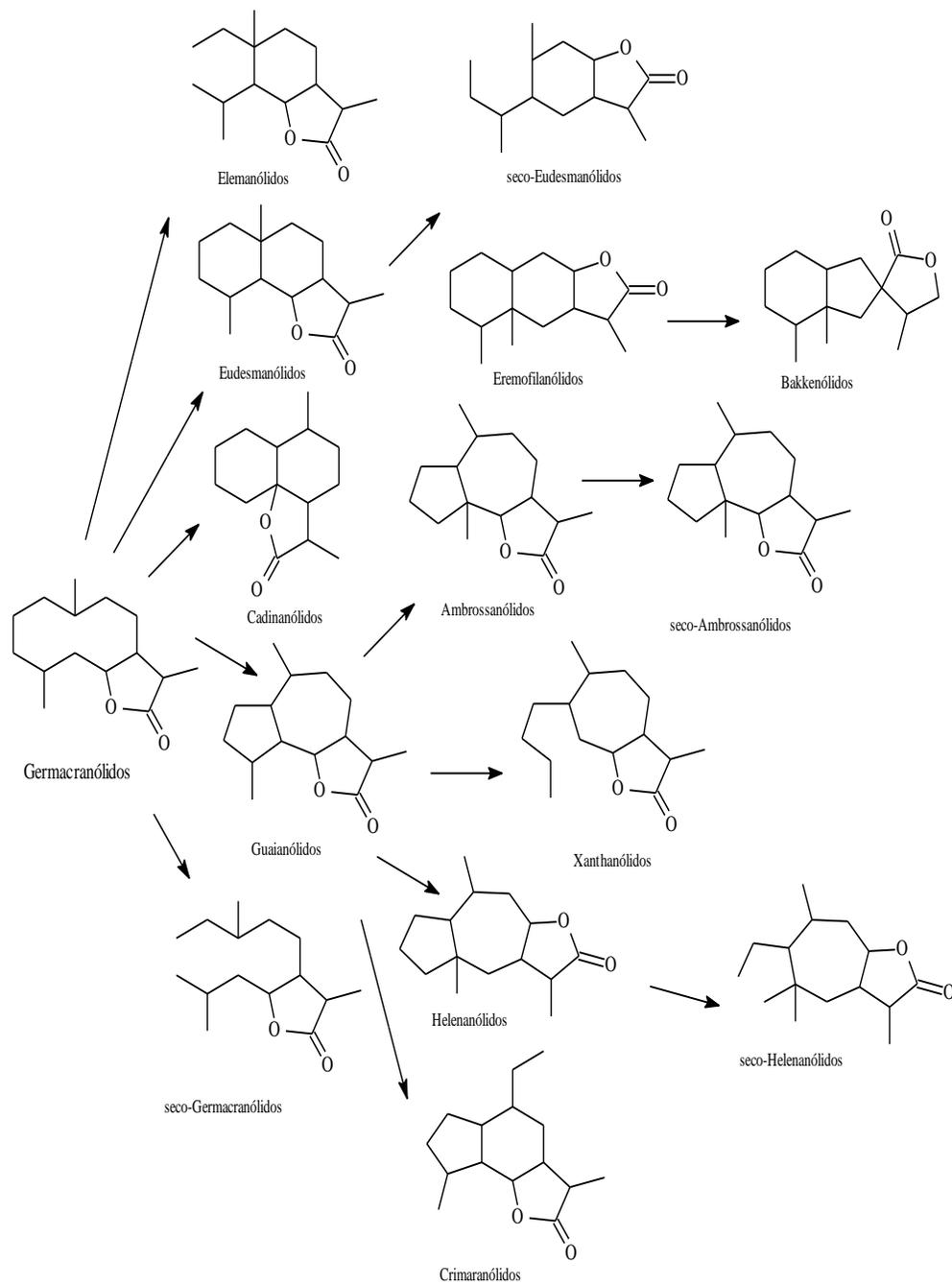


Figura 7.5. Interrelaciones biogenéticas entre varias clases de sesquiterpenolactonas.

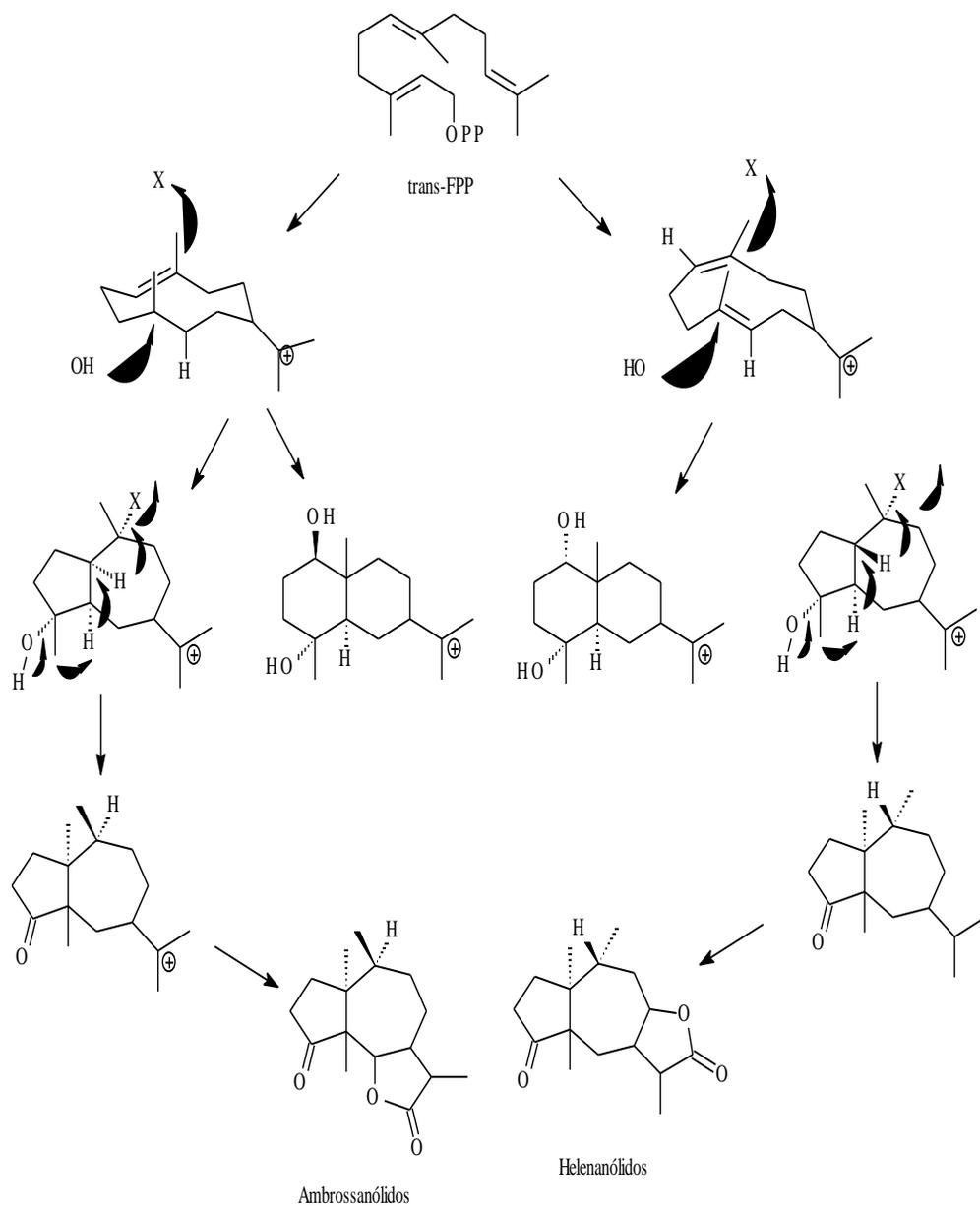


Figura 7.6. Biogénesis de Ambrosanólidos y Helenanólidos.

Para el caso del análisis de mezclas de sesquiterpénlactonas, por cromatografía líquida de alta eficiencia, la longitud de onda de detección usada es 215 nm.

La estructura química de las sesquiterpénlactonas se dilucida a partir de datos obtenidos principalmente de los análisis por espectroscopía infrarrojo, ultravioleta, espectrometría de masas y de Resonancia Magnética Nuclear. A continuación, se mencionan algunos aspectos relacionados con el uso de estas técnicas.

Espectrometría de Masas

Debido a la gran diversidad estructural encontrada en las sesquiterpénlactonas naturales, no se cuenta como en el caso de otras sustancias, de estudios de fragmentación que ayuden a identificar estas sustancias. La técnica de ionización *electrospray* (sigla inglesa ESI), en modo positivo, permite la obtención de los iones moleculares M^+ y los iones pseudomoleculares (también llamados cuasi moleculares) que contienen un protón adicional $[M+H]^+$, o carecen de un protón $[M-H]^+$, pero, además, permite la obtención de otros iones como $[M+m]^+$, donde m es un metal como sodio o potasio. Cuando se utiliza una celda de colisión, se pueden obtener fragmentos provenientes de estos iones, que en el caso de los iones M^+ permiten obtener a partir de ellos nuevas fragmentaciones que se pueden interpretar con los mecanismos de la espectrometría de masas clásica, esta técnica se conoce como espectrometría de masas tándem y se reconoce por la sigla inglesa MS/MS. Adicionalmente, en el caso de los iones pseudomoleculares, se pueden obtener fragmentaciones con retención o migración de la carga. En general se observan fragmentos correspondientes a la pérdida de una o varias moléculas de agua, monóxido de carbono, formaldehído, dióxido de carbono y metanol, pero estos dependen de cada estructura en particular, y de si se utiliza ESI en modo positivo o negativo.

Las figuras 7.7 y 7.8 muestran a manera de ejemplo, los posibles mecanismos de fragmentación en espectrometría de masas clásica, de las sesquiterpénlactonas grosmicina, canina y rupinas A y B.

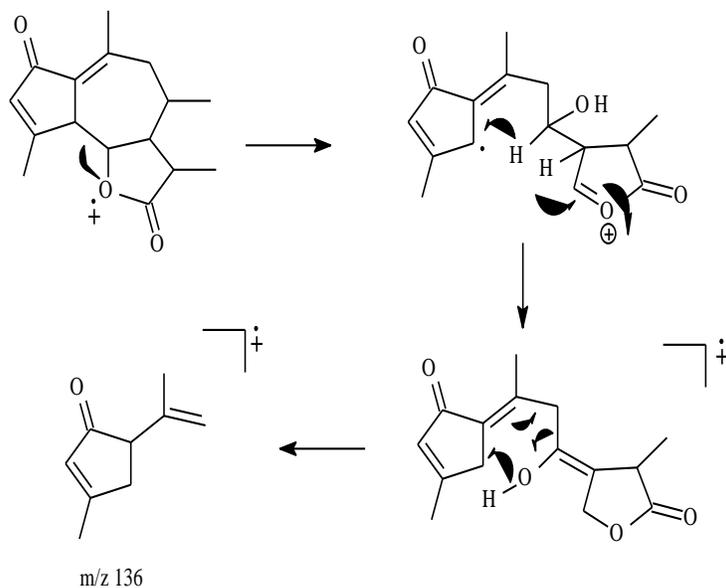


Figura 7.7. Mecanismo de formación del ión m/z 136 de la grosmicina.

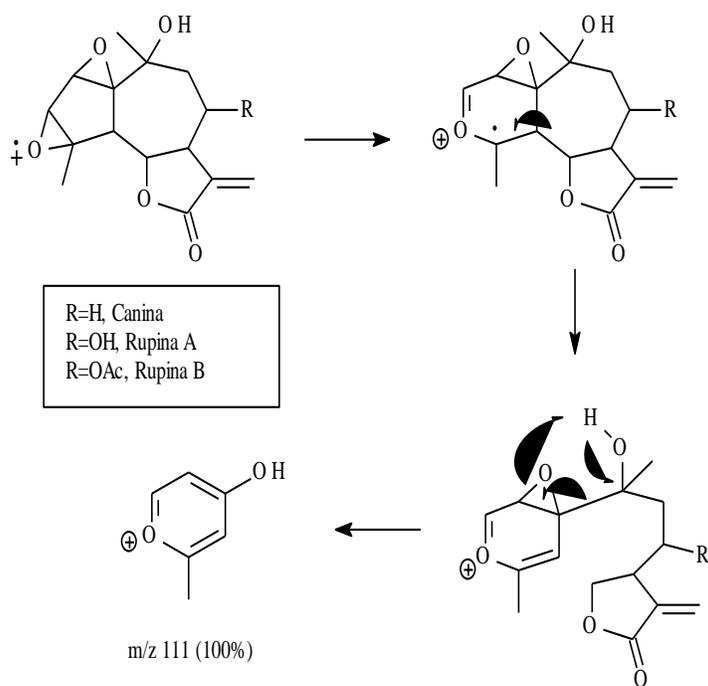
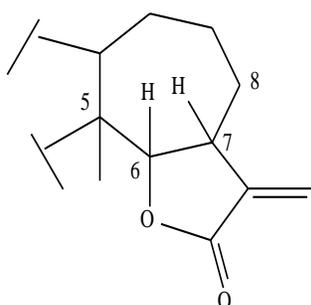


Figura 7.8. Mecanismo de formación del ión m/z 111 en los espectros de masas de canina y las rupinas A y B.

Resonancia Magnética Nuclear

En general, los espectros de RMN-¹H de las sesquiterpénlactonas muestran señales características:

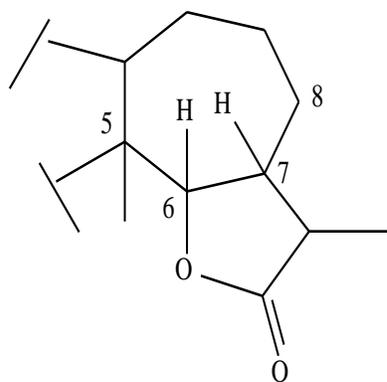
- Los grupos metileno terminales aparecen como 2 dobletes entre 6.0-6.2 y 5.7-5.5 ppm, con constantes de acoplamiento de aprox. 2 – 4 Hz.
- Los grupos metilos ligados al anillo saturado aparecen como dobletes $J = 7$ Hz, alrededor de 1.1 ppm.
- En el sistema:



El protón 6 aparece como doblete ($J=10$ hz) entre 4.4-5.0 ppm.

El protón 7 aparece como multiplete alrededor de 3.4 ppm.

- En el sistema:



Los protones 6 y 7 aparecen a 4.5 y 2.2 ppm.

La figura 7.9 muestra las señales características del espectro RMN-¹H, reportado para *Artemisia anomala*. En color azul se aprecian los valores calculados con la herramienta en línea NMRdb.org, y en negro los valores experimentales reportados. Puede observarse la

buena aproximación entre los valores calculados y los experimentales, con diferencias que no sobrepasan las 0.5 unidades de desplazamiento químico.

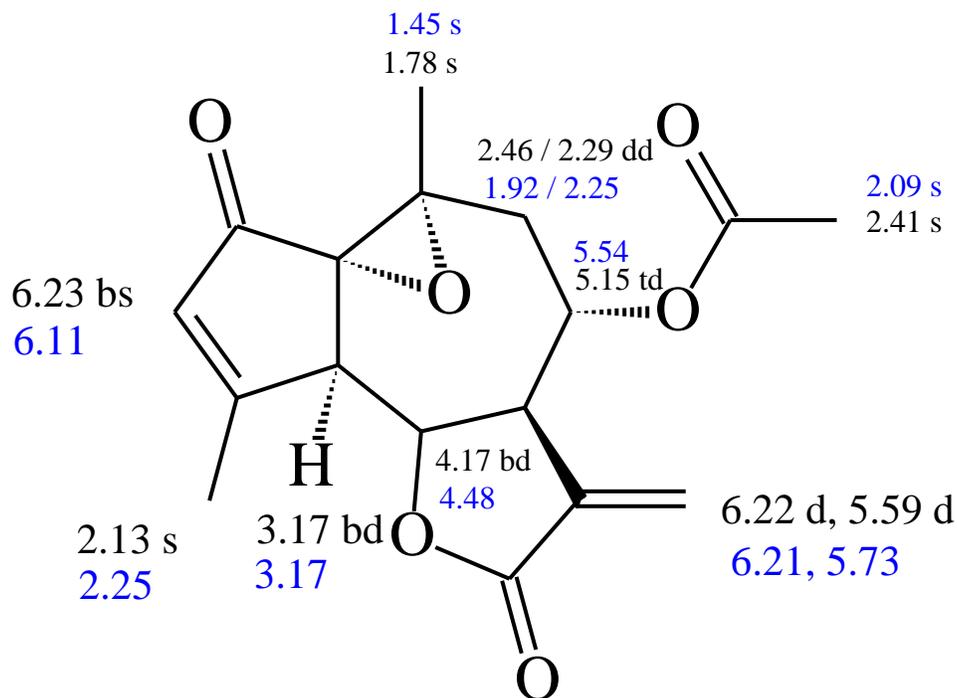


Figura 7.9. Desplazamientos químicos RMN- ^1H reportados y calculados para una sesquiterpénlactona citotóxica aislada de *Artemisia anomala*.

En el caso de RMN- ^{13}C , esta técnica es de gran utilidad para sustancias sin el anillo aromático, como son en general los terpenoides. La figura 7.10 muestra los desplazamientos químicos de dos sesquiterpénlactonas, tanto experimentales como los calculados con el software Chemwind®, de Biorad Labs®. La figura 7.11. muestra los desplazamientos químicos experimentales y calculados con NMRdb.org de los carbonos para la misma sesquiterpénlactona de la figura 7.9. En este último caso, puede observarse la buena aproximación entre los valores calculados y los experimentales, con diferencias que no sobrepasan las 5.0 unidades de desplazamiento químico.

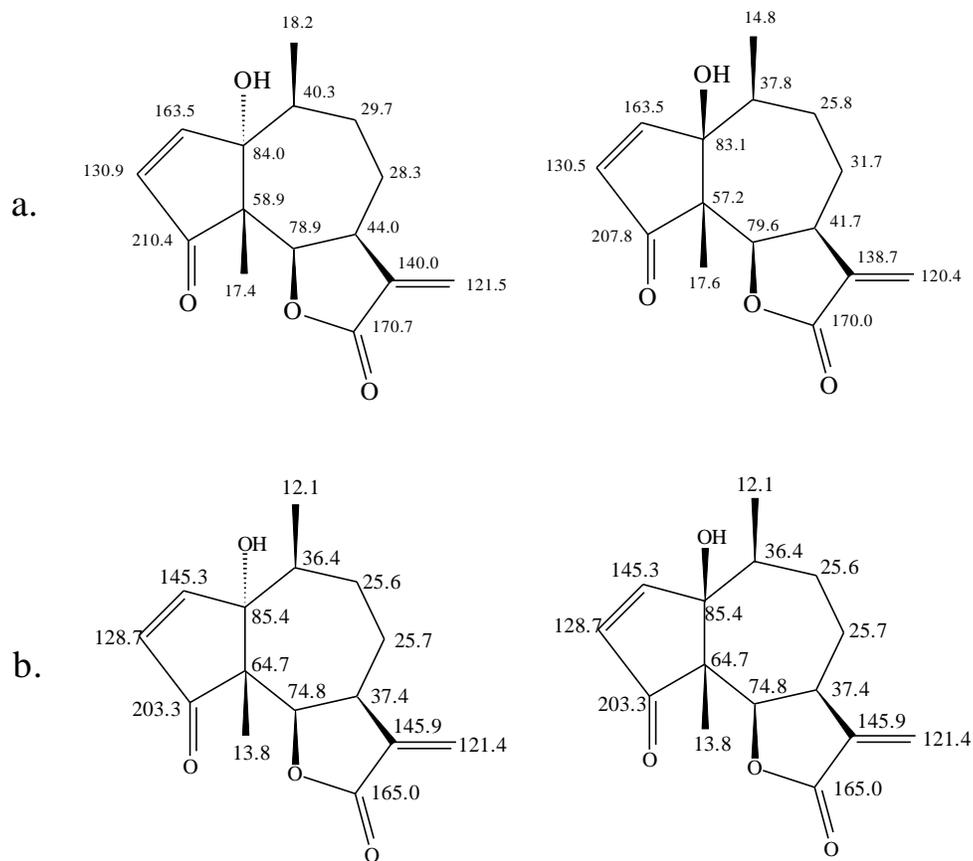


Figura 7.10. Desplazamientos químicos en RMN- ^{13}C de dos sesquiterpenlactonas.

a) Valores hallados experimentalmente,

b) Valores calculados con el programa Chemwind®.

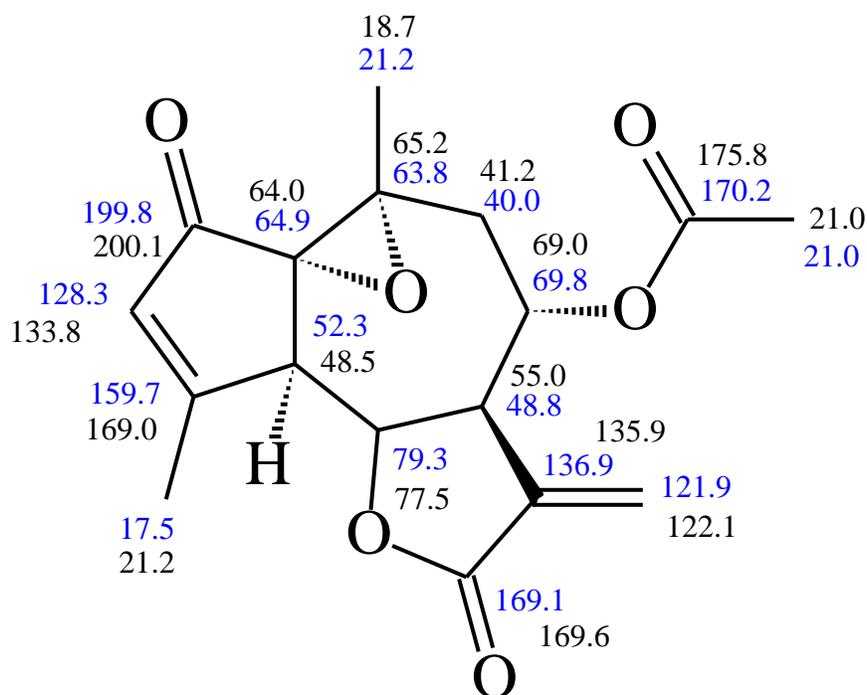


Figura 7.11. Desplazamientos químicos RMN- ^{13}C reportados y calculados para una sesquiterpénlactona citotóxica aislada de *Artemisia anómala*.

Espectroscopía ultravioleta

Las sesquiterpénlactonas α,β -insaturadas absorben entre 205-235 nm debido al grupo carbonilo lactónico.

Espectroscopía infrarroja

El grupo carbonilo de las lactonas α,β -insaturadas absorbe alrededor de $1750\text{-}1770\text{ cm}^{-1}$; con desplazamientos hasta 1795 cm^{-1} cuando hay variaciones estructurales como p.ej. fusiones *trans* de los anillos.

Ensayos de reconocimiento

Aunque no existe una prueba específica para reconocer sesquiterpenlactonas en muestras biológicas, son muy utilizados los ensayos de reconocimiento de anillos lactónicos con reactivos nitro como son los ensayos de Kedde, Legal y de Raymond. Aquí es importante tener en cuenta que hay otras sustancias como los cardiotónicos y algunas acetogeninas que también producen resultado positivo, debido a que también contienen anillos lactónicos. Se han sugerido varios mecanismos para explicar la coloración violeta que se produce con los reactivos nitro, una de ellas es la formación de los denominados complejos de Meisenheimer (Figura 7.12).

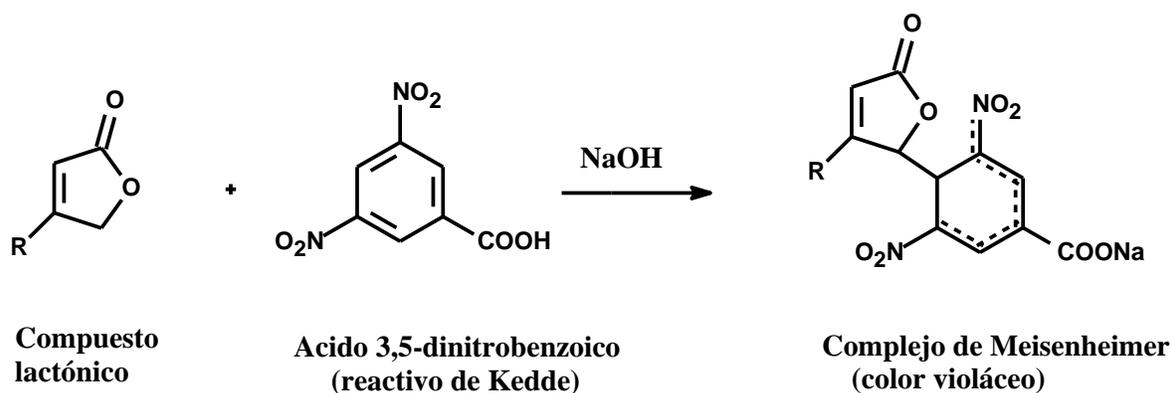


Figura 7.12. Formación de complejos de Meisenheimer, entre un compuesto lactónico y el reactivo de Kedde.

Ensayo de Legal

Las sesquiterpenlactonas con anillos γ -lactona α,β -insaturados producen coloración rosa cuando se disuelven en piridina, se añade nitroprusiato de sodio y un álcali. La prueba también la dan positiva las lactonas β,γ -insaturadas cuando no se controla el pH, ya que se isomerizan en medio alcalino. La prueba también la dan positiva las metilécetonas.

Ensayo de Kedde

A la muestra disuelta en alcohol se añade ácido 3,5- dinitrobenzoico y KOH. Se producen coloraciones violetas o azules que desaparecen después de una hora.

Ensayo de Raymond (o de Marthoud)

A la muestra disuelta en alcohol se agrega m-dinitrobenzenceno y NaOH. Se producen coloraciones violetas que desaparecen rápidamente.

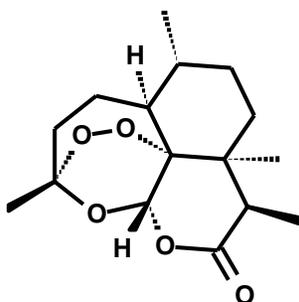
Sin embargo, estas pruebas no se pueden realizar sobre extractos coloreados (por ejemplo, con clorofilas) y es conveniente realizarlos en combinación con la cromatografía en capa fina para obtener buenos resultados.

Actividad biológica

Para las sesquiterpénlactonas se reportan varias actividades biológicas tales como: acción citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antibacterial, anti dermatitis en humanos, venenosa, insecticida, antimicótica, inhibidores del crecimiento de las plantas, y otras.

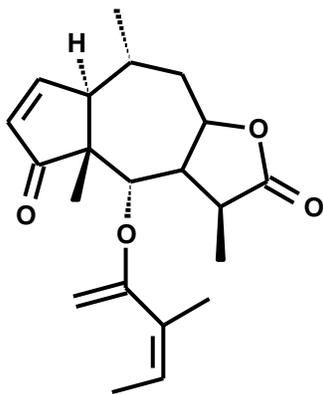
La actividad citotóxica de las sesquiterpenlactonas ha sido relacionada especialmente con el anillo lactónico provisto del grupo exometileno. A continuación, se presentan algunos ejemplos de estudios de actividad biológica de sesquiterpénlactonas naturales.

La artemisinina es una sesquiterpénlactona aislada inicialmente de *Artemisia annua*, pero también ha sido aislada de otras plantas del género *Artemisia*, de la familia de las compuestas. Esta sustancia es más activa contra el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, que la cloroquina, y sus derivados se usan actualmente combinada con otras sustancias para el tratamiento de esta enfermedad.



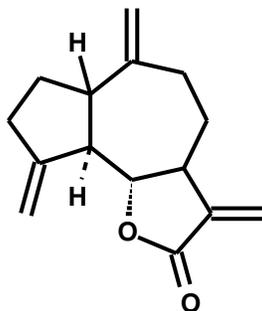
Artemisinina

Centipeda minima de la familia de las compuestas, es una hierba medicinal china, utilizada comúnmente para prevenir infecciones respiratorias y cáncer nasofaríngeo. De esta planta se aisló 6-O-angeloilenolina, que tiene potencial para el tratamiento del cáncer de pulmón.



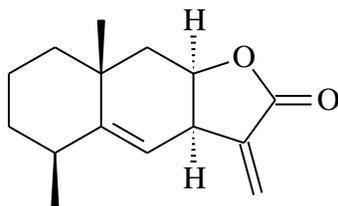
6-O-Angeloilenolina

Saussurea lappa, es otra medicina herbaria china, a la que se le atribuyen actividades biológicas múltiples como inhibir las respuestas inflamatorias, prevenir la proliferación de células cancerosas e inducir apoptosis. Esta planta contiene la sesquiterpénlactona dehidrocostus-lactona, que ha mostrado actividad *in vitro* contra células cancerosas.



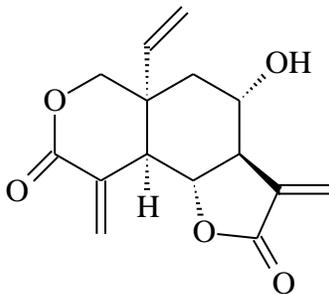
Dehidrocostus-lactona

La alantolactona es una sesquiterpénlactona aislada de *Inula helenium*, a la que se ha reportado tener actividad propiedades antiinflamatoria y anti-cáncer. Se ha mostrado que tiene potencial en el tratamiento de la inflamación asociada a desórdenes metabólicos, tales como la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.



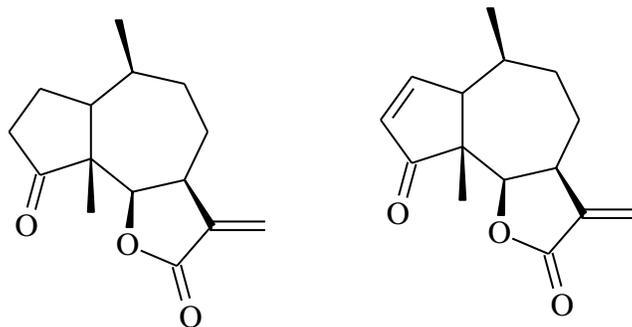
Alantolactona

La enfermedad del sueño es producida por el parásito *Trypanosoma brucei*, y *Vernonia lasiopus* es una planta africana usada tradicionalmente para curar problemas de indigestión, dolores de estómago, problemas gastrointestinales, gusanos, malaria, enfermedades venéreas, como purgante, etc. De esta planta se aisló la vernolepina, la cual ha mostrado una interesante actividad *in vitro* contra el parásito *T. brucei*. Una especie relacionada *Vernonia amygdalina* es una planta con potencial antihelmíntico, a partir de ella se han obtenido varias clases de compuestos, que incluyen varias sesquiterpénlactonas, flavonoides y saponinas esteroides; y se ha sugerido su uso como agente terapéutico o preventivo para reducir la toxicidad de los medicamentos normalmente utilizados contra esta clase de parásitos.



Vernolepina

La damsina y la ambrosina, aisladas de la especie suramericana *Ambrossia arborescens*, muestran potencial contra células tallo cancerosas.



Damsina

Ambrosina

Elephantopus scaber L. (Compuestas), es una planta ampliamente distribuida en la China. La planta entera la denominan *didancao*, y es utilizada en la medicina china como antifebril, diurética, antibacteriana y antiviral. También se usa para el tratamiento de hepatitis, tos, neumonía, bronquitis y dolor en las articulaciones. De esta planta se han aislado diez sesquiterpénlactonas tipo elemanólido, los cuales están asociados a una actividad antitumoral potencial.

Diferentes especies de plantas de las familias asteráceas, lamiáceas y mirtáceas presentan propiedades anti-tricomonas y dentro de los componentes bioactivos identificados se encuentran varias sesquiterpénlactonas.

Es interesante anotar que algunos sesquiterpenos que no poseen el ciclo lactónico, sino otros grupos éster, como los aislados de *Artemisia pérsica*, presentan potente actividad antiplasmodial.

Referencias bibliográficas

1. Adekenov SM. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. *Fitoterapia* 2017; 21: 16–30.
2. Merfort I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatog. A* 2002; 967: 115–130.
3. Gomes NGM, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Hybrid MS/NMR methods on the prioritization of natural products: Applications in drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 147: 234-249.
4. Bourgoua S, Rebey IB, Mkadmini K, Isoda H, Ksouri R, Ksouri WM. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties. *Food Res. Intern.* 2017; 99: 702-712.

5. Villar A., Rios JL, Simeon S, Zafra-Polo MC. New reagent for the detection of sesquiterpene lactones by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 1983; 303: 306-308.
6. Wagner H, Bladt S, *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, 2nd. Edition, Heidelberg, pág. 214, 2009.
7. Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2016; 33: 432–455.
8. Honoré S., Pedersen-Bjergaard S. Editors. *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*. 2015. John Wiley & Sons, Ltd. 123-172 pp.
9. Uddin AAJ, Ansari HN, Firdous S, Musharraf SG. Electrospray Tandem Mass Spectrometric Study of a Furo-Furan Lactone in *Heliotropium eichwaldi*. *J Chromatog. Sep. Tech.* 2015; 6:7.
10. Enzell, CR, Wahlberg I, Editors. Waller GR, Dermer OC. Terpenes and terpenoids. In: *Biochemical applications of mass spectrometry: first supplementary volume*, Wiley-Interscience, New York, 1980, 311-406 pp.
11. Formisano C, Sirignano C, Rigano D, Chianese G, Zengin G, Seo EJ. *et al.* Antiproliferative activity against leukemia cells of sesquiterpene lactones from the Turkish endemic plant *Centaurea drabifolia* subsp. *Detonsa*. *Fitoterapia* 2017; 120: 98–102.
12. Wu ZN, Zhang YB, Chen NH, Li MJ, Li MM, Tang W. *et al.* Sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their anti inflammatory activities. *Phytochemistry* 2017; 137: 81-86.
13. Morsy N, *Cardiac Glycosides in Medicinal Plants*, Intech Open. <http://dx.doi.org/10.5772/65963>.
14. Liu CX. Discovery and Development of Artemisinin and Related Compounds *Chin. Herb. Med.* 2017; 9: 101-114.
15. Wang Y, Yu RY, Zhang J, Zhang WX, Huang ZH, Hu HF. *et al.* Inhibition of Nrf2 enhances the anticancer effect of 6-O-angeloylenolin in lung adenocarcinoma. *Biochem. Pharmacol.* 2017; 129: 43–53.
16. Cai H, Qin X, Yang C. Dehydrocostus Lactone Suppresses Proliferation of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells Through Bcr/Abl-JAK/STAT Signaling Pathways. *J. Cell. Biochem.* 2017; 118: 3381–3390.
17. Kim M, Song K, Kim YS. Alantolactone Improves Prolonged Exposure of Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Inflammation Associated Glucose Intolerance and Insulin Resistance, *Front. Pharmacol.* 2017; 8: 405.

18. Kimani NM, Matasyoh JC, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. Anti-Trypanosomatid Elemanolide Sesquiterpene Lactones from *Vernonia lasiopus*. *Molecules* 2017; 22: 597.
19. Oyeyemi IT, Akinbiyi AA, Adewumi A, Adewumi, Aleshinloye AO, Oyeyemi OT. *Vernonia amygdalina*: A folkloric herb with anthelmintic properties Beni-Suef Univ. J. Bas. Appl. Sci. 2017; 7: 43-49.
20. Sotillo WS, Villagomez R, Smiljanic S, Huang X, Malakpour A, Kempengren S. *et al.* Anti-cancer stem cell activity of a sesquiterpene lactone isolated from *Ambrosia arborescens* and of a synthetic derivative. *Plos One* 2017; 12: e0184304.
21. Guo Y, Li M, Chen P, Wu Q, Gao C, Lu Y. *et al.* A pair of new elemanolide sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* L. *Magn. Reson. Chem.* 2017; 55: 677 – 681.
22. Mehriardestani M, Aliahmadi A, Toliat T, Rahimi R. Medicinal plants and their isolated compounds showing anti *Trichomonas vaginalis*- activity. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 88: 885–893.
23. Liua X, Ahlgrena S, Korthout HAAJ, Salomé-Abarca LF, Bayona LM, Verpoorte R, Choi YH. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography–based method. *J. Chromatog. A*, 2018; 1532: 198–207.

Capítulo 8

Otros derivados de AcetilCoenzima-A



Si bien los terpenoides constituyen uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios derivados biosintéticamente del acetyl coenzima-A, esta sustancia también es el precursor de otras sustancias de importancia biológica como los ácidos grasos, los cuales cumplen papeles fundamentales como componentes de membranas en los fosfolípidos, además de ser fuente de energía para diferentes procesos metabólicos. Además, los ácidos grasos a su vez son precursores en diferentes organismos de sustancias de interés farmacéutico como son los poli acetilenos, las prostaglandinas, las acetogeninas entre otros; los cuales presentan diferentes actividades biológicas. Todos estos compuestos, de manera general tienen la característica de no incluir en su estructura química los anillos aromáticos. Sin embargo, por una ruta biosintética alterna, denominada la ruta de las cadenas policetídicas; se originan sustancias como los antibióticos tipo tetraciclina, y sustancias con anillos aromáticos de diferentes clases como son los flavonoides y las quinonas mencionadas en el capítulo 2, y otros compuestos aromáticos que tienen como característica grupos oxigenados en disposición *meta* en el anillo aromático.

A continuación, se presentan algunos aspectos relevantes sobre algunas de estas sustancias naturales, especialmente sobre su biosíntesis y algunas técnicas de análisis.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos naturales incluyen fundamentalmente compuestos con cadenas hidrocarbonadas que oscilan generalmente entre los 4 y 30 átomos de carbono. La cadena hidrocarbonada puede contener una o varias insaturaciones. Las tablas 8.1 y 8.2 muestran listas de alcaloides con cadenas saturadas y con cadenas insaturadas, respectivamente.

Tabla 8.1. Ácidos grasos naturales de cadena par saturada.



n	Número total de carbonos	Nombre sistemático	Nombre común
1	4	n-Butanoico	Butírico
2	6	n-Hexanoico	Caproico
3	8	n-Octanoico	Caprílico
4	10	n-Decanoico	Cáprico
5	12	n-Dodecanoico	Laúrico
6	14	n-Tetradecanoico	Mirístico
7	16	n-Hexadecanoico	Palmítico
8	18	n-Octadecanoico	Esteárico

n	Número total de carbonos	Nombre sistemático	Nombre común
9	20	n-Eicosanoico	Araquídico
10	22	n-Docosanoico	Behénico
11	24	n-Tetracosanoico	Lignocérico
12	26	n-Hexacosanoico	Cerótico
13	28	n-Octacosanoico	Montánico
14	30	n-Triacontanoico	Melissico

Tabla 8.2. Algunos ácidos grasos monoinsaturados.

Número total de carbonos y enlaces dobles	Nombre sistemático	Nombre común
16:1	9(Z)-Hexadecenoico	Palmitoléico
18:1	9(Z)-Octadecenoico	Oléico
18:1	11(Z)-Octadecenoico	<i>cis</i> -Vaccénico
22:1	13(Z)-Docosenoico	Erúcico
18:2	9(Z),12(Z)-Octadecadienóico	Linoléico
18:3	9(Z),12(Z),15(Z)-Octadecatrienoico	α -Linoléico
18:3	6(Z),9(Z),12(Z)-Octadecatrienoico	γ -Linoléico
20:4	5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)-Eicosatetraenoico	Araquidónico
22:5	7(Z),10(Z),13(Z),16(Z),19(Z)-Docosapentaenoico	Clupadónico

Los ácidos grasos poliinsaturados contienen entre 18 y 22 átomos de carbono, y se les denomina comúnmente de acuerdo con la posición del enlace doble carbono-carbono ubicado en el extremo apolar de la cadena, como omega-3, omega-6, etc., dependiendo si están a 3 ó 6 carbonos de distancia de dicho extremo apolar. Para mencionarlos también se les nombra como ácidos ω -3, ω -6; aunque también se les nombra como ácidos n-3 ó n-6. Estos compuestos (sigla inglesa *PUFA*, *PolyUnsaturated Fatty Acids*), y en especial los omega-3 y omega-6 pueden proporcionar beneficios para la salud, además de proporcionar energía. Estos ácidos grasos son importantes para el mantenimiento de la salud y el bienestar humano, porque minimizan los riesgos de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas como artritis, diabetes y ciertos tipos de cáncer. Debido a que el

organismo humano no produce estos compuestos en suficiente cantidad, se les conoce como ácidos grasos esenciales y tienen que ser suplidos a través de la dieta. Los PUFA son abundantes en peces marinos, algas y algunas semillas vegetales. Los que se encuentran en aceites vegetales son de cadena hidrocarbonada corta, como el ácido α -linolénico (ALA C18:3 $\omega - 3$), y el ácido linoleico (LA, C18:2 $\omega - 6$). Los aceites de peces y algas contienen PUFAs de cadena larga como son ejemplos los ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega - 3$), docosapentaenoico (DPA, C22:5 $\omega - 3$), docosahexaenoico (DHA, C22:6 $\omega - 3$) y araquidónico (AA, C20:4 $\omega - 6$). Los PUFAs disponibles en el comercio provienen principalmente de aceites de peces como el atún, las sardinas, la macarela, arenque y trucha.

Los ácidos grasos son biosintetizados a partir de la acetilcoenzima-A, por procesos mediados enzimáticamente, que elongan la cadena hidrocarbonada con adiciones de dos unidades de átomos de carbono. De esta manera se producen ácidos como el esteárico, que tiene 18 átomos de carbono y su cadena hidrocarbonada es recta y saturada. El ácido esteárico y en general los ácidos grasos saturados son deshidrogenados enzimáticamente en posiciones específicas de la cadena hidrocarbonada para dar origen a los monoinsaturados, por ejemplo, el oleico. Una posterior des hidrogenación en otros sitios de la cadena hidrocarbonada da origen al ácido linoleico.

Los ácidos grasos naturales se pueden encontrar en forma libre o enlazados a glicerol (triglicéridos, por ejemplo), enlazados a esteroides (ésteres de esteroides), en las estructuras de fosfolípidos, entre otros. De acuerdo con esto se debe seleccionar el método de extracción. Para muchos propósitos se ha utilizado la mezcla cloroformo-metanol 2:1, la cual aseguran muchos autores, es ideal para la extracción de la fracción lipídica de muestras naturales. Para esto se requiere partir preferiblemente de muestras secas y molidas, con el fin de eliminar la interferencia del agua en el proceso de extracción. El proceso incluye la agitación, preferiblemente con ultrasonido, seguido de partición con agua, para separar la fase orgánica que contiene el material lipídico menos polar. Dada la toxicidad de estos solventes, es recomendable ensayar en la extracción preferiblemente con una mezcla de acetato de etilo y etanol 2:1. En algunos casos la extracción soxhlet con solventes orgánicos de baja polaridad, es superada en rendimiento por la extracción con ultrasonido con metanol a 60°C utilizando relaciones de 45:1 solvente-muestra vegetal, en peso.

Una vez obtenida la fase orgánica, esta se seca con sulfato de sodio anhidro, se concentra al vacío, y el extracto lipídico se puede analizar por cromatografía en capa fina. Para esto se pueden utilizar cromatoplacas de sílica gel, como eluyente hexano-acetato de etilo 4:1, y como revelador ácido fosfomolibdico, seguido de calentamiento a 105°C. En estas condiciones los ácidos grasos libres se observan como manchas ovoides de color azul de Rf aprox. 0.4, y los ésteres de esteroides y triglicéridos se observan como manchas azules de Rf aprox. 0.8-0.9. Los fosfolípidos por su polaridad no se mueven del punto de siembra.

Si se desea se pueden aislar en estas condiciones, la fracción de ácidos grasos libres y la mezcla de ésteres de esteroides y triglicéridos, pero si se desea obtener todo en forma de ácidos grasos libres, se puede someter a hidrólisis alcalina bien sea el extracto total, o la fracción aislada de triglicéridos y ésteres de esteroides. Para esto la fracción se somete a reflujo con NaOH 2N etanólico. El tiempo de reflujo dependerá de la cantidad a hidrolizar. Para menos de 50 mg de muestra, con una hora de reflujo es suficiente, pero se puede seguir el proceso de hidrólisis por cromatografía en capa fina en el sistema ya descrito. Una vez concluida la hidrólisis, la mezcla se deja enfriar, se neutraliza con HCl 2N acuoso, y se recuperan los ácidos grasos libres por partición con acetato de etilo.

La fracción de ácidos grasos libres se puede analizar por la técnica combinada cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de impacto electrónico, pero en forma de derivados ésteres metílicos. Los espectros de masas de los ésteres metílicos de muchos ácidos grasos naturales están disponibles en bases de datos comerciales. A manera de ejemplo, el espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, presenta con mayor intensidad los iones m/z 55, 74 (100%, pico base), 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227, 239, 241 y 270. Estos iones tienen como fórmula general $[\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_n]^+$. El ión más intenso m/z 74 se origina a través de un rompimiento tipo McLafferty. La secuencia de iones con diferencia de 14 unidades de masa como son m/z 87, 101, 115, etc., corresponde a rompimientos de enlaces sencillos carbono-carbono, como se ilustra en la 8.1. El ión molecular m/z 270 es consistente con el peso molecular correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$. El ión m/z 231, corresponde a la pérdida del grupo metoxilo.

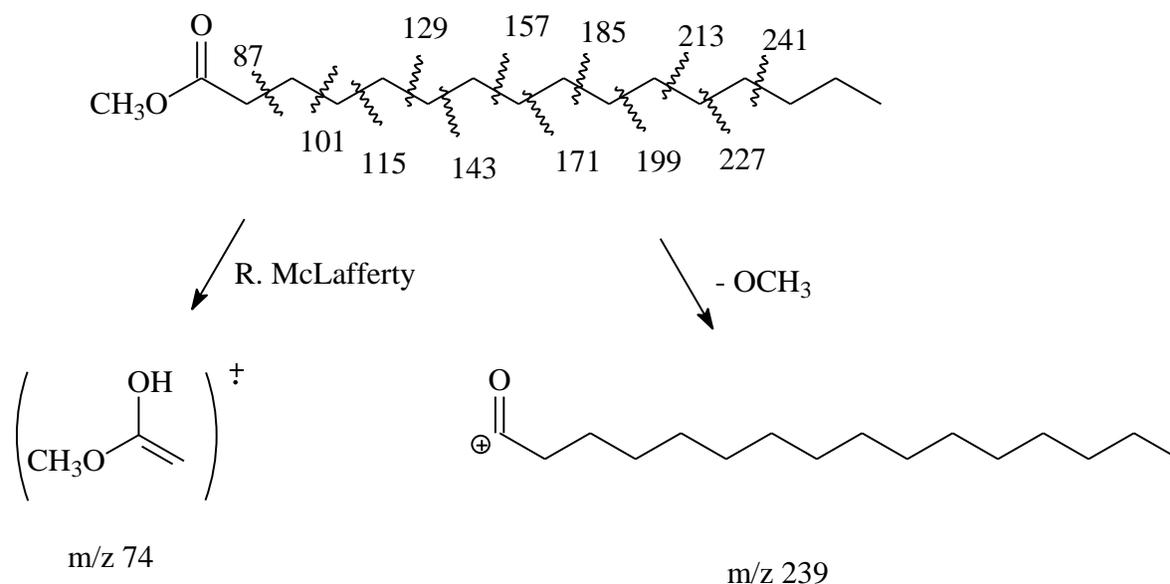


Figura 8.1. Esquema de la fragmentación del éster metílico del ácido palmítico, en espectrometría de masas de impacto electrónico.

En el caso de los ácidos grasos insaturados, el espectro de masas de impacto electrónico permite determinar el peso molecular y observar algunos fragmentos característicos de la cadena hidrocarbonada, pero no permite determinar la posición de la insaturación; para esto es necesario preparar el derivado pirrolidida del ácido graso y determinar su espectro de masas de impacto electrónico. A manera de ejemplo, el espectro de masas del derivado pirrolidida del ácido oleico, presenta los iones intensos m/z 113 (pico base) y 126, así como también el ión molecular m/z 335. Además, se observa una serie de iones m/z 140, 154, 168, 182 entre otros. El pico base m/z 113 se origina a través de un rompimiento McLafferty, para dar el ión con la estructura mostrada en la figura 8.3. Los iones m/z 126, 140, 154, etc., son originados por rompimientos simples carbono-carbono y tienen como fórmula general $[C_4H_8NCO(CH_2)_n]^+$. Pero adicionalmente se observan dos iones m/z 196 y 208, correspondientes a una diferencia de 12 unidades de masa. Estos iones permiten determinar la posición del enlace doble en el carbono 9.

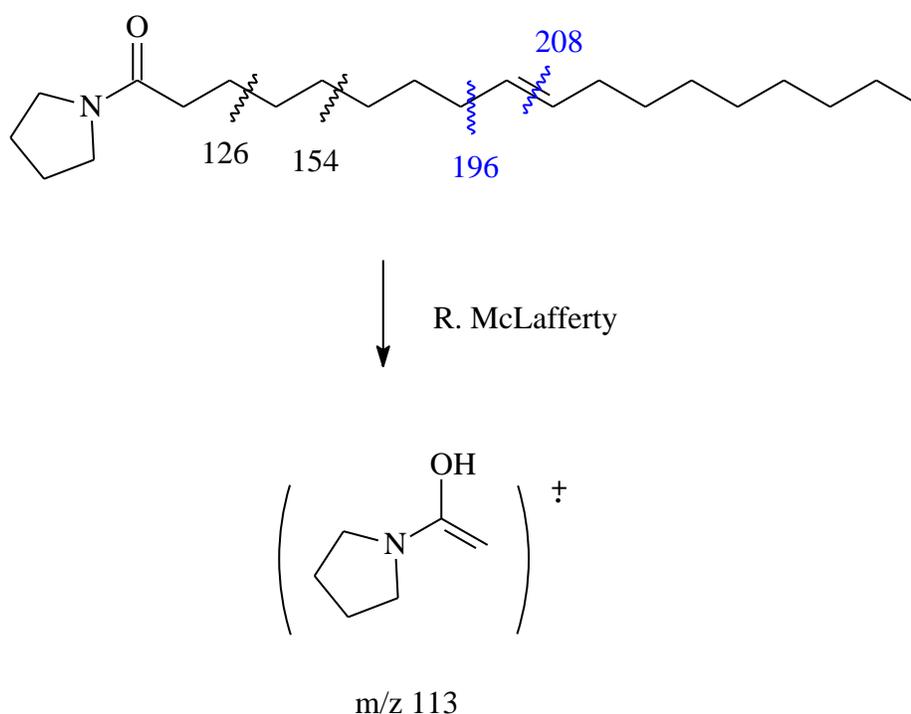


Figura 8.3. Esquema de la fragmentación del derivado pirrolidida del ácido oleico, en espectrometría de masas de impacto electrónico.

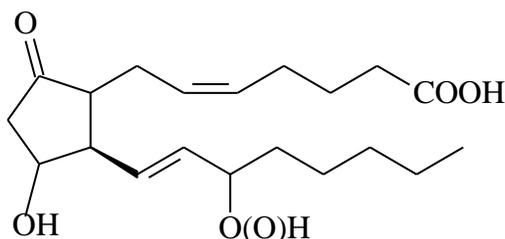
Para la interpretación de los espectros de masas y la identificación de los ácidos grasos, obtenidos con columnas de cromatografía de gases de diferente polaridad, además de las bases de datos, se cuenta con análisis multidimensionales que permiten inclusive asignar posiciones y geometrías de los enlaces dobles, sin necesidad de derivatizaciones posteriores.

A partir de los derivados ésteres metílicos es posible obtener también los derivados pirrolidida, los cuales permiten asignar la posición de los enlaces dobles carbono-carbono en la cadena hidrocarbonada. Actualmente se cuenta con herramientas en línea de acceso abierto como LipidXplorer®, la cual permite el análisis de espectros de masas tándem de las diferentes clases de lípidos.

Prostaglandinas y tromboxanos

Los eicosanoides son una gran clase de lípidos bioactivos naturales derivados de la oxidación del ácido araquidónico (AA), e incluyen las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX), los leucotrienos (LT), las lipoxinas (LX), los ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs), y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs). Son sustancias de vida media corta que actúan en procesos patológicos y fisiológicos que incluyen el cáncer, las enfermedades inflamatorias, la sanación de heridas, etc.

Las prostaglandinas son una clase de eicosanoides conocidos como prostanoides, que contienen 20 átomos de carbono y un anillo ciclopentano. A su vez, se dividen en dos grupos: prostaciclopentanos y tromboxanos. Los primeros se clasifican con base en las estructuras de sus anillos ciclopentano (denotados utilizando una letra desde la A hasta la K), y el número de enlaces dobles en sus cadenas hidrocarbonadas, que se denotan utilizando un número subíndice del 1 al 3. Mientras los tromboxanos consisten en TXA y TXB (figura 8.4). Por ejemplo, la estructura:



Corresponde a la Prostaglandina-E₂ (PGE₂), porque el anillo ciclopentano es del tipo E, y las cadenas R₁ y R₂, contienen dos enlaces dobles.

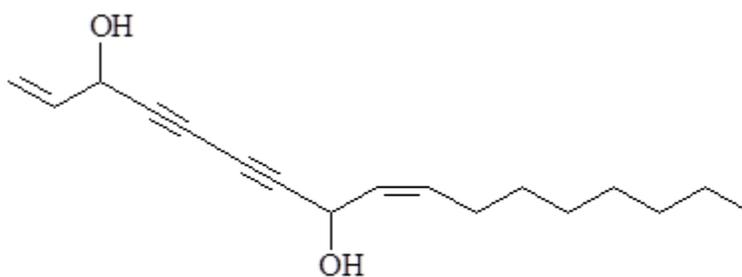
Las prostaglandinas están involucradas en diferentes funciones biológicas del organismo humano, que incluyen la regulación del sistema inmune, la fiebre y el dolor asociados a la inflamación, la hemostasis y la presión sanguínea. También se han encontrado en organismos no mamíferos como aves, algunos peces, trematodos, moluscos, corales, algas rojas y hongos. Entre los organismos diferentes a mamíferos en los que se han encontrado prostaglandinas están los corales blandos *Gersemia fruticosa* y *Plexaura homomalla*, los crustáceos *Gammarus sp.*, *Caprella sp.*, *Daphnia pulex*, *Homarus americanus*, y *Petrolisthes cinctipes*; en el alga roja *Gracilaria vermiculophylla* y en cordados primitivos *Ciona savignyi* y *Ciona intestinalis*. El papel de las prostaglandinas en estos últimos organismos es aun motivo

de investigación, pero algunos autores afirman que cumplen funciones importantes en insectos y artrópodos, y como mecanismo de defensa contra los depredadores en diferentes organismos marinos. Además, que presentan un interesante potencial farmacológico contra procesos de inflamación, y como antitumorales y antivirales.

Poliacetilenos

Otros derivados de los ácidos grasos son los poliacetilenos, que como su nombre lo indica, contienen en su estructura química uno o varios enlaces triples carbono-carbono. La figura 8.5 muestra ejemplos de varios de ellos aislados del ginseng.

Los poliacetilenos se han aislado de organismos como plantas, hongos, organismos marinos, insectos y humanos. En general presentan diversas actividades biológicas, lo que los hace sustancias de interés para la medicina, la farmacología, la química medicinal y la industria farmacéutica. En alimentos como la zanahoria, el apio, la lechuga, el perejil, la alcachofa y el tomate, se reportan poli acetilenos del tipo falcarinol. Las familias vegetales que más se reportan como fuentes de estos compuestos incluyen las apiáceas, las araliáceas, las asteráceas, las campanuláceas, las olacáceas, las pitosporáceas y las santaláceas.



Falcarinol

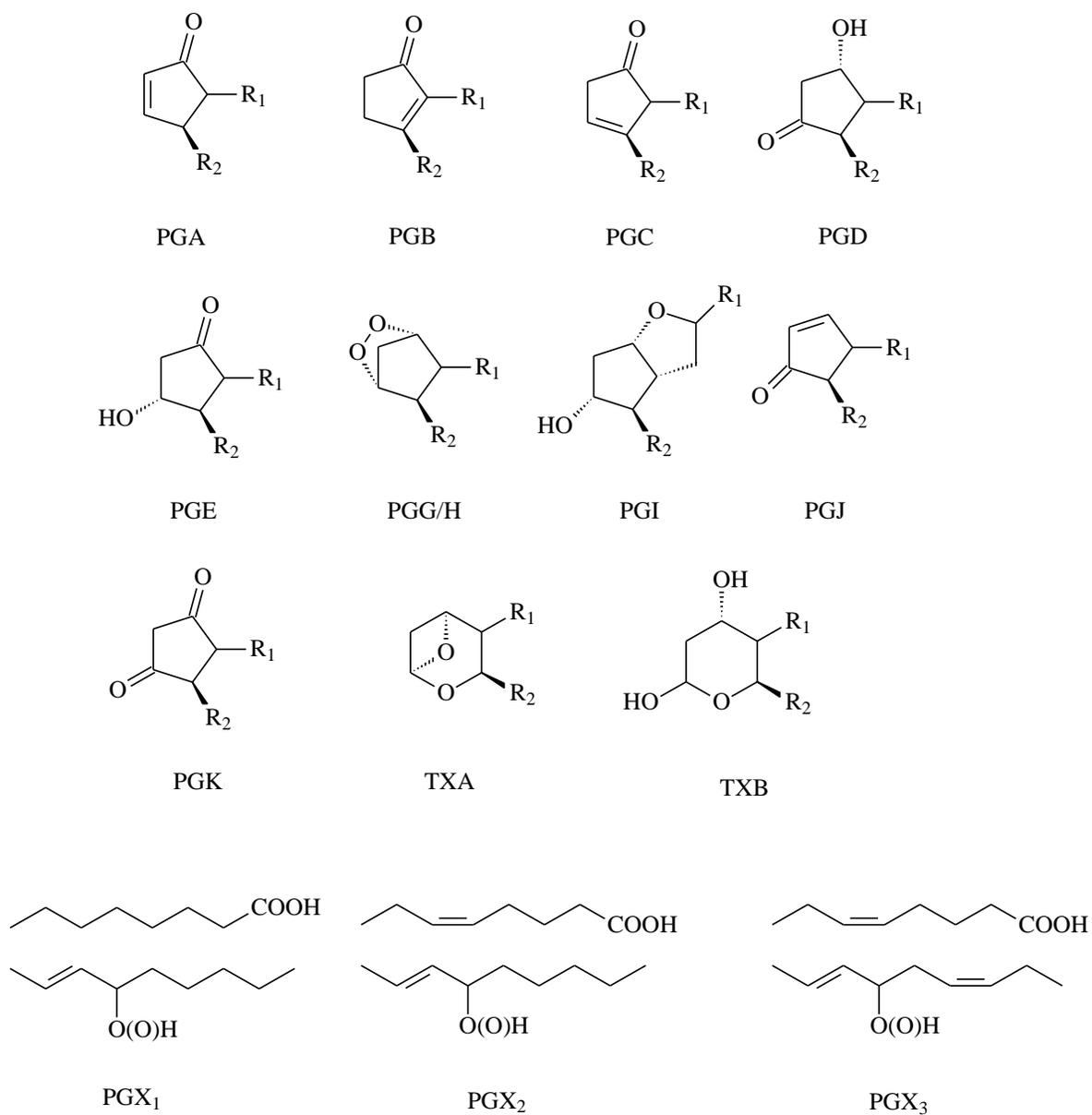


Figura 8.4. Nomenclatura de prostaglandinas. Arriba los núcleos probables tipo ciclopentano o pirano para tromboxanos, y abajo las tres cadenas R₁ y R₂.

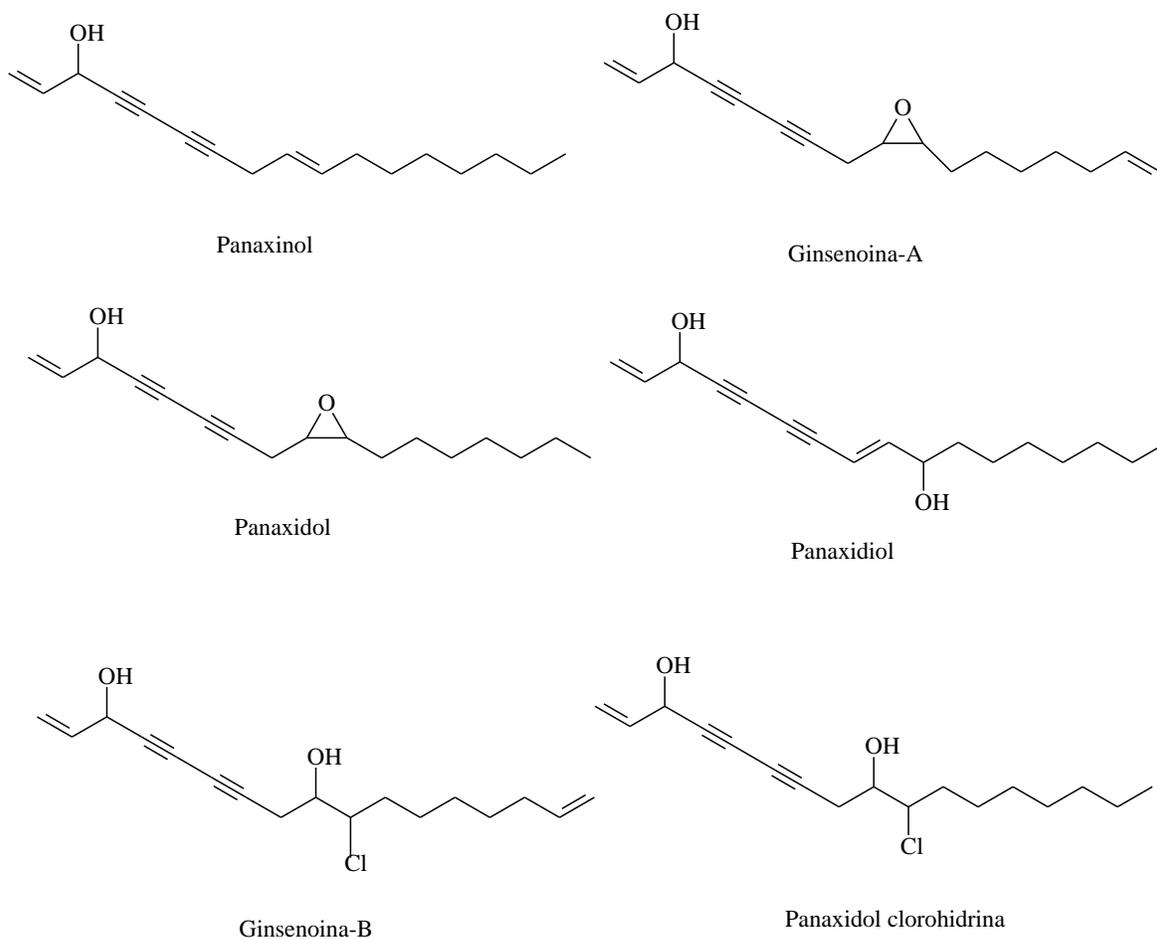


Figura 8.5. Estructuras químicas de varios compuestos poli acetilénicos aislados de las raíces de *Panax ginseng*.

En el caso de los organismos marinos, se han reportado poli acetilenos de cadena corta (C_{15} - C_{20}) con anillos oxigenados de 6, 7, 8 y 9 átomos, especialmente en algas, mientras que organismos como las esponjas marinas contienen poli acetilenos de cadenas hasta de más de 40 átomos de carbono, generalmente sin ciclaciones. En estos organismos también es común la presencia de sustituyentes como el bromo y el cloro, lo cual es una característica de muchos metabolitos marinos. En este caso se han reportado actividades biológicas que incluyen antihongos, antimicrobiana, inhibición de la transcriptasa reversa del VIH, citotóxica. Además de inducir la metamorfosis de larvas de ascidias, prevenir la invasión de larvas de percebe e inhibir la fertilización de gametos de estrellas de mar.

Los poliacetilenos son derivados biogenéticamente de ácidos grasos como el esteárico, el oleico y el linoleico. La figura 8.6, muestra el esquema propuesto para la biogénesis de compuestos acetilénicos a partir de ácidos grasos insaturados, puede observarse que los enlaces dobles $C=C$ y los enlaces triples $C\equiv C$, se originan mediante procesos que se resumen en des hidrogenaciones mediadas por enzimas.

Los métodos para la extracción incluyen el uso de microondas y el uso de ultrasonido, con solventes como metanol y etanol. Sin embargo, se reporta que la extracción por reflujo con metanol es más eficiente que el uso de ultrasonido a temperatura ambiente. Una vez extraídos se pueden fraccionar por cromatografía en columna con mezclas de diferentes proporciones de hexano-acetato de etilo.

Los poliacetilenos muestran en sus espectros UV bandas características entre 200 y 410 nm. Los que tienen el sistema diino ($-C\equiv C-C\equiv C-$) muestran bandas en 230, 240 y 255 nm. Los que contienen el sistema diino-eno ($-C\equiv C-C\equiv C-C=C-$) muestran bandas en 210, 238, 251, 265 y 280 nm.

Para la separación se utiliza HPLC en fase reversa con mezclas como acetonitrilo-agua en diferentes proporciones, y la cromatografía en contracorriente de alta velocidad, de la cual se afirma es un método simple, eficiente y económico.

Cuando se analizan por HPLC acoplado a espectrometría de masas con detector APCI, se pueden obtener sus iones cuasimoleculares $M-H^+$. También se reportan análisis con HPCL acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (*Time of flight*).

En RMN- ^{13}C , las señales de los carbonos acetilénicos se observan generalmente entre 60 y 85 unidades de desplazamiento químico. Por ejemplo, en el capileno, aislado de *Artemisia ordosica*, los desplazamientos de los carbonos acetilénicos se presentan en la estructura mostrada a continuación. Los valores en negro corresponden a los desplazamientos químicos reportados, y los mostrados en azul, a los calculados con la herramienta en línea nmrDB.org.

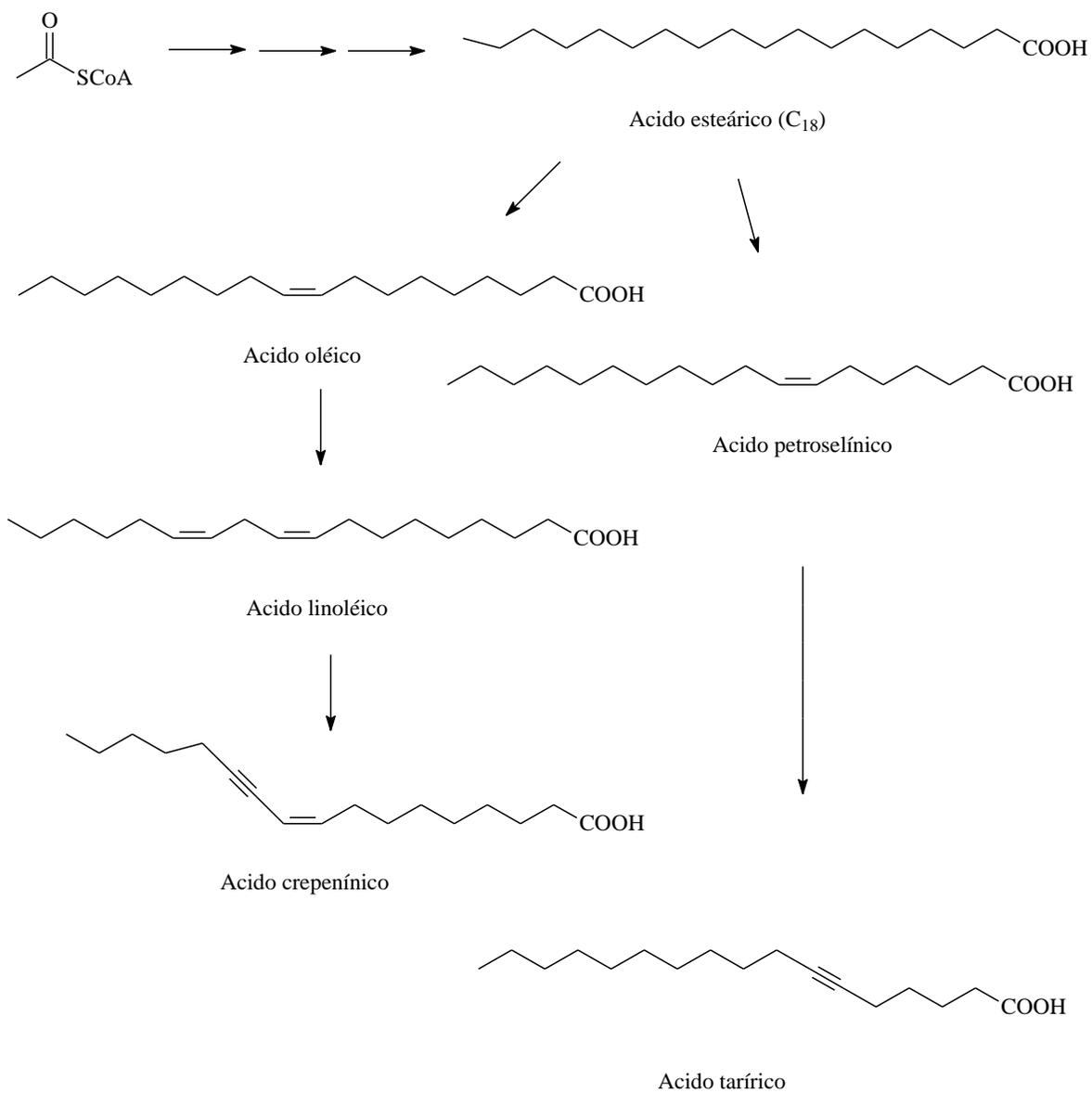
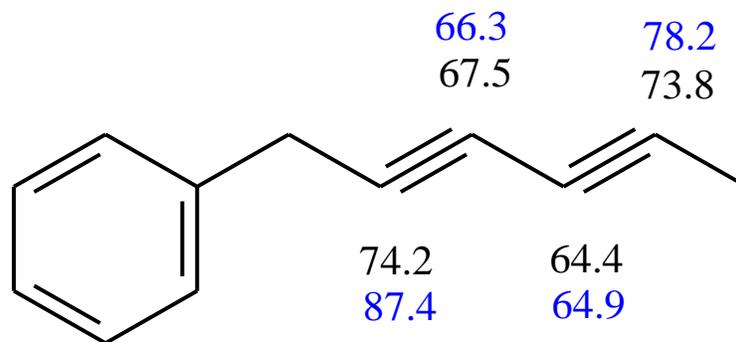


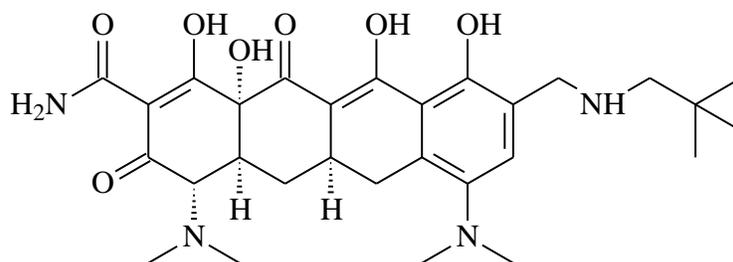
Figura 8.6. Esquema biogénico simplificado de compuestos acetilénicos a partir de ácidos grasos saturados e insaturados.



Tetraciclinas y anfotericinas

La ruta de la acetilcoenzima-A no solo lleva a una gran cantidad de compuestos como los terpenoides, los ácidos grasos, los poliacetilenos, las prostaglandinas, entre otros, sino que también mediante una ruta conocida como la de las cadenas policetídicas o del malonato, da origen a una gran cantidad de sustancias con anillos aromáticos -como se describe a manera de ejemplo con las antraquinonas en el capítulo 2- y a compuestos tan importantes como las anfotericinas, las nistatinas y las tetraciclinas producidas por diferentes microorganismos.

Las tetraciclinas fueron descubiertas en los 1940s, y son antibióticos con un amplio espectro de actividad contra microorganismos *Gram+* y *Gram-*. Su uso se ha limitado a personas adultas por su capacidad quelante con el calcio y sus efectos gastrointestinales. Sin embargo, se han venido desarrollando nuevos derivados con mejores propiedades como la omadaciclina, un derivado semisintético que además de presentar actividad potente contra bacterias *Gram+*, *Gram-*, anaerobias, aerobias y típicas.



Omadaciclina

Otro ejemplo de la importancia farmacéutica de las tetraciclinas es el compuesto SP2575, aislado de *Streptomyces sp.* Que además presenta actividad antitumoral contra varias líneas celulares.

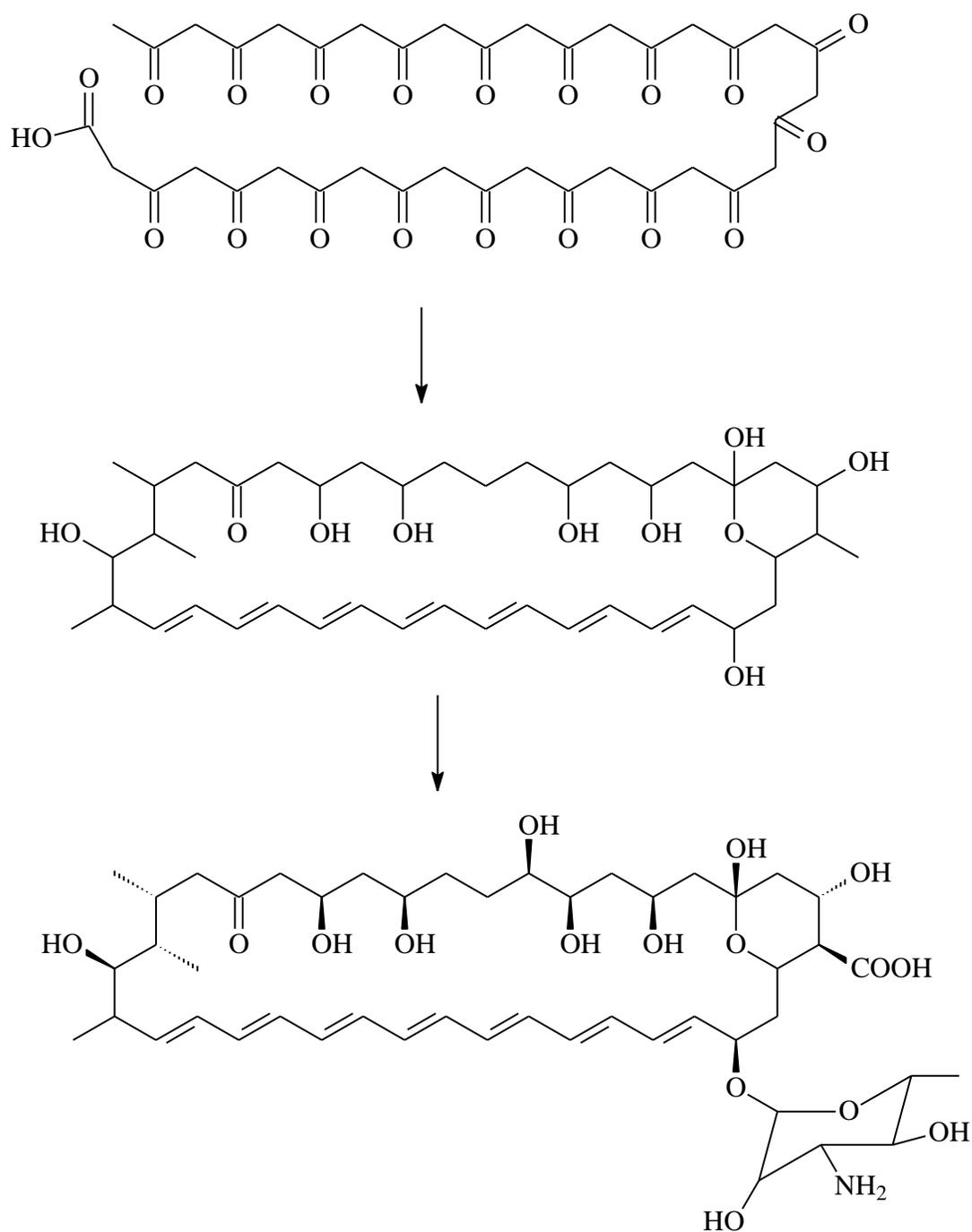
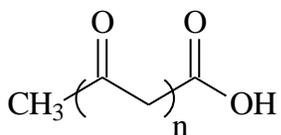


Figura 8.8. Esquema biogénico para la anfotericina-B, a partir de una cadena policetídica.

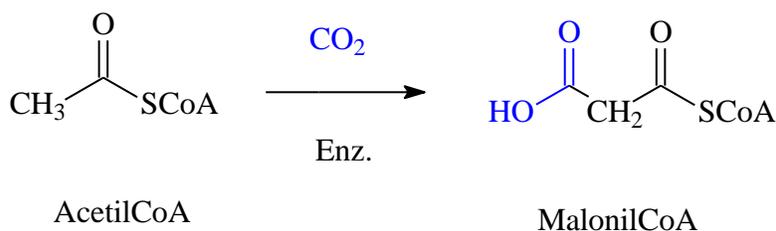
Compuestos aromáticos derivados de cadenas policetídicas

Como se mencionó, además de la gran cantidad de metabolitos secundarios, que generalmente no contienen anillos aromáticos, como los terpenoides; la ruta de la acetilcoenzima-A también da origen a compuestos aromáticos, que también de manera

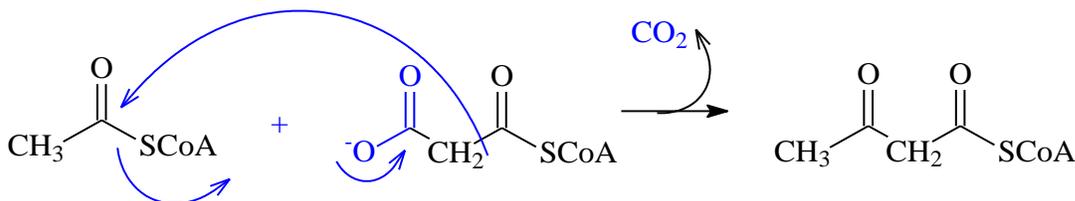
general contienen sustituciones *meta*-dioxigenadas en su estructura molecular. Esto se explica a través de la formación de las cadenas poliketídicas, que tienen la fórmula general:



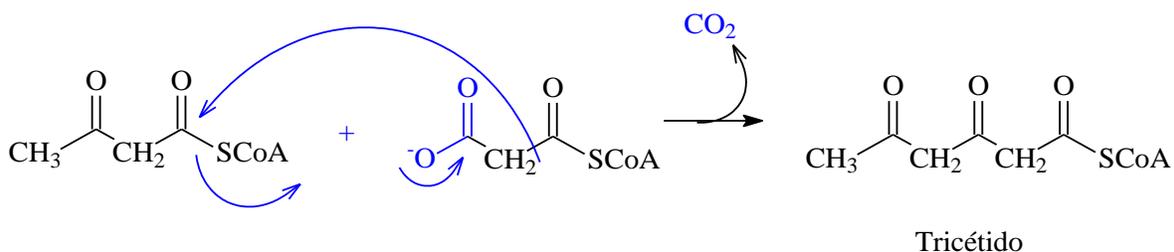
Para la formación de estas cadenas poliketídicas, la acetilcoenzima-A es “carbonatada” enzimáticamente, lo que origina la malonilcoenzima-A:



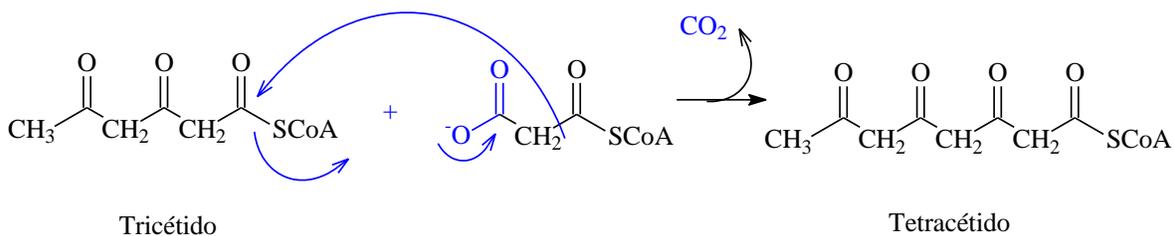
La formación de la malonilcoenzima-A puede unirse a la de acetilcoenzima-A mediante el mecanismo:



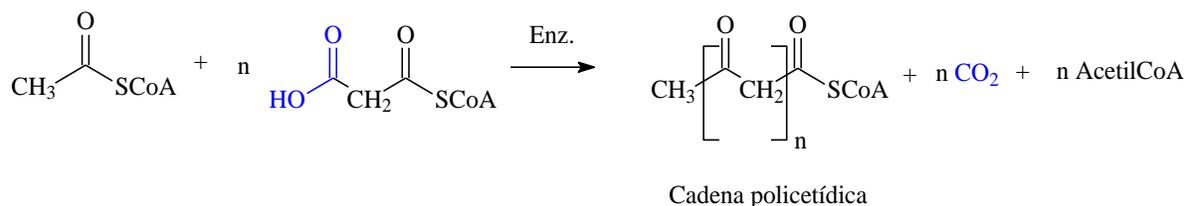
La molécula formada a su vez, se une a una nueva molécula de malonilcoenzima-A, para generar un tricétido:



Este proceso se repite mecanísticamente, para dar origen a un tetracétido:



Si se siguen adicionando moléculas de malonilcoenzima-A, se generan sucesivamente un hexacétido, un octacétido, un decacétido, etc. Esto se puede resumir en la expresión general:



Las cadenas policetídicas (o policétidos) así formadas se pueden plegar de diferentes maneras, para dar origen a diferentes compuestos aromáticos, tal como se ilustra en la figura 9.6. El proceso de formación de enlaces dobles C=C, entre los grupos carbonilos y los metilenos, ocurre mediante reacciones de condensación (eliminación de moléculas de agua). En la figura se puede observar también como a partir de un mismo pentacétido, se puede dar origen a dos compuestos aromáticos distintos, dependiendo de la forma en que se pliegue la cadena policetídica antes de la condensación.

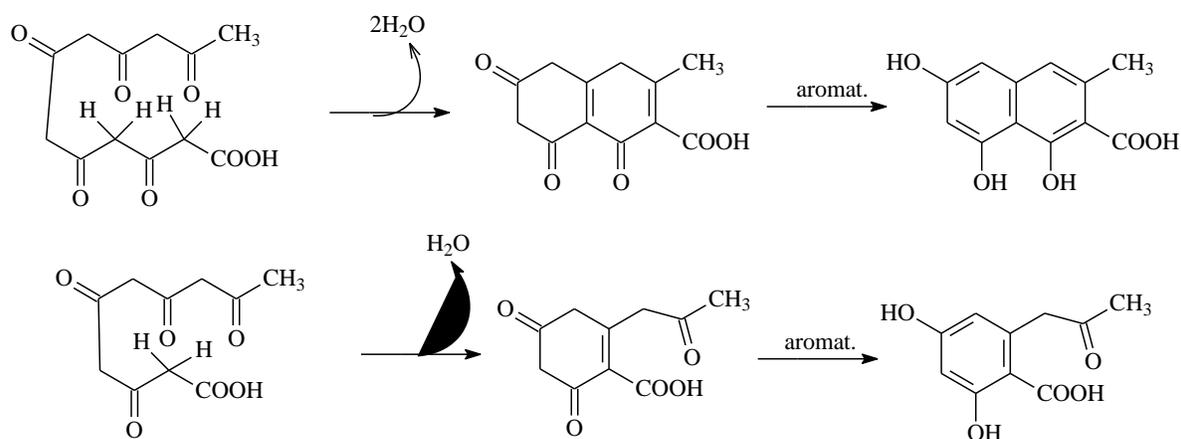


Figura 9.6. Esquema biogénico que explica como a partir de un pentacétido, se puede dar origen a dos compuestos aromáticos distintos, pero que tienen como característica el patrón de oxigenación *meta*.

Un ejemplo de este proceso es la biogénesis del heterocornol-B, aislado de *Pestalotiopsis heterocornis* (Figura 8.9).

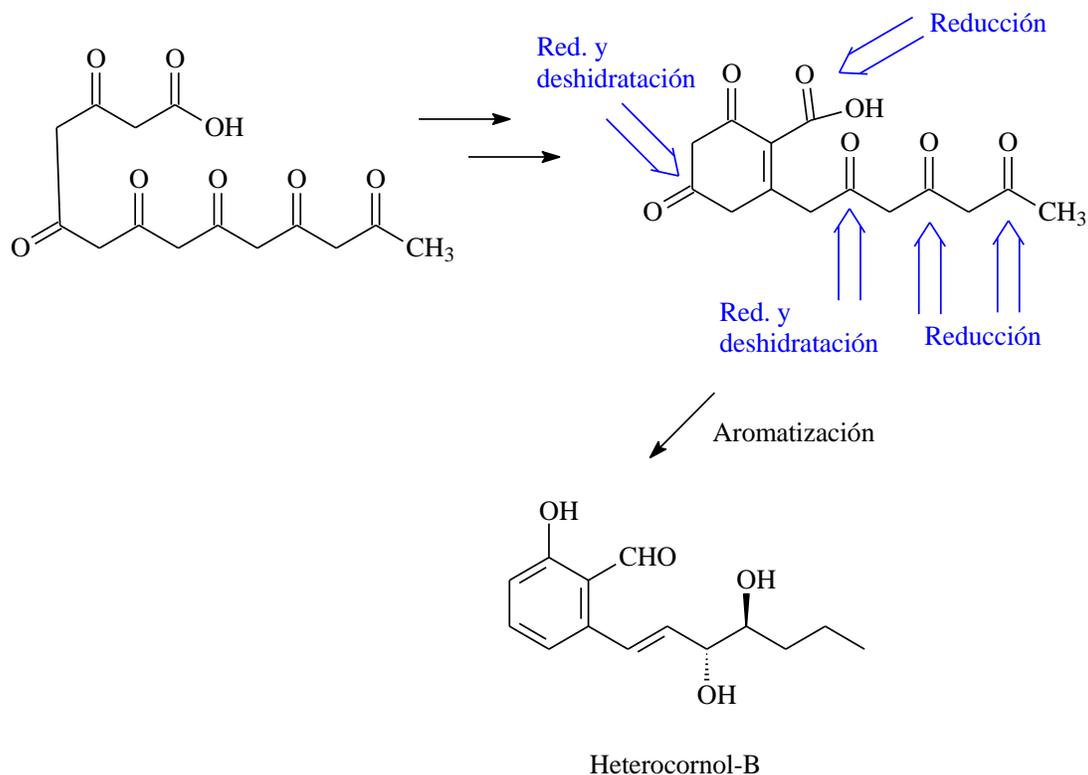


Figura 9.7. Esquema biogénico del heterocornol-B (19).

Referencias bibliográficas

1. Mann J, Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe D. V., Harborne J. B., Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance, Addison Wesley Logman Ltd., Essex, England, 1996, 241-242 pp.
2. Hartig C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography–mass spectrometry database. *J. Chromatog. A* 2008; 1177: 159–169.
3. Wilson Rodríguez, Oscar Osorno, Freddy A. Ramos, Carmenza Duque, Sven Zea New fatty acids from Colombian Caribbean Sea Sponges *Biochemical Systematics and Ecology* 38 (2010) 774–783.
4. Elizabeth Berry, Yanzhou Liu, Li Chen, Austin M. Guo Eicosanoids: Emerging contributors in stem cell-mediated wound healing *Prostaglandins & other Lipid Mediators* (2016).
5. Min-Ju Seo, Deok-Kun Oh Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis *Progress in Lipid Research* 66 (2017) 50–68.
6. Kristella Hansen, Külliki Varvas, Ivar Järving, Nigulas Samel Novel membrane-associated prostaglandin E synthase-2 from crustacean arthropods *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 174 (2014) 45–52.

7. Isolation and characterization of bioactive polyacetylenes *Panax ginseng* Meyer roots Chia-Rou Yeo, Jin-Jie Yong, David G. Popovich Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 139 (2017) 148–155.
8. Roberto Negri Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances Fitoterapia 106 (2015) 92–109.
9. Zhen-Fang Zhou, Marialuisa Menna, You-Sheng Cai, and Yue-Wei Guo Polyacetylenes of Marine Origin: Chemistry and Bioactivity Chem. Rev. 2015, 115, 1543–1596.
10. Jae-Won Lee, Hyung Won Ryu, Su Ui Lee, Tae Hyun Son, Hyun Ah Park, Mun Ock Kim, Heung Joo Yuk, Kyung-Seop Ahn, Sei-Ryang Oh Protective effect of polyacetylene from *Dendropanax morbifera* Leveille leaves on pulmonary inflammation induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide Journal of Functional Foods 32 (2017) 358–366.
11. Minglong Wang, Huijuan Zou, Qibin Chen, Jianguo Cao, Haji Akber Aisa, Guozheng Huang Isolation of new polyacetylenes from the roots of *Eurycoma longifolia* via high-speed counter-current chromatography Journal of Chromatography B, 1055–1056 (2017) 39–44.
12. Zhe Zhang, Shan-shan Guo, Wen-juan Zhang, Zhu-feng Geng, Jun-yu Liang, Shu-shan Dua, Cheng-fang Wang, Zhi-wei Deng Essential oil and polyacetylenes from *Artemisia ordosica* and their bioactivities against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) Industrial Crops and Products 100 (2017) 132–137.
13. Prabhavathi Fernandes, Evan Martens Antibiotics in late clinical development Biochemical Pharmacology 133 (2017) 152–163.
14. Je Won Park, Sang-Jip Nam, Yeo Joon Yoon Enabling techniques in the search for new antibiotics: Combinatorial biosynthesis of sugar-containing antibiotics Biochemical Pharmacology 134 (2017) 56–73.
15. Patrick Caffrey Dissecting complex polyketide biosynthesis Computational and Structural Biotechnology Journal Volume No: 3, Issue: 4, October 2012, e201210010.
16. François-Xavier Lussier, David Colatriano, Zach Wiltshire, Jonathan E. Page, Vincent J. J. Martin Engineering Microbes for Plant Polyketide Biosynthesis Computational and Structural Biotechnology Journal Volume No: 3, Issue: 4, October 2012, e201210020.
17. Jesus F. Barajas, Jacquelyn M. Blake-Hedges, Constance B. Bailey, Samuel Curran, Jay. D. Keasling Engineered polyketides: Synergy between protein and host level engineering Synthetic and Systems Biotechnology 2 (2017) 147-166.
18. Hui Lei, Xiuping Lin, Li Han, Jian Ma, Kailin Dong, Xingbo Wang, Jialiang Zhong, Yu Mu, Yonghong Liu, Xueshi Huang Polyketide derivatives from a marine-sponge-associated fungus *Pestalotiopsis heterocornis* Phytochemistry 142 (2017) 51-59.

Capítulo 9

Metabolitos de hongos



Además de los metabolitos secundarios que se encuentran en los organismos vegetales y animales, el reino de los hongos incluye muchos macro- y microorganismos, que son fuentes de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. Los hongos han sido utilizados a través de la historia para fines mágico-religiosos y en la alimentación, también han sido un problema para la agricultura, especialmente debido a las micotoxinas que producen algunos hongos filamentosos. En el primer caso están los denominados hongos sagrados, que incluyen *Amanita muscaria*, varias especies de *Psilocybe* y *Claviceps purpurea*. Entre los más conocidos están los denominados alcaloides del *ergot* que se obtienen del hongo *Claviceps purpurea*, que es un parásito del centeno o cornezuelo, y que han servido para el desarrollo de medicamentos utilizados para el tratamiento de migrañas, inhibidores de prolactina, anti Parkinson, entre otros usos. También es el caso de los hongos del género *Penicillium*, gracias a los cuales se obtuvo inicialmente el antibiótico tan importante como es la penicilina. También son conocidos por ser la fuente de ergosterol, una sustancia precursora de las vitaminas D, que son importantes en diferentes procesos fisiológicos humanos. Estos y otros ejemplos se han logrado gracias a la investigación de los hongos encontrados en diferentes hábitats terrestres, pero recientemente se han iniciado estudios con hongos del mar, los cuales se constituyen en una despensa hasta ahora poco conocida y explorada, de metabolitos secundarios de interés para desarrollar productos útiles para el mantenimiento de la salud, como las penicilinas, las cefalosporinas, las ciclosporinas, las estatinas, entre otros.

Se calcula que existen en la naturaleza unas 1.5 millones de especies de hongos, de los cuales solo un 10% ha sido clasificado taxonómicamente. Se clasifican en un reino diferente, porque a diferencia de los vegetales no poseen pared celular, sino quitina; y no realizan la fotosíntesis. Una clasificación breve los subdivide en basidiomicetos, ascomicetos, zigomicetos, oomicetos, deuteromicetos (hongos imperfectos), y microsporidiomicetos. Los deuteromicetos incluyen géneros como *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

Los hongos producen diversidad de compuestos que incluyen desde antibióticos hasta micotoxinas. Todos estos compuestos son producidos básicamente por tres rutas: la del ácido mevalónico que da origen a compuestos tales como terpenoides y esteroides; la del ácido shikímico que da origen a muchos compuestos aromáticos y a alcaloides aromáticos; y la de las cadenas policétídicas, que da origen a ácidos grasos, otros compuestos aromáticos, etc.

Aunque los antibióticos han sido la gran contribución de los hongos para la salud humana, se vienen encontrando nuevas sustancias, y más importante con un mayor potencial uso farmacéutico gracias a las diferentes actividades biológicas que presentan. La tabla 9.1 presenta una lista de metabolitos, sus fuentes y sus actividades biológicas reportadas.

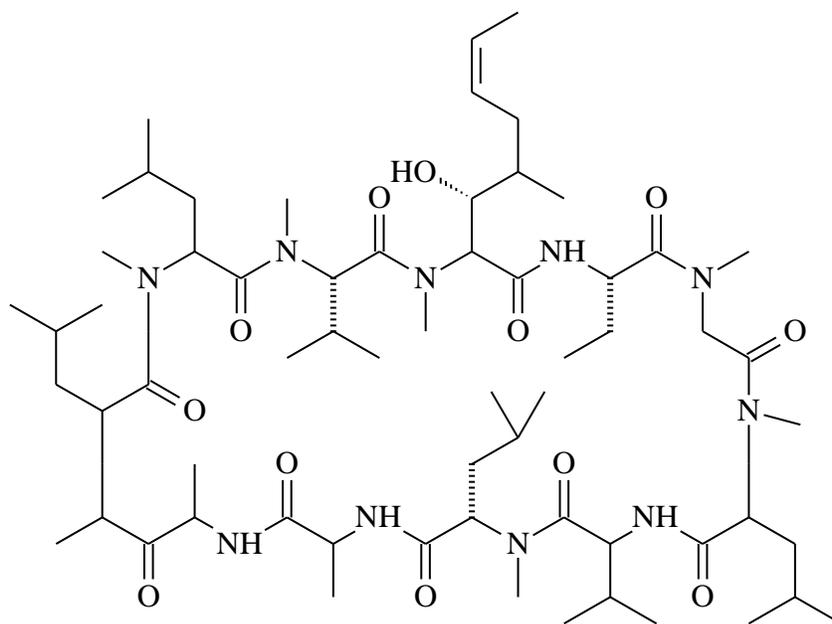
Tabla 9.1. Ejemplos de metabolitos bioactivos de hongos y sus actividades biológicas.

Metabolitos	Fuente	Actividad Biológica
Ascomiconona-B y 6-desoxifusarubina	<i>Biatrispora sp.</i>	Citotóxica
Asperterpenoide-A, Asperlonas A y B, mitorubrina	<i>Aspergillus sp.</i>	Inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa B, de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Aspecetolactonol, aspironol, epiaspinonadiol	<i>Aspergillus sp.</i>	Citotóxica a líneas de cáncer humano
Apicidina-F	<i>Fusarium fujikuroi</i>	Antimalárica
Beauvericina	<i>Fusarium sp.</i>	Contra <i>Trypanosoma sp.</i>
Citrinina	<i>Penicillium sp.</i> , asociado a esponja	Antibacteriana y citotóxica
Cladosina-C	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Antiviral, Contra influenza A H1N1
Cercosporenos-F	<i>Cercospora sp.</i>	Citotóxica a líneas celulares de cáncer, induce autofagia en células HCT116
1-(2,6-dihidroxifenil)pentan-1-ona	<i>Cryptosporiopsis sp.</i>	Antibacteriana
6,8-di-O-metilaverufina	<i>Aspergillus versicolor</i>	Antibacteriana
Dihidronaftalenona-2	<i>Nodulisporium sp.</i>	Antimicobacteriana
Dinapinona AB2	<i>Talaromyces pinophylus</i>	Inhibición síntesis de triglicéridos en células de mamífero
Fumiquinazolina Q y Protuboxepina-E	<i>Penicillium expansum</i>	Efecto mitigatorio de bradicardia y actividad vasculogénica
Gliotoxina	<i>Aspergillus sp.</i>	Citotóxica células HeLa
Ganoleucoinas A y C	<i>Ganoderma leucocontextum</i>	Inhibición HMG-CoA reductasa
4-hidroximelleina	<i>Phoma sp.</i>	Inhibición células leucemia murina P-388

Metabolitos	Fuente	Actividad Biológica
Herquedicetal	<i>Penicillium sp.</i>	Contra <i>S. aureus</i> sortasa A
Hispidina	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	Antioxidante
Isosclerona	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Antiproliferativa, células MCF-7 cáncer de seno
Nodulosporividirina-G	<i>Nodulisporium sp.</i>	Inhibición de agregación de amiloides β 42
Neoquinulina-A	<i>Eurotium sp.</i>	Anti inflamatoria
Pestalotiopsona-A	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Antibacteriana
Poliporusterona-B	<i>Polyporus umbellatus</i>	Antitumoral, células HepG2
Fenilpiropenos E y F	<i>Penicillium concentricum</i>	Citotóxica, células MGC-803
Pinazafilona-B y penifupirona	<i>Penicillium sp.</i>	Inhibición de α -glucosidasa
Gliotoxina reducida, 6-acetilbis(metil)gliotoxina	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	Citotóxica y anti bacteriana
Solaninaftoquinona	<i>Fusarium solani</i>	Citotóxica, células MCF-7 cáncer de seno
Sorbicatecoles A y B	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Antiviral, virus influenza A (H1N1)
Estemfiperilenol	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Antifúngica y citotóxica, células HCT116
Verrucosidina	<i>Penicillium sp.</i>	Antimicobacteriana

Ciclosporinas

Las ciclosporinas son un grupo de oligopéptidos cíclicos apolares, siendo la ciclosporina-A, el más conocido, y que posee actividad inmuno supresora. Es utilizada ampliamente en los procesos de trasplante de corazón, hígado y riñón.



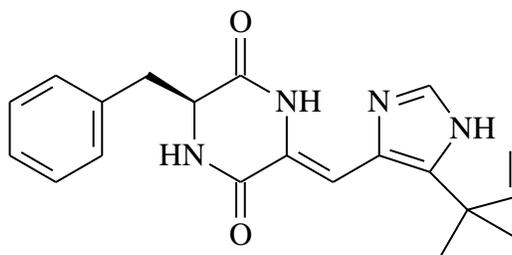
Ciclosporina-A

La ciclosporina-A (CyA), se utiliza en numerosas enfermedades como la enfermedad de Graves, uveítis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, psoriasis, artritis reumatoide, y ciertas nefropatías donde se involucren factores inmunológicos. Por estas propiedades, la ciclosporina-A se prepara por métodos biotecnológicos, como la fermentación sumergida.

Metabolitos con potencial anti-cáncer

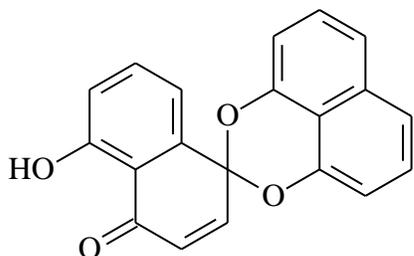
Algunos metabolitos obtenidos de hongos presentan propiedades antitumorales importantes, por lo cual varios se encuentran en fases de ensayos preclínicos y clínicos.

La fenilalhistina, aislada de *Aspergillus ustus*, es un derivado de fenilalanina con un anillo imidazol. Esta sustancia ha mostrado actividad potente contra diferentes líneas de células de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones. Un derivado sintético denominado pinabulina presenta también actividad antitumoral potente.

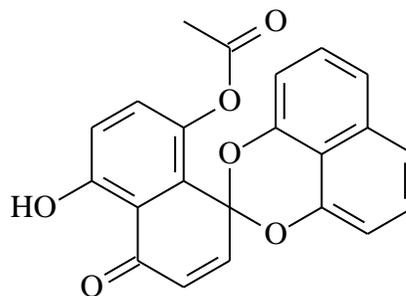


Fenilalhistina

La palmarrumicina CP-1, se aisló del hongo endófito *Coniothyrium palmarum*. Es una sustancia que contiene una rara estructura de espirobisnaftaleno. Esta sustancia tiene propiedades antimicóticas, antibacteriana y antiproliferativa. Un compuesto relacionado con un grupo acetato en posición *para* respecto al hidroxilo, denominado rithidenona-H, ha sido aislado del endófito *Rhizidysteron rufulum*, muestra actividad contra dos líneas de células cancerosas.

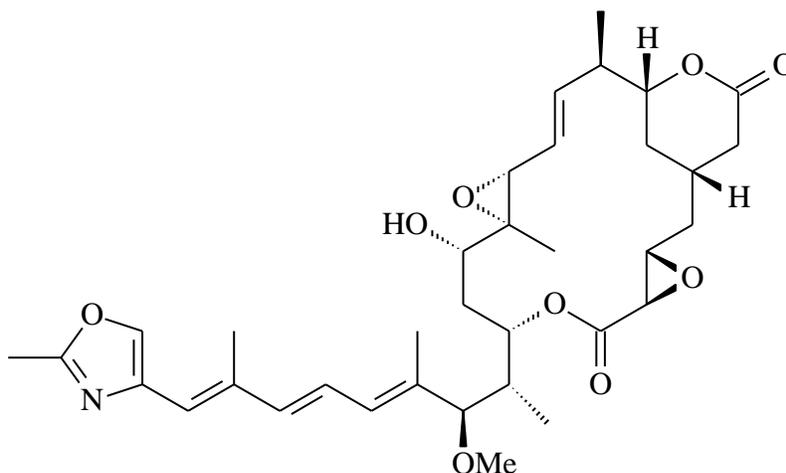


Palmarrumicina-CP1



Rithidenona-H

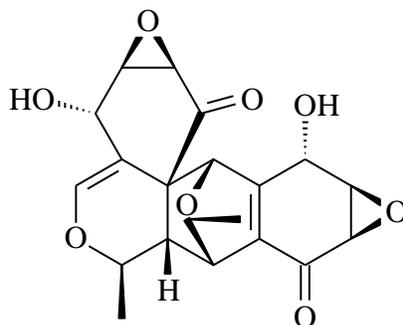
La rhizoxina es un policétido macrocíclico aislado del hongo *Rhizopus chinensis*. Se origina por la bacteria *Burkholderia* que vive en sus hifas. Además de ser un problema para los cultivos de arroz, esta sustancia es muy citotóxica contra células tumorales humanas y murinas. Esta sustancia se liga a la β -tubulina e inhibe la mitosis, por lo que se la clasifica como un antimetabólico.



Rhizoxina

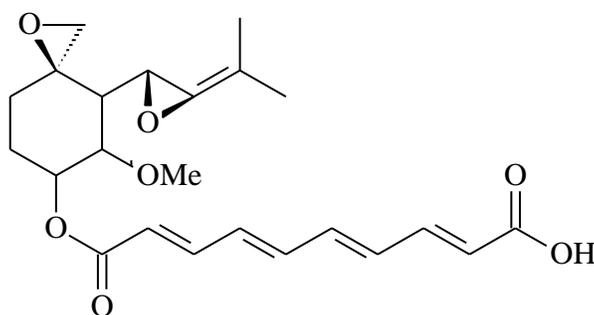
El epoxiquinol-B es un compuesto pentacíclico altamente funcionalizado, aislado de un hongo no identificado. Su estructura novedosa es la de un dímero de pentacétido, Esta sustancia presenta una fuerte actividad anti angiogénica. La angiogénesis está relacionada

con diferentes enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, y otras enfermedades crónicas.



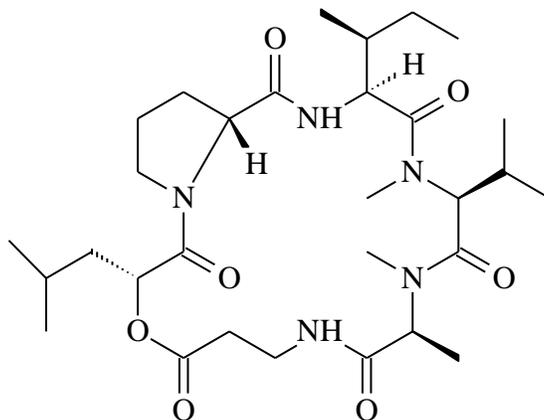
Epoxiquinol-B

La fumagilina es un meroterpenoide antibiótico que fue aislado inicialmente en 1949 del hongo *Aspergillus fumigates*. Es muy usado para el tratamiento de enfermedades causadas por micrósporas, por ejemplo, en pacientes con sida, los cuales tienen disminuido su sistema autoinmune. También para pacientes recién trasplantados y para pacientes con micrósporas en los ojos. Además, esta sustancia inhibe la angiogénesis, lo cual es indispensable para el crecimiento de tumores y la metástasis. Otros estudios han mostrado que la sustancia inhibe el desarrollo de varias líneas células de cáncer. Sin embargo, debido a los efectos laterales que presenta, se vienen estudiando análogos químicos para mejorar sus propiedades. Esta sustancia se ha identificado también en aguas superficiales mediante técnicas como extracción en fase sólida SPE, y HPLC-ESIMS.



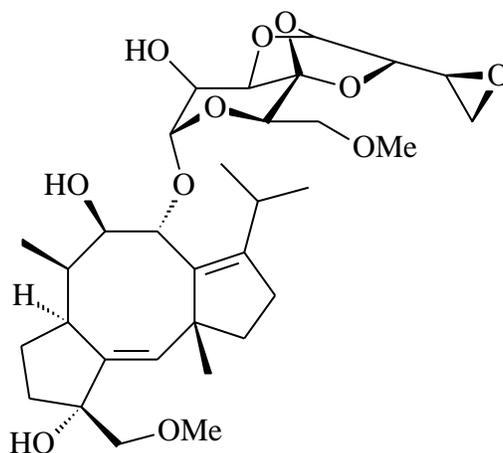
Fumagilina

La destruxina-B es un ciclodepsipéptido aislado del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en 1961. Posteriormente se ha aislado de otros hongos del género *Althernaria* y *Ophiosphaerella*. Esta sustancia ha mostrado un amplio espectro de actividades que incluyen: fito toxica, antiviral, insecticida, antitumoral, citotóxico y citostática. Esta sustancia está siendo investigada por sus propiedades potenciales contra cánceres como el colo-rectal y del hígado.



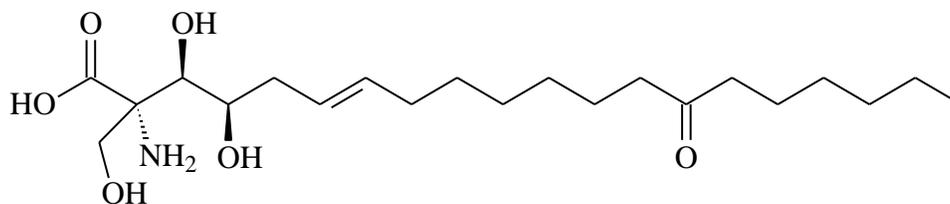
Destruxina-B

La cotylenina-A aislada en 1970 desde un caldo de cultivo de *Cladosporium sp.*, es un glicósido diterpenoide con potencial utilidad para el desarrollo de alternativas terapéuticas contra el cáncer de pulmón, de seno y leucemia.



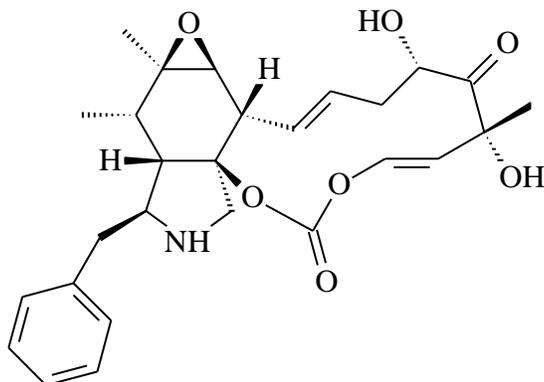
Cotylenina-A

La myriocina, es un ácido graso aminado, aislado inicialmente en 1972 del ascomiceto termofílico *Myriococcum albomyces*. Esta sustancia es un inhibidor potente de la serina-palmitoil transferasa. Uno de sus derivados el Fingolimod®, fue aprobado por la FDA en 2010 para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Estudios posteriores han mostrado que tiene potencial contra diferentes tipos de cáncer como el de mama, glioblastoma, de próstata, de pulmón, colangiocarcinoma, gástrico, pancreático, colon, de ovario, de vejiga, y contra problemas hematopoyéticos. La myriocina puede analizarse mediante técnicas como HPLC acoplada a espectrometría de masas y HPLC con detector de fluorescencia.



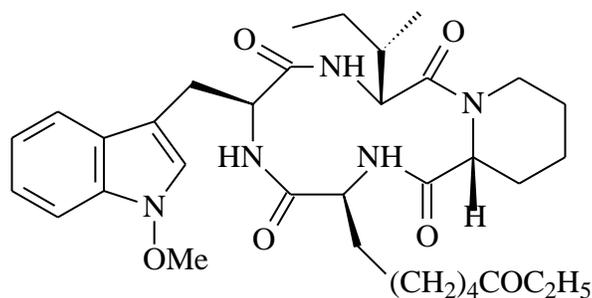
Myriocina

La cytoquinasina-E, es una micotoxina del hongo *Aspergillus clavatus*, que crece en alimentos almacenados. Es una sustancia inhibidora de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. En el caso del cáncer de ovario, esta sustancia es menos citotóxica que sustancias aprobadas como doxorubicina, paclitaxel y vinblastina. Es una sustancia que ha ayudado en el avance del conocimiento sobre los procesos de metástasis.



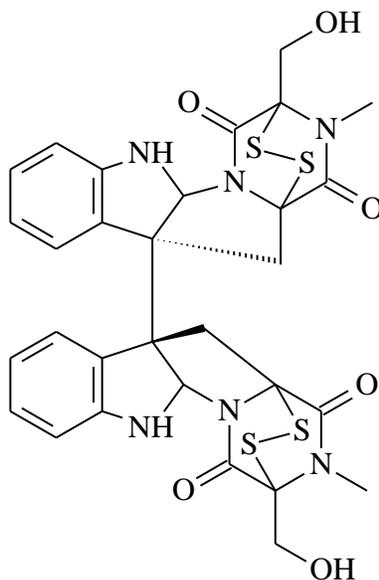
Cytoquinasina-E

La apicidina es un tetrapéptido cíclico, aislado del hongo endofítico *Fusarium pallidoroseum*. Esta sustancia inhibe las enzimas histona desacetilasas tanto en los parásitos como en los mamíferos. Presenta potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos contra cánceres como leucemia promielocítica, cervical, de seno, de páncreas, renal, de pulmón, de colon, de hígado, entre otros. Esta sustancia muestra potencial en terapia de infarto de miocardio y como antiparasitario.



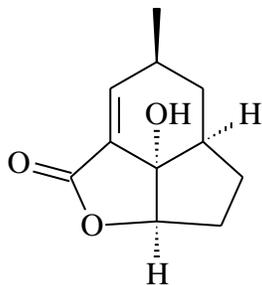
Apicidina

La chaetocina es una epiditiocetopiperazina aislada inicialmente de un medio de cultivo líquido fermentado de *Chaetomium minutum*. Esta sustancia se menciona como un agente antitumoral potencial. Diferentes estudios muestran que este metabolito ejerce una actividad antiproliferativa importante contra diferentes tipos de cáncer como el de hígado, leucemia, de seno, de pulmón, de colon y de próstata. Esta sustancia induce apoptosis de células de cáncer hepático.



Chaetocina

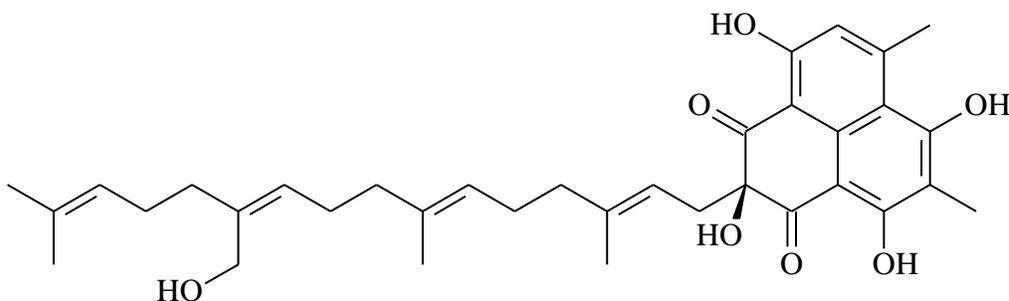
La galiellalactona es un hexacétido aislado de *Galiella rufa*. Esta sustancia presenta potencial anti angiogénico y anti metastásico. Se estudia su potencial contra el cáncer de próstata. Además, presenta actividad antiinflamatoria.



(-)-Galiellalactona

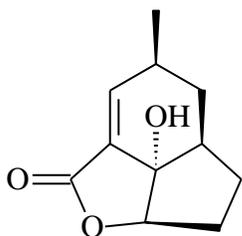
En general los hongos filamentosos, y especialmente los endófitos (o endofíticos, porque conviven con plantas), se utilizan biotecnológicamente para producir sustancias para la terapia del cáncer como el taxol. Son ejemplos de estos *Fusarium oxysporum*, cultivado en caldo de papa-dextrosa, y *Aspergillus niger* aislado de *Taxus cuspidate*.

Es importante destacar que no solo se investigan los metabolitos contra cáncer sino también con otros potenciales usos farmacéuticos, por ejemplo, el hongo endofítico *Aspergillus sp.*, produce compuestos tipo fenalenona, que muestran actividad contra el VIH.

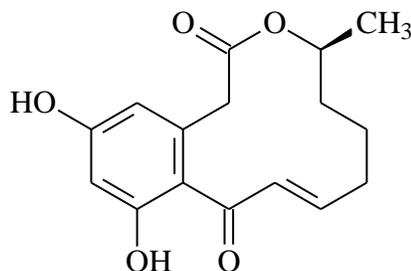


Asperfenalenona-A

La dehidrocurvularina aislada de *Alternaria cinerariae*, junto con la galiellalactona, aislada de *Galiella rufa*; han mostrado un potencial uso para el tratamiento de inflamaciones intestinales.



Galiellalactona

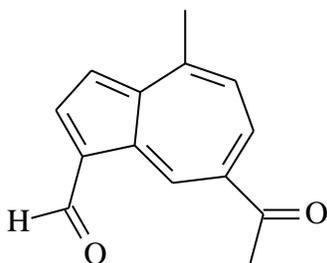


Dehidrocurvularina

Pigmentos

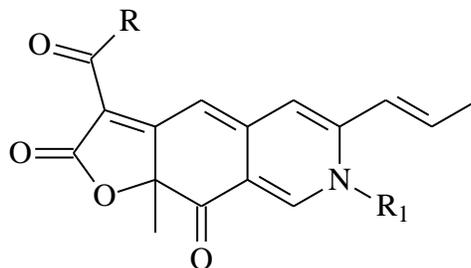
A partir de hongos se han obtenido pigmentos tipo quinona de colores que van del amarillo al rojo, como los reportados en especies *Fusarium sp.*, *Talaromyces verruculosus*, y *Stemphylium lycopersici*. Varios de estos compuestos además de tener uso potencial como colorantes para textiles, presentan propiedades antioxidantes, antibacterianas y anti cáncer. Del género *Aspergillus*, se obtuvo la Aspersina-A, que es un metabolito raro que se asemeja a un híbrido entre xantona y esteroide. Para esta sustancia se reporta actividad antimicótica.

Otros pigmentos incluyen sesquiterpenos tipo azuleno, como el caso del 7-acetil-4-metilazuleno-1-carbaldehído, aislado de los cuerpos fructíferos del hongo comestible *Lactarius deliciosus*. Esta sustancia muestra una actividad moderada contra *Staphylococcus aureus*.



7-acetil-4-metilazuleno-1-carbaldehído

Los hongos del género *Monascus*, son conocidos como fuente de pigmentos. Estos son metabolitos secundarios que son ampliamente utilizados como colorantes de alimentos en el mundo, muy especialmente en países del oriente como China, Japón y otros. Se han reportado unas 57, y a estas sustancias se les atribuyen propiedades anti cáncer, antimicrobianas, anti mutagénicas, antidiabéticas, entre otras. Estos pigmentos son mezclas de azafilonas, y se conocen tres pigmentos: el pigmento *Monascus* naranja (sigla inglesa *MOP*), el pigmento *Monascus* rojo (*MRP*), y el pigmento *Monascus* amarillo (*MYP*). Los compuestos presentes en estas mezclas incluyen la rubropunctamina (amarillo), la monascorubramine (amarillo), rubropunctatina (naranja), monascorubrin (naranja), monascina (amarillo), y ankaflavina (amarillo).



Estructura general de pigmentos rojos de *Monascus*
 $R_1 = H$ / aminoácido / glucosamina

$R_1 = H$, $R = C_5H_{11}$, rubropunctamina
 $R_1 =$ aminoácido, $R = C_7H_{15}$, monascorubramina

Las melaninas son metabolitos secundarios compuestos a su vez de unidades monoméricas fenólicas y de indol. Estos pigmentos de estructura compleja tienen enlaces covalentes entre anillos aromáticos, N-acetil glucosaminas derivadas de quitina, y glicéridos de membrana. Estas sustancias se consideran como un mecanismo de protección o adaptación de los hongos que las producen contra la excesiva humedad, la radiación ultravioleta, contra otros organismos, entre otros.

Hongos marinos

Aunque comparativamente con los hongos terrestres, los hongos de origen marino han sido muy poco investigados, las perspectivas de encontrar nuevos y novedosos metabolitos de interés farmacéutico en los marinos es muy grande. Los estudios realizados muestran que hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, también abundan en el mar, debido posiblemente a que tienen la posibilidad de soportar niveles de salinidad altos. La mayoría de las especies analizadas conviven con organismos como algas y esponjas, y en sitios poco estudiados como manglares y sedimentos marinos. Los metabolitos más abundantes en los hongos marinos son los alcaloides y derivados de policétidos, seguidos de péptidos, terpenos, lactonas y esteroides. Otro grupo de metabolitos interesantes son las quinonas.

En cuanto a las actividades biológicas, las más reportadas son citotóxica y antimicrobiana, seguidas de otras como antioxidante, antiinflamatoria, anti-invasión (palabra inglesa *antifouling*), actividad para disminuir niveles de lípidos, letalidad contra camarones, entre otras. Entre los miles de metabolitos aislados la halimida, un péptido llevó a la síntesis de la plinabulina, la cual está en fase II para su potencial uso contra el cáncer de pulmón. Sin embargo, en la medida que se evalúen más metabolitos, y se desarrollen condiciones biotecnológicas adecuadas es de esperar que se encuentren nuevas sustancias de uso farmacéutico en el futuro.

Técnicas de separación e identificación

La técnica combinada HPLC-MS, ha mostrado ser muy útil para procesos como la identificación de los mismos hongos. Por ejemplo, el hongo *Aspergillus flavus*, un hongo filamentoso que es muy común en diferentes alimentos ricos en almidón como el maíz, y produce micotoxinas, por lo cual es un problema económico y de salud. El análisis por la técnica combinada HPLC-ESIMS, permite reconocer 14 compuestos marcadores como son la aflatoxina B1, la aflatoxina G1, el ácido aspergílico, la aspirona, la betaina, la chrisogina, el desacetil parasiticólido-A, el flufurano, la gregatina-B, el ácido hidroxisidónico, el ácido nictotínico, la fomaligina-A, y la espinulosina. Estos compuestos se reconocen en sus espectros de masas por sus iones cuasimoleculares $[M+H]^+$. En el caso de compuestos como las circumdatinas aisladas del hongo *Aspergillus ocraceus*, se han optimizado métodos combinados que permiten la separación y análisis de micotoxinas. Por ejemplo, la combinación UPLC – MS – IT – TOF (sigla inglesa correspondiente a ultraHPLC – Mass Spectrometry – Ion Trap – Time of Flight), permite la identificación de estas sustancias. Los espectros de masas muestran los iones cuasimoleculares $[M+H]^+$, $[M + Na]^+$, y $[M + K]^+$; además de fragmentos característicos.

Es interesante anotar, que para la diferenciación de especies de hongos como los del género *Ganoderma*, reconocidos como hongos alimenticios y con diferentes propiedades medicinales, se utilizan técnicas de espectrometría de masas, a partir del tejido del hongo directamente. Este género comprende más de 300 especies y es de amplio consumo en países orientales. Por las propiedades nutricionales de algunas de estas especies, es necesario contar con herramientas para su identificación rápida. Es un ejemplo el estudio realizado con espectrometría de masas de ionización directa (sigla inglesa *DI – MS*), el cual permite reconocer las especies de hongos de este género por sus componentes característicos como son los ácidos ganodéricos. Los espectros de masas obtenidos muestran iones pseudomoleculares $[M + K]^+$. Este método ofrece posibilidades interesantes para otros estudios similares que ayuden a identificar entre especies cultivadas y silvestres.

Referencias bibliográficas

1. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. Int. J. Environ. Res. Public Health 2017; 14: e632.
2. Guzmán G. Las relaciones de los hongos sagrados con el hombre a través del tiempo, Anal. Antropol. 2016; 50: 134–147.
3. Goyal S, Ramawat KG, Mérillon JM. Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. En: J. M. Mérillon. K. G. Ramawat eds., “Fungal Metabolites”, Springer, Switzerland, 2017, 1 – 29 pp.

4. Tehmina Anjum, Wajiha Iram, Production of Cyclosporine A by Submerged Fermentation, En: J. M. Mérillon. K. G. Ramawat eds., "Fungal Metabolites", Springer, Switzerland, 2017, 783 - 810 pp.
5. Sanjeev Banerjee, Shivani B. Paruthy Preclinical and Clinical Perspective of Fungal Metabolites and Their Analogs as Anticancer Agents – From Bench to Bedside En: J. M. Mérillon. K. G. Ramawat eds., "Fungal Metabolites", Springer, Switzerland, 2017, 669 – 700 pp.
6. Siridechakorn I, Yue Z, Mittraphab Y, Lei X, Pudhom K. Identification of spirobisanaphthalene derivatives with anti-tumor activities from the endophytic fungus *Rhytidhysterion rufulum* AS21B. *Bioorg. Med. Chem.* 2017; 25: 2878–2882.
7. Bukreyeva I, Angoulvant A, Bendib I, Gagnard JC, Bourhis JH, Dargère S. *et al.* *Enterocytozoon bieneusi* Microsporidiosis in Stem Cell Transplant Recipients Treated with Fumagillin. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23: 1039-1041.
8. Ivesic M, Krivohlavek A, Zuntar I, Sonja Tolić S, Šikić S, Musić V. *et al.* Monitoring of selected pharmaceuticals in surface waters of Croatia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017; 24: 23389-23400.
9. Campisi GM, Signorelli P, Rizzo J, Ghilardi C, Antognetti J, Caretti A. *et al.* ESI Determination of the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin by electrospray and Q-trap mass spectrometry. *Biomed. Chromatog.* 2017; 31: e4026.
10. Bertini S, Saccomanni G, Del Carlo S, Digiacoio M, Gargini C, Piano I. *et al.* Application of An Improved HPLC-FL Method to Screen Serine Palmitoyl Transferase Inhibitors. *Molecules* 2017; 22: 1198.
11. Zhang X, Ly Y. Suspension state increases reattachment of breast cancer cells by upregulating lamin A/C. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2017; 1864: 2272–2282.
12. Cho DI, Kang WS, Hong MH, Kang HJ, Kim MR, Kim MC. *et al.* The optimization of cell therapy by combinational application with apicidin-treated mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Oncotarget* 2017; 8: 44281-44294.
13. Bagnall NH, Hines BM, Lucke AJ, Gupta PK, Reid RC, Fairlie DP. *et al.* Insecticidal activities of histone deacetylase inhibitors against a dipteran parasite of sheep, *Lucilia cuprina*. *Intern. J. Parasitology-drugs Drug Resist.* 2017; 7: 51-60.
14. He J, Chen X, Li B, Zhou W, Xiao J, He K. *et al.* Chaetocin induces cell cycle arrest and apoptosis by regulating the ROS-mediated ASK-1/JNK signaling pathways. *Oncol. Rep.* 2017; 38: 2489-2497.
15. Schreiber D, Marx L, Felix S, Clasohm J, Weyland M, Schäfer, M. *et al.* Anti-inflammatory Effects of Fungal Metabolites in Mouse Intestine as Revealed by *In vitro* Models. *Front. Physiol.* 2017; 8: 566.

16. Faustino Jozala A, Costa Geraldles D, Lacalendola Tundisi L, de Araújo Feitosa V, Breyer CA, Samuel Leite Cardoso S. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification, Brazil. *J. Microbiol.* 2016; 47S: 51-63.
17. Pang X, Zhao JY, Fang XM, Zhang T, Zhang DW, Liu HY *et al.* Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Aspergillus sp.* CCCC 400735 and Their Anti-HIV Activities. *J. Nat. Prod.* 2017; 80: 2595 – 2601.
18. Schreiber D, Marx L, Felix S, Clasohm J, Weyland M, Schäfer M. *et al.* Anti-inflammatory Effects of Fungal Metabolites in Mouse Intestine as Revealed by *in vitro* Models. *Front. Physiol.* 2017; 8: 566.
19. Prabhu M, Rao N, Xiao X, Li WJ. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1113.
20. Fouillaud M, Venkatachalam M, Girard-Valenciennes E, Caro Y, Dufossé L. Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities. *Mar. Drugs* 2016; 14: 64.
21. Tala MF, Qin J, Ndongo JT, Laatsch H. New Azulene-Type Sesquiterpenoids from the Fruiting Bodies of *Lactarius eliciosus*. *Nat. Prod. Biopros.* 2017; 7: 269–273.
22. Yang H, Li J, Wang Y, Gan C. Identification of water-soluble *Monascus* yellow pigments using HPLC-PADELSD, high-resolution ESI-MS, and MS-MS. *Food Chem.* 2018; 245: 536–541.
23. Yuliana A, Singgih M, Julianti E, Blanc PJ. Derivates of azaphilone *Monascus* pigments. *Biocat. Agric. Biotechnol.* 2017; 9: 183–194.
24. Toledo AV, Ernesto Franco ME, Yanil Lopez SM, Troncozo MI, Nazareno Saparrat MC, Balatti PA. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2017; 99: 2-6.
25. Cordero RJB, Casadeval A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol. Rev.* 2017; 31: 99 – 112.
26. Jin L, Quan C, Hou X, Fan S. Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. *Mar. Drugs* 2016; 14: 76.
27. Nicoletti R, Trincone A. Bioactive Compounds Produced by Strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of Marine Origin. *Mar. Drugs* 2016; 14: 37.
28. Imhoff JF, Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. *Mar. Drugs* 2016; 14: 19.
29. Saldan NC, Almeida RTR, Avíncola A, Porto C, Galuch MB, Magon TFS. *et al.* Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chem.* 2018; 241: 113–121.
30. González-Jartín JM, Alfonso A, Sainz MJ, Vieytes MR, Botana LM. UPLC – MS – IT – TOF Identification of Circumdatins Produced by *Aspergillus ochraceus*. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65: 4843–4852.

31. Wong HY, Wong MYM, Hu B, So PK, Chan CO, Mok DKW, Yao ZP. Rapid differentiation of *Ganoderma* species by direct ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2018; 999: 99-106.

Capítulo 10

Glicósidos cianogénicos



Muchas plantas sintetizan compuestos que, por hidrólisis ácida, liberan cianuro de hidrógeno. Esta capacidad, conocida como ciano génesis, se ha observado durante siglos en plantas tales como albaricoques, duraznos, almendras y otras plantas alimenticias importantes.

Estas sustancias producen muchas víctimas cada año. La mayoría de los casos de envenenamiento con cianuro son resultado del consumo de plantas de las familias Rosáceas, Fabáceas (Leguminosa), Euforbiáceas, o miembros de los géneros *Sorghum* (Poaceas o Gramíneas). Aunque muchos de los casos de envenenamiento son accidentales (Como por ejemplo las reses que comen semillas frescas de sorgo), una cantidad de personas está expuesta diariamente a su consumo. Aunque el organismo humano puede eliminar cantidades relativamente grandes de HCN rápida y eficientemente, existe un consenso creciente en el sentido de que ciertas condiciones neurológicas provienen de envenenamiento crónico con cianuro. Un caso especialmente crítico es el del casabe, el cual es una harina para alimentación humana, obtenido de la denominada yuca brava, que corresponde a *Manihot esculenta*, familia euforbiáceas. El tubérculo de esta planta es la base de alimentación en más de medio billón de seres humanos en el mundo, especialmente de países sub desarrollados; pero contiene glicósidos cianogénicos como la amigdalina y la lotaustralina, que son neurotóxicos y pueden generar parálisis y muerte. También se hipotetiza que el consumo de dietas altas en estas sustancias puede llevar a la carbamilación de proteínas, en personas con enfermedades inflamatorias crónicas tales como la enfermedad renal crónica y el reumatismo.

Dos clases de sustancias naturales son los responsables de esta capacidad cianofórica: Los glicósidos cianogénicos y los cianolípidos. Ambos son derivados de α -hidroxinitrilos (cianohidrinias) y ambos liberan un componente carbonílico y HCN cuando se remueve la porción de carbohidrato o de ácido graso. La presencia de HCN se detecta fácilmente mediante varios ensayos de coloración. La 10.1 muestra la estructura general de los glicósidos cianogénicos y los procesos enzimáticos implicados en la liberación de HCN a partir de ellos, pasando por un intermedio cianohidrina.

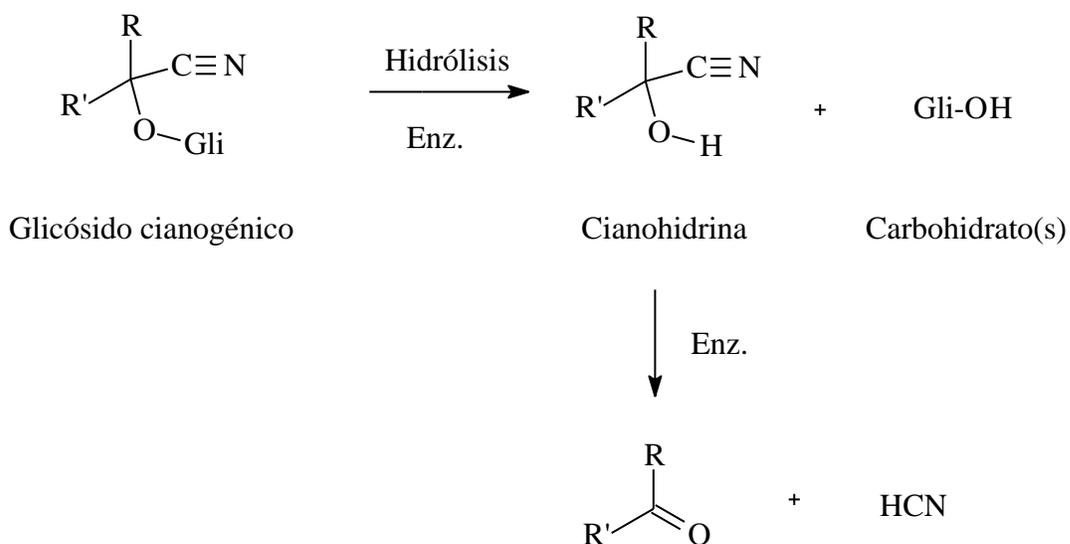


Figura 10.1. Esquema que explica cómo se libera el HCN a partir de los glicósidos cianogénicos.

A pesar de que se ha sabido que muchas plantas son cianogénicas, son muy pocas las sustancias aisladas e identificadas. Esto se debe al hecho de que estas sustancias son difíciles de aislar y purificar, así como también son inestables a la hidrólisis. Al romperse los tejidos vegetales que contienen estas sustancias, las enzimas presentes las hidrolizan. Además, los carbohidratos y otros glicósidos que se encuentren presentes dificultan su purificación. Hay tres glicósidos cianogénicos que se consiguen comercialmente: amigdalina, prunasina y linamarina. La Figura 10.2 muestra las estructuras de los glicósidos cianogénicos más comunes.

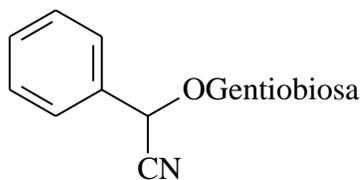
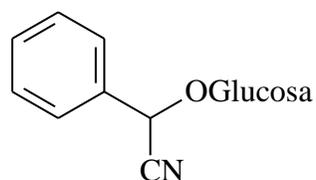
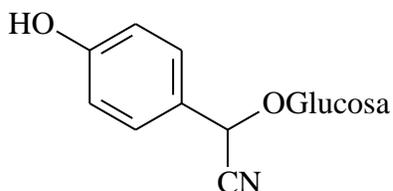
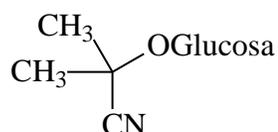
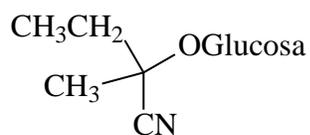
Amigdalina (*Amygdalus sp.*)Prunasina (*Prunus sp.*)Dhurrina (*Sorghum sp.*)Linamarina (*Linum sp.*)Lotaustralina (*Lotus sp.*)

Figura 10.2. Estructuras químicas de los glicósidos cianogénicos naturales más comúnmente reportados.

Biogénesis

Todos los glicósidos cianogénicos conocidos se originan a partir de los aminoácidos: L-fnilalanina, L-tirosina, L-leucina, L-valina, y L-isoleucina, con excepción de los que contienen funciones ciclopenteno, los cuales provienen de 2- ciclopentenil-l-glicina; y aquellos de hongos y bacterias, los cuales provienen de L-glicina. La figura 10.3 muestra las estructuras de estos aminoácidos.

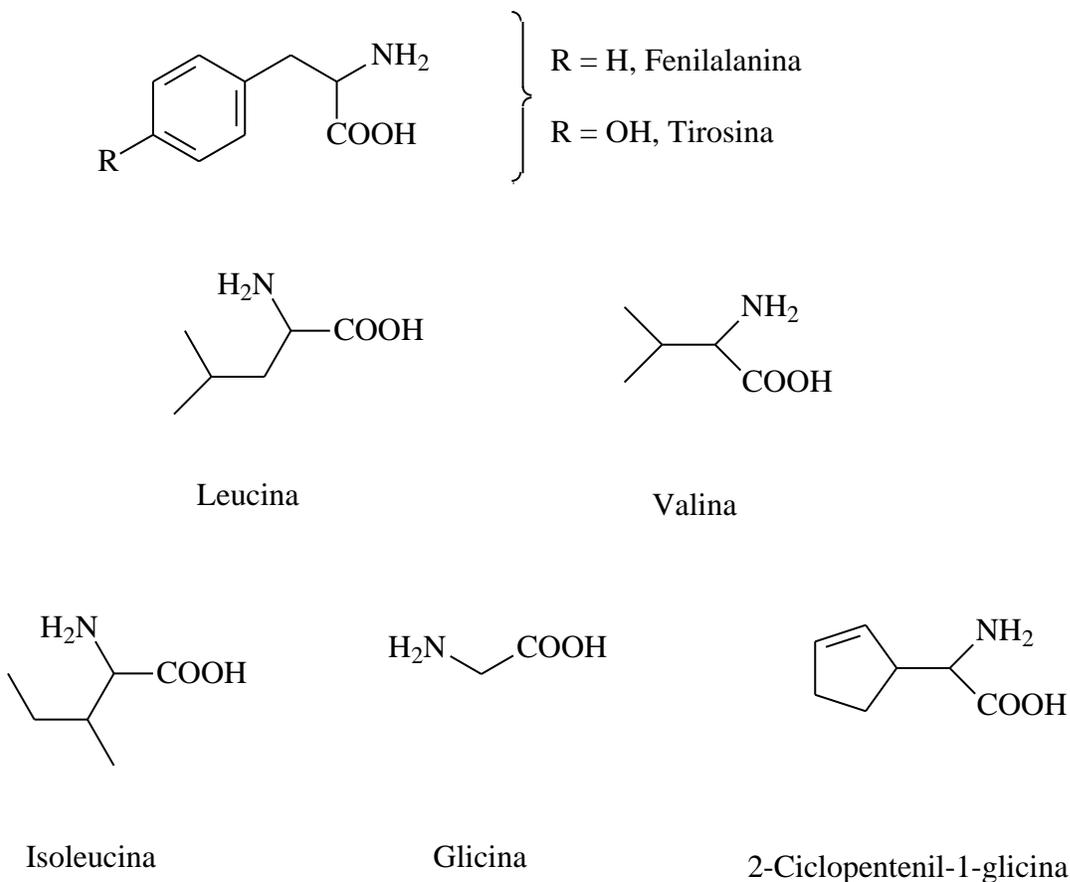


Figura 10.3. Estructuras químicas de los aminoácidos precursores de glicósidos cianogénicos.

La figura 10.4 muestra la trayectoria general de biogénesis de los glicósidos cianogénicos a partir del respectivo aminoácido. El aminoácido es inicialmente oxidado sobre el nitrógeno. La descarboxilación y deshidrogenación da origen a la aldoxima. Esta es deshidratada para originar el nitrilo intermedio. Este a su vez es oxidado, para finalmente introducir una o varias moléculas de carbohidratos, mediante procesos de glicosilación enzimática.

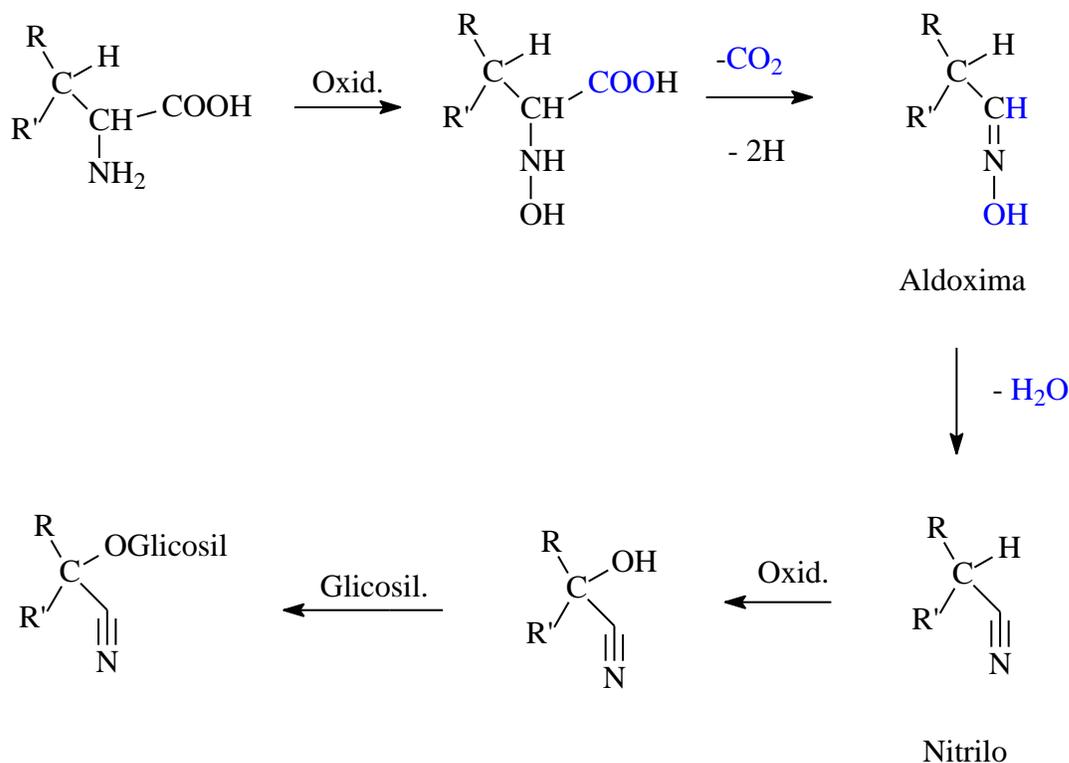


Figura 10.4. Esquema biogenético general que explica el origen de los glicósidos cianogénicos a partir de aminoácidos.

Función biológica

Existen algunos estudios para tratar de comprender el papel biológico de los glicósidos cianogénicos y estos estudios han generado varias hipótesis al respecto, una de las cuales es que las plantas los producen como mecanismo de defensa contra depredadores. Esto lo sustentan la misma actividad tóxica de estos compuestos, además de otras actividades que han presentado contra microorganismos. De esta toxicidad sacan ventaja algunos insectos, que acumulan estas sustancias para defenderse de depredadores, al consumir plantas que contienen estas sustancias, aunque también se ha reportado que algunos insectos son capaces de producirlos por biosíntesis *de novo*.

Hidrólisis enzimática

Los glicósidos cianogénicos se hidrolizan para generar un compuesto carbonílico (aldehído o cetona), uno o varios carbohidratos y HCN. La hidrólisis enzimática ocurre cuando los tejidos frescos que contienen glicósidos cianógenos son alterados (P.ej. rotos), de ahí que su aislamiento sea difícil. Precisamente este proceso de hidrólisis enzimática es el que hace que se libere HCN, y es la base del denominado Ensayo de Guignard, el cual permite determinar la existencia de estas sustancias en muestras vegetales.

Ensayo de reconocimiento (Ensayo de Guignard)

En el fondo de un tubo de ensayo se colocan unos gramos de tejido vegetal fresco triturado o desmenuzado. En la boca del tubo se suspende un papel de filtro impregnado con picrato de sodio (Papel picrosódico) y se sella herméticamente. Después de un tiempo si el tejido contiene sustancias cianogénicas, el papel toma coloración rojiza. Algunos autores adicionan 2 ó 3 gotas de benceno, cloroformo o tolueno antes de tapar, y otros someten a calentamiento el tubo cerrado para acelerar la hidrólisis.

Más recientemente se vienen diseñando nuevos dispositivos con el fin de detectar pequeñas cantidades de HCN, dada su toxicidad, lo que seguramente ayudará también en la detección de los compuestos cianogénicos naturales.

Distribución natural

Los glicósidos cianogénicos se han encontrado en alrededor de 2500 especies de plantas de unas 110 familias. Se les encuentran en helechos, gimnospermas (tanto en mono- y dicotiledóneas), angiospermas y varios insectos. En forma general, las concentraciones más altas se encuentran en las hojas, pero algunos se encuentran en raíces, semillas u otros tejidos vegetales.

Muchos glicósidos cianogénicos tales como prunasina, sambunigrina, linamarina y lotaustralina, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunos otros, tales como los que contienen funciones ciclopenteno (p. ej. ginocardina) se han encontrado en pasifloráceas, flacourtiáceas y turneráceas.

La cardiospermina se conoce únicamente en sapindáceas, mientras que su éster p-hidroxibenzoato, solamente se conoce en rosáceas. La heterodendrina solamente se conoce en leguminosas (gén. *Acacia*) y sapindáceas (gén. *Heterodendron*).

Otros glicósidos cianogénicos se encuentran en sapotáceas (gén. *Lucuma*), leguminosas (gén. *Vicia*, *Holocalyx*), (gén. *Davallia*), rutáceas (gén. *Zieria*), caprifoliáceas (gén. *Sambucus*), liliáceas (gén. *Chlorophytum*), platanáceas, campanuláceas, magnoliáceas, calicantáceas, papaveráceas, gramíneas, juncáceas, scheuzeriáceas, juncagináceas, etc.

Técnicas de aislamiento e identificación

Debido al gran número de carbohidratos enlazados y otros compuestos glicosídicos presentes en los tejidos en los cuales se les encuentra, no existe un método simple para el aislamiento y purificación de glicósidos cianogénicos. No obstante, lo anterior se han hecho algunos avances.

Los glicósidos cianogénicos se pueden extraer con mezclas alcohol-agua. Los métodos de aislamiento y purificación de los glicósidos cianogénicos no han sufrido cambios sustanciales,

aunque se les han hecho algunas innovaciones, especialmente para compuestos tales como la triglochinina.

Para el análisis y separación por cromatografía en capa fina se utiliza sílica gel con indicador de fluorescencia y como eluentes diferentes mezclas cloroformo:metanol (especialmente para aquellos glicósidos relacionados con el mandelonitrilo).

Para el revelado, se utilizan entre otros los siguientes reactivos y procedimientos:

a) Rociado con solución al 2% de cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio. Luego las placas se secan y se calientan a 60°C. Finalmente se colocan en una cámara con amoníaco concentrado durante 10 minutos. Este método es razonablemente selectivo para glicósidos cianogénicos aromáticos.

b) Rociado con una solución de hidroxilamina (4.5%) y cloruro de hidroxilamina (4.5%) en alcohol, seguido de rociado con una solución de cloruro férrico al 1.25% en Metanol, observándose manchas rojas o pardas.

A veces se ha observado que algunos glicósidos cianogénicos sufren isomerización durante el proceso de aislamiento. Por ejemplo, la plularasina, una mezcla de prunasina y sambunigrina, se reportó en varias plantas, pero más tarde se demostró que la mezcla se originaba por epimerización durante el trabajo experimental.

Se han investigado los efectos de la temperatura, el pH y los diferentes solventes, sobre la isomerización del centro quiral de la amigdalina, y se ha observado que en solventes orgánicos (tales como etanol y metanol) se produce poca isomerización, mientras que esta es mucho mayor en agua hirviendo durante cierto tiempo y en ciertos tipos de vidrio.

El Sephadex G-10 se ha utilizado en la purificación preliminar de extractos que contienen glicósidos cianogénicos. Los extractos siruposos se particionan sobre este soporte en medio acuoso. El Sephadex es mucho menos reactivo que la sílica gel y causa poca descomposición de las sustancias de interés.

El método más utilizado para la separación y el aislamiento de los glicósidos cianogénicos es HPLC en fase reversa, con detector de índice de refracción. También la técnica combinada de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permite el análisis de los derivados trimetilsilil de glicósidos cianogénicos como la amigdalina con m/z 961 como ión molecular.

Los espectros de masas ESI de los glicósidos cianogénicos muestran los iones pseudomoleculares $[M+Na]^+$, característicos como m/z 480 para la amigdalina y m/z 318 para la prunasina. En modo negativo para la amigdalina se reporta el ión pseudomolecular m/z 502 $[M + CHO_2]^-$, además de los iones m/z 323, 221, 179, 161, 131, 119, 113, 101, 89, 71 y 59.

También se reportan los iones m/z 292 $[M + CHO_2]^-$ y 161 para linamarina, y m/z 306 $[M + CHO_2]^-$ y 161 para lotaustralina.

La resonancia magnética nuclear ha sido la técnica más útil para la caracterización de los glicósidos cianogénicos conocidos. Se utilizan tanto las técnicas 1D como 2D. A manera de ejemplo, para el compuesto prupersina-E aislado de las semillas de *Prunus davidiana*, se pueden observar señales muy características como el protón bencílico que se observa como un singlete en 5.98 ppm. La señal del carbono bencílico se reporta en 66.7, y la del carbono nitrílico en 118.8 ppm. Al utilizar la herramienta de predicción en línea NMRdb.org, se observan estas tres señales en 6.22, 68.5 y 119.2 ppm respectivamente, demostrando la utilidad de esta herramienta para este glicósido cianogénico.

Síntesis

Aunque los glicósidos cianogénicos son producidos por diferentes plantas, debido a su capacidad de generar ácido cianhídrico, también existen reportes de procesos para su síntesis química.

Referencias bibliográficas

1. Newton CR. Cassava, konzo, and neurotoxicity. *Lancet Global Health*. 2017; 5: e853-e854.
2. Bhalla TC, Asif M, Smita K. Purification and characterization of cyanogenic β -glucosidase from wild apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Proc. Biochem*. 2017; 58: 320–325.
3. Jackson R, Logue BA. A review of rapid and field-portable analytical techniques for the diagnosis of cyanide exposure. *Anal. Chim. Acta* 2017; 960: 18-39.
4. Meher AK, Labhsetwar N, Bansiwala A. An improved method for direct estimation of free cyanide in drinking water by Ion Chromatography-Pulsed Amperometry Detection (IC-PAD) on gold working electrode. *Food Chem*. 2018; 240: 131–138.
5. Isidorov VA, Nazaruk J. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of glycosides without prior hydrolysis. *J. Chromatog. A* 2017; 1521: 161–166.
6. Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. Transition of phenolics and cyanogenic glycosides from apricot and cherry fruit kernels into liqueur. *Food Chem*. 2016; 203: 483–490.
7. Neilson EH, Goodger JQD, Motawia MS, Bjarnholt N, Frisch T, Olsen CE. *et al.* Phenylalanine derived cyanogenic diglycosides from *Eucalyptus camphora* and their abundances in relation to ontogeny and tissue type. *Phytochemistry* 2011; 72: 2325–2334.
8. Stylos E, Chatziathanasiadou MV, Syriopoulou A, Tzakos AG. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability

- determination of the major classes of phytochemicals. *J. Chromatog. B* 2017; 1047: 15–38.
9. Muzashvili T, Moniuszko-Szajwaj B, Pecio L, Oleszek W, Stochmal A. Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of Cyanogenic Glucosides in *Trifolium* Species. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 1777 – 1782.
 10. Cressey P, Reeve J. Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2019; 125: 225-232.
 11. Chen XY, Wang HQ, Zhang T, Liu C, Kang J, Chen RY. *et al.* Aromatic Glucosides from the Seeds of *Prunus davidiana*. *J. Nat. Prod.* 2013; 76: 1528 – 1534.
 12. Møller BL, Olsen CE, Motawia MS. General and Stereocontrolled Approach to the Chemical Synthesis of Naturally Occurring Cyanogenic Glucosides. *J. Nat. Prod.* 2016; 79: 1198 – 1202.
 13. Zhao M, Bergaentzlé M, Flieller A, Marchioni E. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for simultaneous quantification of cyanogenic glycosides and secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Chromatog.* 2019; 1601: 214-223.

Capítulo 11

Compuestos azufrados



Históricamente, los metabolitos secundarios de interés farmacéutico más conocidos e investigados han sido principalmente compuestos con carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno; como los vistos en los capítulos anteriores. En cambio, los metabolitos secundarios azufrados son menos conocidos muy probablemente debido a la inestabilidad química de algunos grupos funcionales azufrados, sin embargo, los estudios recientes han mostrado el gran potencial biomédico de estas sustancias naturales, y en particular su papel destacado en los complejos mecanismos de defensa del organismo humano.

El azufre es esencial para la vida y se encuentra en varias biomoléculas fundamentales como los aminoácidos metionina y cisteína, el regulador redox glutatión, el agente metilante S-adenosilmetionina y en los cofactores biotina, coenzima-A, ácido lipoico y tiamina (Figura 11.1.).

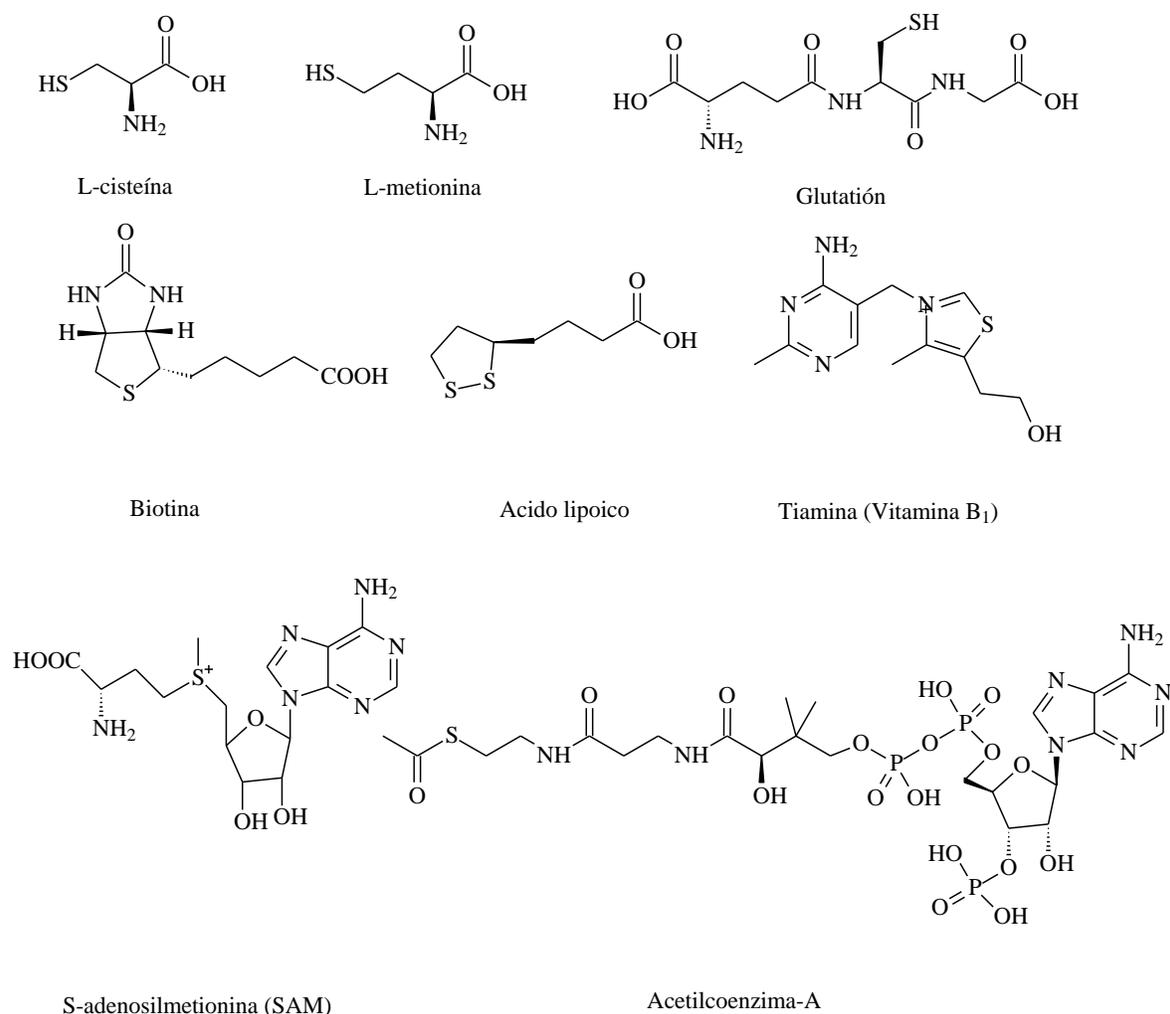


Figura 11.1. Estructuras químicas de varios compuestos azufrados de interés bioquímico.

En las plantas los metabolitos azufrados, desempeñan un papel muy importante como es la defensa contra enfermedades y depredadores. En los seres humanos el azufre también está presente en las sustancias involucradas en procesos bioquímicos importantes como la biosíntesis de una gran cantidad de sustancias por la vía de la acetilcoenzima-A, y en procesos metabólicos como los que originan diferentes proteínas, como es el caso de las proteínas con hierro y azufre que desempeñan un papel importante en la reparación y replicación del ADN y contra enfermedades como la tuberculosis. Además, se encuentra presente en los aminoácidos involucrados en procesos como el metabolismo de los lípidos y en enfermedades como la arterioesclerosis y otras enfermedades cardiovasculares.

Los metabolitos azufrados conocidos hasta ahora incluyen sustancias que contienen grupos funcionales como sulfato, tiol, tioéster, sulfuro, disulfuro, sulfona, sulfóxido, sulfoxonio, tiofeno, tiazol, tiosulfatos, glucosinolato, isotiocianato, nitrilo, tiooxazolidina, etc.

Los metabolitos sulfatados son los más abundantes, y el grupo sulfato se encuentra ligado a sustancias tales como terpenoides, esteroides, polisacáridos, flavonoides, etc. Muchos de estos compuestos presentan diferentes actividades biológicas que incluyen las actividades anticoagulante, antimicrobiana y citotóxica, y ello está llevando al interés en la obtención de derivados sulfatados de sustancias naturales, con potencial farmacoterapéutico. En el caso de los organismos marinos, estos han sido fuente de unos 150 esteroides sulfatados, los cuales han mostrado entre otras actividades antimicrobiana, antitumoral y cardiovascular. La abundancia de estas sustancias en el medio marino está relacionada con la abundancia del azufre ya que después del cloro, el sodio y el magnesio, el azufre es el cuarto elemento más abundante en el mar. Los corales en particular contienen compuestos azufrados tanto en su esqueleto como en los demás tejidos.

Aunque en general los polisacáridos abundan en los organismos vivos, son conocidos principalmente como constituyentes estructurales y como fuente energética, pero algunos de ellos presentan propiedades interesantes e inesperadas como un polisacárido aislado de la ahuyama *Cucurbita pepo*, el cual muestra propiedades antidiabéticas potenciales. En el caso de los polisacáridos sulfatados, estos muestran actividades biológicas interesantes como antitumoral, antioxidante, anticoagulante, antidiabética, como radioprotectores, antiviral, hipolipidémica y no se conocen efectos tóxicos o colaterales, por lo cual son consideradas sustancias promisorias para la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades. A manera de ejemplo se reportan estudios de polisacáridos sulfatados de algas marinas, que muestran su capacidad protectora del endotelio, y también con propiedades cosméticas anti envejecimiento de la piel. También en el tamarindo *Tamarindus indica*, se reporta un polisacárido sulfatado con acción hepatoprotectora.

Los compuestos con grupos sulfuro, disulfuro, sulfóxido y tiosulfatos, se pueden encontrar en una misma fuente vegetal como los bulbos de ajo y en otras plantas de la familia de las

aliáceas. La figura 11.2 presenta algunos ejemplos de estructuras de compuestos con estos grupos funcionales. En el caso particular del ajo, este es conocido por sus efectos benéficos en la salud humana, los cuales incluyen la prevención del cáncer, especialmente el cáncer gastrointestinal, la disminución de riesgos cardiovasculares y de la diabetes tipo 2. El compuesto psammaplin-A, aislado de una esponja marina *Psammaplysina sp.*, además de contener grupos disulfuro posee grupos oxima, los cuales son raros en los organismos marinos, sin embargo, esta sustancia tiene un rango amplio de actividades biológicas que incluyen antimicrobiana, anticáncer, antiviral, promotora del desarrollo embrionario, insecticida y como mecanismo de defensa químico.

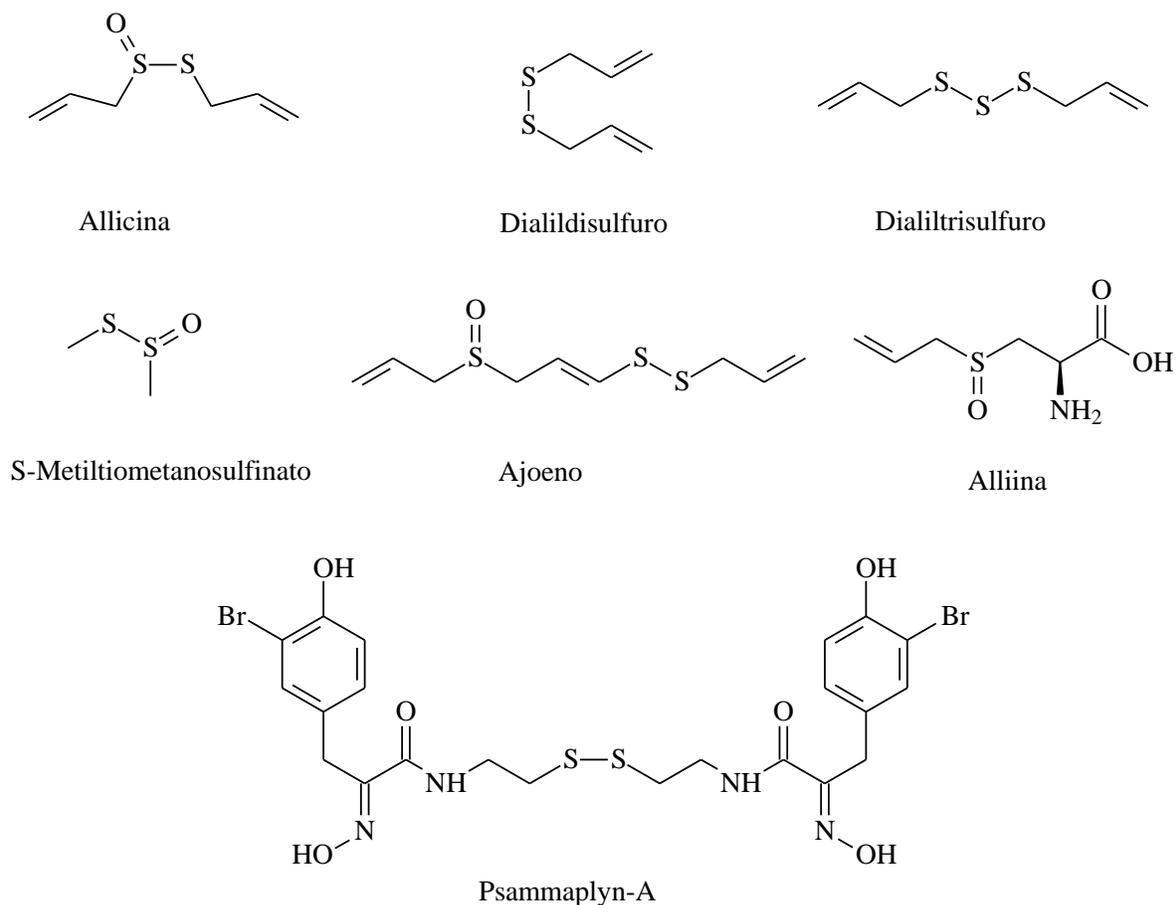


Figura 11. 2. Estructuras químicas de algunos metabolitos azufrados naturales con diferentes grupos funcionales.

Diferentes estudios han mostrado que las sustancias azufradas del ajo, las cuales se encuentran también en otras plantas como la cebolla (*Allium cepa*); participan en procesos de señalización de células y tejidos de mamíferos, los cuales están asociados con la salud y los procesos de envejecimiento. Desde el punto de vista dietario, es ampliamente aceptado que el consumo de ajo y otros vegetales aliáceos, está asociado con diferentes beneficios

en la salud humana, los cuales incluyen el reducir el riesgo de varios tipos de cáncer, en especial del tracto gastrointestinal, el reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y la diabetes tipo 2. Uno de estos compuestos es el dialiltrisulfuro DATS. Esta sustancia participa en diferentes procesos enzimáticos en los cuales además de liberarse H_2S , genera otros compuestos reactivos como dihidropersulfuros (H_2S_2), dihidropolisulfuros (H_2S_n), hidropersulfuros (RS_2H) e hidropolisulfuros (RS_nH). Algunos de estos compuestos participan en procesos de señalización en cerebros de animales, además de presentar acción antiinflamatoria y citoprotectora contra el *stress* oxidativo. Sin embargo, muchos de estos procesos no son todavía comprendidos del todo.

Glucosinolatos

Los glucosinolatos (conocidos con la sigla GS) son metabolitos secundarios azufrados, que desempeñan papeles importantes en los vegetales, por ejemplo, como anti herbívoros, y que además presentan actividades como la prevención contra el cáncer y actividad antibiótica.

Los glucosinolatos son compuestos con el grupo funcional β -tioglucósido-N-hidroxisulfato. Son además precursores de los isotiocianatos, están presentes en al menos 16 familias de plantas angiospermas dicotiledóneas e incluyen un número grande de especies comestibles. Se han identificado más de 132 glucosinolatos diferentes. La figura 11.3 muestra ejemplos estructurales de varios glucosinolatos naturales. La sinalbina y la sinigrina están presentes en el aceite de mostaza negra *Brassica nigra* y mostaza blanca *Sinapis alba*. La glucorafanina fue aislada inicialmente del rábano *Raphanus sp.*, y está presente en el broccoli *Brassica oleracea*, y la glucomoringina de *Moringa sp.*

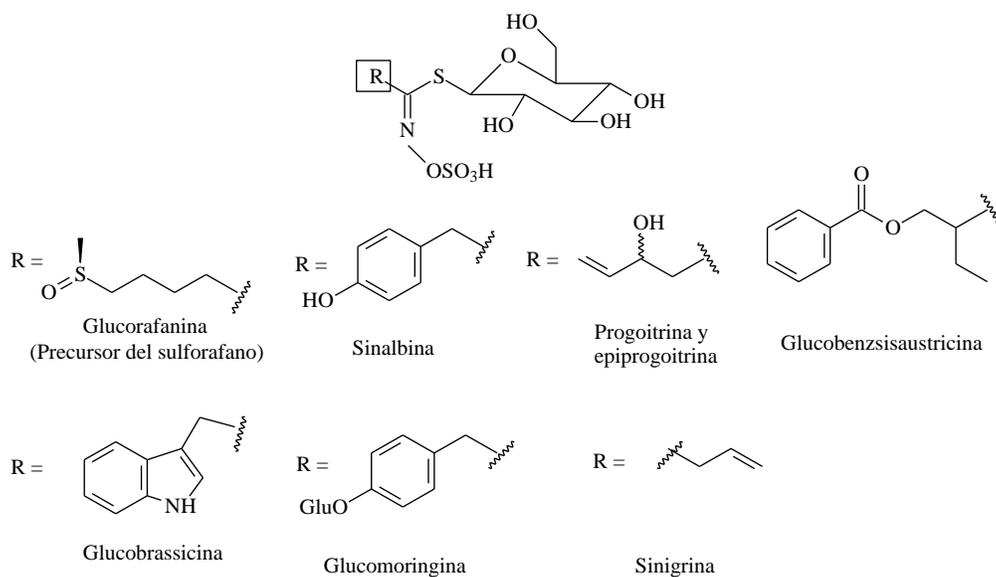


Figura 11.3. Estructuras químicas de algunos glucosinolatos naturales.

Para su estudio sistemático los glucosinolatos actualmente se clasifican en tres grupos, dependiendo de la naturaleza química de la cadena R, y estos son: alifáticos, aromáticos e indólicos. Son ejemplos de glucosinolatos alifáticos la glucorafanina (precursor a su vez del isotiocianato sulforafano) y la progoitrina. Ejemplos de glucosinolatos aromáticos son la sinalbina, la glucobenzisaustricina, y la glucomoringina; y de glucosinolatos indólicos la glucobrassicina.

Se ha tratado de establecer una nomenclatura sistemática para estos compuestos, y se sugiere nombrarlos con el nombre de la cadena R en forma de radical, terminando en las letras GSL. De acuerdo con esto para la sinalbina, corresponde a 4-hidroxibencilGSL, que es la forma abreviada de 4-hidroxibencilglucosinolato. Aunque no hay actualmente unas reglas definidas para la nomenclatura sistemática, esta forma se usa también para los isotiocianatos (ITC) que se originan a partir de los correspondientes glucosinolatos, así siguiendo con el ejemplo de la sinalbina, el isotiocianato que se forma a partir de ella se le nombra 4-hidroxibencilITC.

La biogénesis de los glucosinolatos se lleva a cabo a partir de los aminoácidos precursores leucina, isoleucina, valina, metionina, triptófano, cisteína, y con la participación de sistemas enzimáticos que incluyen las transaminasas.

En cuanto a su estabilidad química, y de una manera muy similar a lo que ocurre con los glicósidos cianogénicos cuando liberan HCN; los glucosinolatos se hidrolizan fácilmente a pH ácido y liberan la molécula de glucosa, dando lugar a la aglucona inestable. Este proceso es realizado por la enzima myrosinasa. A su vez, la aglucona inestable puede dar lugar a varios productos como los epitionitrilos, los nitrilos, los isotiocianatos, los tiocianatos y las oxazolidintionas. La figura 11.3, esquematiza estos procesos. De todos estos compuestos los isotiocianatos son a los que se les atribuyen las propiedades para prevenir el cáncer y enfermedades neurodegenerativas. En el organismo humano, la conversión de los glucosinolatos en isotiocianatos se lleva a cabo gracias a la flora intestinal. El calentamiento a temperaturas superiores a 60°C conduce a la formación de los otros productos como nitrilos, epitionitrilos y tiocianatos, los cuales no presentan las propiedades anticáncer de los isotiocianatos. Existen evidencias reportadas de que el isotiocianato obtenido a partir de la glucomoringina es más potente que el sulforafano, en la quimiopreención del cáncer, y esto se ha demostrado en diferentes bioensayos.

Técnicas de análisis e identificación

Para el estudio de los compuestos azufrados naturales se vienen desarrollando métodos analíticos para su estudio y determinación que incluyen la cromatografía de gases para los más volátiles, la cromatografía líquida HPLC y la espectrometría de masas.

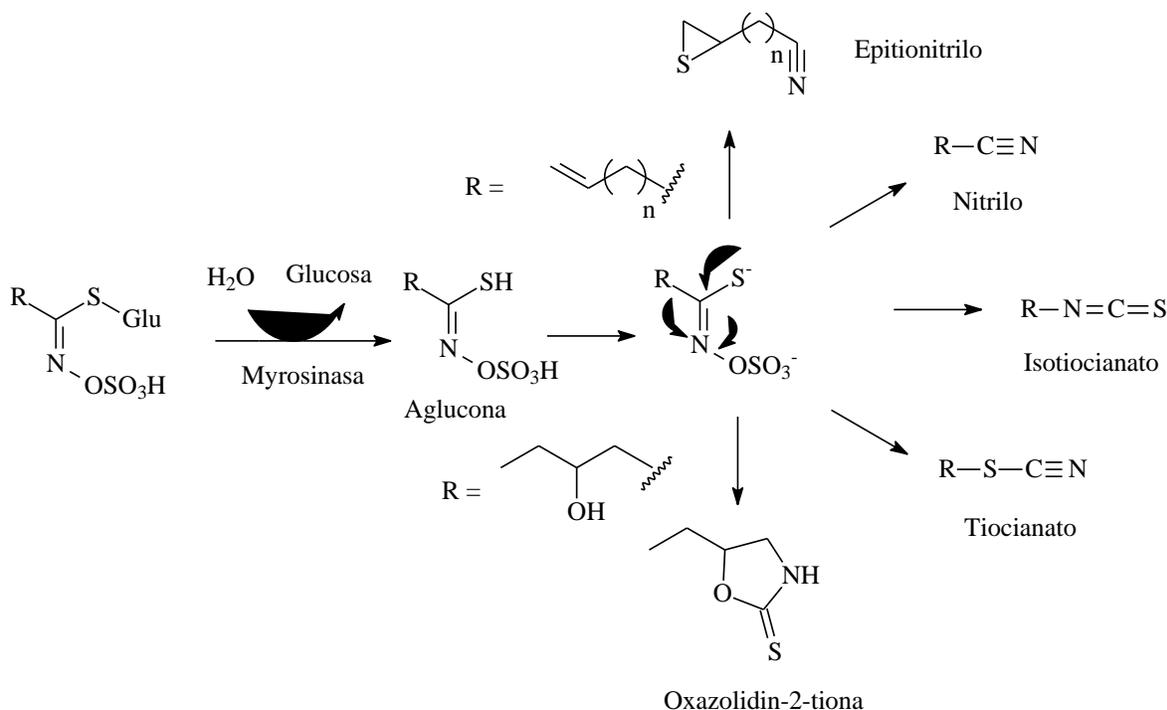


Figura 11.3. Esquema de los procesos de hidrólisis y conversión en diferentes metabolitos a partir de los glucosinolatos.

Con la excepción de los compuestos sulfatados naturales, muchos metabolitos azufrados son inestables a los procesos de extracción y aislamiento que normalmente se utilizan para otras sustancias naturales. Esta inestabilidad ha sido una barrera limitante para el estudio sistemático de estas sustancias, y al revisar la literatura científica se encuentran algunos trabajos que reportan procesos de extracción y análisis complejos utilizando métodos de derivatización para utilizar técnicas analíticas como la cromatografía de gases. Sin embargo, y gracias a que actualmente se está haciendo muy extendido el uso de solventes extractores amigables con el medio ambiente, como los solventes eutécticos DES y NADES; se están facilitando los procesos de extracción de los metabolitos azufrados y de otros metabolitos vegetales como los compuestos fenólicos. Un ejemplo de esto es la extracción de metabolitos de *Moringa oleifera*, utilizando una mezcla de agua caliente presurizada, sulfato de amonio 20%, etanol y el solvente eutéctico NADES obtenido de la mezcla cloruro de colina y ácido cítrico. El uso de estos materiales en la extracción además de ser útil para los procesos de investigación, es de gran potencial para la obtención a nivel industrial de diferentes sustancias como por ejemplo los compuestos azufrados bioactivos, pues se disminuye notoriamente el uso de solventes orgánicos costosos y tóxicos.

Para la extracción y el análisis por cromatografía en capa fina en el caso de las semillas de mostaza blanca y negra, los glucosinolatos se pueden extraer con alcohol caliente, y se utiliza como eluyente la mezcla n-butanol-n-propanol-ácido acético glacial-agua (3:1:1:1),

revelando con una solución de hexacianoferrato-cloruro férrico y ácido tricloroacético. La sinigrina y la sinalbina revelan de color azul.

En cuanto se refiere a los procesos de separación e identificación, se utilizan los métodos combinados de cromatografía líquida y espectrometría de masas con muy buenos resultados, inclusive para realizar otros estudios sobre el papel de estas sustancias en el metabolismo vegetal y en metabolómica. Entre los compuestos que se pueden analizar con esta técnica se incluyen S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), metionina (Met), glutatión (GSH), y disulfuro de glutatión (GSSG). En el caso de SAM, su espectro de masas ESI muestra los iones m/z 298.2 y 250.1, correspondientes a las pérdidas de la cadena del aminoácido y del grupo metilsulfuro, como se aprecia en la figura 11.4.

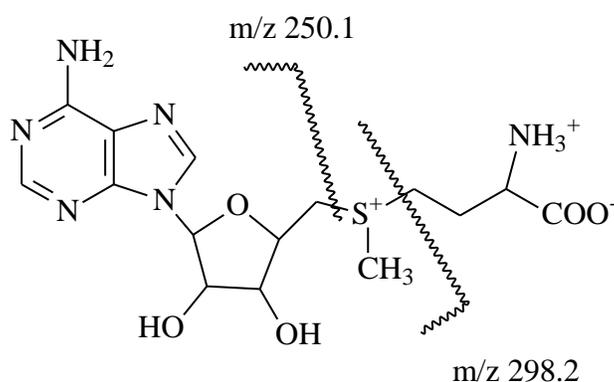


Figura 11.4. Esquema que explica el origen de los fragmentos observados en el espectro de masas ESI de la S-adenosilmetionina SAM.

Síntesis de glucosinolatos

Dado el gran interés en conocer aún más sobre sus propiedades químicas y su potencial bioactivo, se vienen desarrollando métodos para la síntesis de los glucosinolatos. Un ejemplo es la síntesis de los glucosinolatos ω -metilsulfanilalquilados partiendo de cloruros de hidroximoilo funcionalizados en el azufre, vía nitronatos, y acoplamiento final con tioglucosa.

Referencias bibliográficas

1. Linder T. Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 34:51.
2. Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJA. *et al.* MMS19 Assembles Iron-Sulfur Proteins Required for DNA Metabolism and Genomic Integrity. *Science* 2012; 337: 195-199.

3. Kudhair BK, Hounslow AM, Rolfe MD, Crack JC, Hunt DM, Buxton, RS. *et al.* Structure of a Wbl protein and implications for NO sensing by *M. tuberculosis* Nature Comm. 2017; 8: 2280.
4. Lee J, Jung S, Kim N, Shin MJ, Ryu DH, Hwang GS. Myocardial metabolic alterations in mice with diet-induced atherosclerosis: linking sulfur amino acid and lipid metabolism. Sci. Rep. 2017; 7: 13597.
5. Forzani C, Duarte GT, Meyer C. The Plant Target of Rapamycin Kinase: A connector between Sulfur and Growth. Trends Plant Sci. 2018; 23: 472-475.
6. Liang L, Ao L, Ma T, Ni Y, Liao X, Hu X, Song Y. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide. Intern. J. Biol. Macromol. 2018; 106: 447–455.
7. Katerina Valentová K, Katerina Purchartová K, Lenka Rydlová L, Lenka Roubalová L, David Biedermann D, Lucie Petrásková L. *et al.* Sulfated Metabolites of Flavonolignans and 2,3-Dehydroflavonolignans: Preparation and Properties. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19: 2349-2365.
8. Carvalhal F, Correia-da-Silva M, Sousa E, Pinto M, Kijjoo A. Sources and biological activities of marine sulfated steroids. J. Mol. Endocrinol. 2018; 61: T211-T231.
9. Prinsep MR. Sulfur-Containing Natural Products from Marine Invertebrates. Studies Nat. Prod. Chem. 2003; 28: 617-751.
10. Christophersen C, Anthoni U. Organic Sulfur Compounds from Marine Organisms Sulfur Rep. 2007: 365-442.
11. Farfan GA, Apprill A, Webb SM, Hansel CM. Coupled X-ray Fluorescence and X-ray Absorption Spectroscopy for Microscale Imaging and Identification of Sulfur Species within Tissues and Skeletons of Scleractinian Corals. Anal. Chem. 2018; 90: 12559-12566
12. He T, Chambers MI, Musah RA. Application of Direct Analysis in Real Time–High Resolution Mass Spectrometry to Investigations of Induced Plant Chemical Defense Mechanisms—Revelation of Negative Feedback Inhibition of an Alliinase. Anal. Chem. 2018; 21: 12802-12809.
13. Rose P, Moore PK, Zhu YZ. Garlic and Gaseous Mediators. Trends Pharmacol. Sci. 2018; 39: 624-634.
14. Ramirez DA, Locatelli DA, González RE, Cavagnaro PF, Camargo AB. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. J. Food Comp. Anal. 2017; 61: 4–19.
15. Wagner H, Bladt S, Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd. Edition, Springer, Heidelberg, 2009, pp. 291-303.
16. Poojary MM, Putnik P, Kovačević DB, Barba FJ, Lorenzo JM, Dias DA, Shpigelman A. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. J. Food Comp. Anal. 2017; 61: 28–39.

17. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001; 56: 5-51.
18. Aarabi F, Kusajima M, Tohge T, Konishi T, Gigolashvili T, Takamune M. *et al.* Sulfur deficiency–induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants. *Sci. Adv.* 2016; 2: e1601087.
19. Dunbar KL, Scharf DH, Litomska A, Hertweck C. Enzymatic Carbon–Sulfur Bond Formation in Natural Product Biosynthesis. *Chem. Rev.* 2017; 117: 5521–5577.
20. Sønderby IE, Geu-Florez F, Halkier BA. Biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci.* 2010; 15: 283-290.
21. Hanschen FS, Kühn C, Nickel M, Rohn S, Dekker M. Leaching and degradation kinetics of glucosinolates during boiling of *Brassica oleracea* vegetables and the formation of their breakdown products. *Food Chem.* 2018; 263: 240-250.
22. Jaafaru MS, Abd Karim NA, Enas ME, Rollin P, Mazzon E, Abdull Razis AF. Protective Effect of Glucosinolates Hydrolytic Products in Neurodegenerative Diseases (NDDs). *Nutrients* 2018; 10: 580-595.
23. Fahey JW, Olson ME, Stephenson KK, Wade KL, Chodur GM, David Odee D. *et al.* The Diversity of Chemoprotective Glucosinolates in Moringaceae (*Moringa spp.*) *Sci. Rep.* 2018; 8:7994-8008.
24. GLS-Finder: A Platform for Fast Profiling of Glucosinolates in Brassica Vegetables Jianghao Sun, Mengliang Zhang, Pei Chen J. *Agric. Food Chem.* 2016, 64, 4407–4415
25. Lin LZ, Sun J, Chen P, Zhang RW, Fan XE, Li LW, Harnly JM. Profiling of Glucosinolates and Flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (Cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 6118–6129.
26. Botting CH, Davidson NE, Griffiths DW, Bennett RN, Botting NP. Analysis of Intact Glucosinolates by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 983–988.
27. Wagner H, Bladt S, *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd. Edition, Springer, Heidelberg, 2009, pp. 292-299.
28. Hamany Djande CY, Piater LA, Steenkamp PA, Madala NE, Dubery IA. Differential extraction of phytochemicals from the multipurpose tree, *Moringa oleifera*, using green extraction solvents. *South African J. Bot.* 2018; 115: 81–89.
29. Chang YL, Hsieh CL, Huang YM, Chiou WL, Kuo YH, Tseng MH. Modified method for determination of sulfur metabolites in plant tissues by stable isotope dilution-based liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2013; 442: 24–33.
30. Mavratzotis M, Cassel S, Montaut S, Rollin P. ω -Methylsulfanylalkyl Glucosinolates: A General Synthetic Pathway. *Molecules* 2018; 23: 786-401.

31. Jing Q, Hu X, Ma Y, Mu J, Liu W, Xu F. *et al.* Marine-Derived Natural Lead Compound Disulfide-Linked Dimer Psammaplin A: Biological Activity and Structural Modification. *Mar. Drugs* 2019; 17: 384.



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

