

302927



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

2
2ej

ESCUELA, QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS HETEROSIDOS
DE DIOSCOREA MEXICANA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LILI SARAI AUZA BAEZ

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: M. en C. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ

VOCAL: Q.F.B. ESPERANZA HERNANDEZ KOELIG

SECRETARIO: M en C. ALMA MIRIAN NOVELO TORRES

1er. SUPLENTE: M en C. AGUSTIN PALMA DE LA CRUZ

2er. SUPLENTE: Q.F.B. RAUL ALFONSO DIAZ TAGLE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

FACULTAD DE QUIMICA. U.N.A.M

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

EN LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

ASESOR EXTERNO: DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ

SUPERVISOR TECNICO: M en C. ALFONSO S. LIRA ROCHA

ASESOR INTERNO: M en C. VERÓNICA RODRIGUEZ LÓPEZ.

SUSTENTANTE: LILI SARAI AUZA BÁEZ

**ESTA TESIS SE DESARROLLO BAJO LA DIRECCION DE LA DRA.
OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ, COMO SUPERVISOR TECNICO EL M EN
C. ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA. EN LOS LABORATORIOS DE
LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, DIVISIÓN BIOQUÍMICA,
FARMACIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO.**

**Mi más profundo agradecimiento
va dirigido a mi Creador y Padre y
a su enviado, el Hijo Eterno, Jesús.**

**A mis padres
por su amor y confianza**

**A mis hermanos
por su apoyo y interés**

**A la Dra. Ofelia Espejo González
por su valiosa ayuda y dirección.**

**Al M en C. Alfonso S. Lira Rocha
por su importante colaboración en la realización de este trabajo.**

**A la M en C Verónica Rodríguez López
por darme su valioso apoyo**

**Agradezco a todas las personas por su desinteresada ayuda
que hicieron posible la elaboración de este trabajo**

INDICE

CAPITULO	PAGINA
I. - INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES.....	3
2.1 Descripción botánica de la planta.....	3
2.2 Antecedentes teoricos.....	6
2.3 Actividad biológica de glucósidos esteroides	9
2.4 Glucósidos Cardiacos.....	9
2.5 Propiedades Químicas	11
2.5.1 Hidrólisis Alcalina	11
2.5.2 Hidrólisis Acida.....	12
2.5.3 Reacción de acetilación	13
2.6 Determinación de la estructura de los Heterósidos.....	13
2.6.1 Los métodos químicos.....	14
2.6.2 Métodos instrumentales.....	15
III.- PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1 Material y metodos.....	16
3.2 Análisis Cromatográfico.....	18
3.2.1 Separación por cromatografía en placa preparativa	
Componentes más polares de la mezcla.....	19
3.2.2 Cromatografía en columna.....	20

3.3	Identificación de los componentes de la mezcla del extracto purificado de glucósidos totales de <i>D.mex</i>	24
3.3.1	Sapogeninas	24
3.3.2	Glucósidos espirostánicos.....	25
3.3.3	Glucósidos furostánicos.....	32
3.3.4	Componentes más polares fracción 19, 20 (punto de aplicación).....	34
3.3.5	Obtención de derivados.....	34
3.3.5.1	Obtención de derivados metoxilados.....	34
3.3.5.2	Obtención de derivados acetilados	35
3.3.6	Otros glucósidos	35
3.3.7	Cromatografía en capa fina analítica placas de alta resolución.....	36
IV.-	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
V.-	CONCLUSIONES.....	46
VI.-	ESPECTROS.....	48
VII.-	BIBLIOGRAFIA.....	54

1.- INTRODUCCION

La diosgenina fue aislada (1936) de rizoma de *Dioscorea tokoro Makino*, posteriormente R.E. Marker (1947) encontro que en una planta mexicana llamada Cabeza de Negro (*Dioscorea mexicana* Guillemín)¹ se encontraba la diosgenina en forma de glucósido en gran cantidad, lo que propició su utilización comercial para obtener hormonas esteroides.

Sin embargo, debido a su bajo rendimiento en diosgenina se utilizó finalmente el rizoma de *D.composita* o de *D. villosa* llamados en forma general barbascos, como la principal fuente de materia prima en la producción de hormonas esteroidales.

Puede suponerse que el desplazamiento de *D. mexicana* por *D. composita* como fuente principal de diosgenina, no solamente fue debido al mayor rendimiento de la materia prima para la obtención de esteroides, sino también a la cantidad de metabolitos secundarios de naturaleza esteroideal que presenta, que van desde varias sapogeninas de cadena semiabierta inestables, como también la desprovista de los anillos E y F: criptogenina, que impurifican la materia prima útil, además de las sapogeninas de cadena cerrada espirocetálica, principalmente diosgenina.

Originalmente sólo se estableció la estructura de las sapogeninas esteroidales, encaminándose su estudio a la conversión de algunas de ellas en la síntesis de hormonas.

Posteriormente y desde 1938 se conocieron algunos de los precursores de la diosgenina en plantas como *Trillium erectum* (raíz de Beth), *Dioscorea nippona*, etc.

En 1966 Schreiber y Ripperger^{1,2} aislaron por primera vez uno de estos precursores identificado como un nuevo furostanol 26-O-glucósido jurubine,

(25S-3 β -amino-5 α -furostan-22 α , 26-diol 26-O-glucopiranosido), años más tarde Tschesche, Lüdke y Wulff^{3,4} aislarón la 25S-5- β -furostan-3 β , 22 α ,26-triol 3-O-bis-(β -D-glucopiranosido 1-2,1-6)- α -L-ramnopiranosil, 26-O-glucopiranosido (caracterizado como furostano-3,22,26-triol 3,26-O-bisglucosido de sarsaparillosa).

En 1975 se empezó el estudio de los precursores de saponinas o saponinas en plantas mexicanas como *Dioscorea composita* (Barbasco)⁵. Recientemente se ha hecho un extenso estudio sobre los precursores de saponinas aisladas con referencia a su actividad biológica, en terminos generales y en forma más específica³.

El trabajo de J.G.Hernández R⁶ representa un paso inicial en el estudio de los glucósidos de *Dioscorea mexicana* Guillemin que inicialmente fueron clasificados como furostánicos y espiróstánicos, además de estudiar su actividad biológica.

El presente trabajo complementa el estudio de los glucósidos de *Dioscorea mexicana* Guillemin, se discute también su posible actividad biológica, tanto farmacológica como de uso potencial en el control biológico de insectos y plantas.

II.- GENERALIDADES.

2.1.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA.

- Nombre científico: *Dioscorea mexicana* Guillemín⁷.
- Nombre común: CABEZA de NEGRO
- Familia: Diosc (Dioscoreaceae).
- Distribución: Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Guerrero,
San Luis Potosí y Yucatán, toda la América.
Central hasta Panamá.
- Localidad típica: cercanías de Panixthahuaca, Juquila, Oaxaca.
- Sinónimos: *D. anconensis* Knuth = *D. mexicana* Guillemín.
D. astrostigma Uline = *D. mexicana* Guillemín.
D. Billbergiana Kunth = *D. mexicana* Guillemín.
D. Leiboldrana Kunth = *D. mexicana* Guillemín.
D. macrophylla Mart, et Ga l = *D. mexicana* Guillemín.
D. propingua Hemsl = *D. mexicana* Guillemín.

La familia de las Dioscoreaceas está formada por 10 géneros y cerca 650 especies divididas en dos tribus (Dioscoreaceae y Stenomenideae que son monoicas), distribuidas ampliamente en los trópicos, y subtropicos ligeramente en las zonas templadas del norte.

La clasificación de las especies del género *Dioscorea* ha sido muy confusa debido al pequeño tamaño de las flores dioicas y a la variabilidad de sus hojas.

Las especies mexicanas cuya clasificación se basa en la estructura de la flor masculina, no ha sido la excepción.

Esto despierta algunas inquietudes respecto a la clasificación de *Dioscorea mexicana* que tiene un rizoma hemisférico tuberoso, con una corteza

con prisma muy diferente a los de la *Dioscoreas* clásicas cuyos rizomas típicos son de formas alargadas y delgadas y están sumidos profundamente en la tierra (lo que no sucede con *D. mexicana*), un ejemplo típico es el de *D. composita*.

Los resultados encontrados indican la posibilidad de que se trate de una especie menos evolucionada dentro de la familia de las *Dioscoreaceae*, por ello sería conveniente revisar la clasificación de esta planta, tal vez tomando en cuenta las características químicas que presenta.

Todas las especies desarrollan rizomas, los cuales le sirven a la planta como reserva de alimento, con el fin de que pueda sobrevivir en tiempos de sequía o bien en invierno, son atractivas para los animales que cavan y comen tubérculos puesto que son fuentes ricas en almidón

Sin embargo las *dioscoreas* durante su evolución han adquirido características especiales que las protegen contra depredadores.

Algunas han desarrollado tubérculos muy profundos, otras poseen espinas, algunas presentan sabores desagradables, o bien contienen sustancias tóxicas para los animales.

Los rizomas de algunas plantas del género *Dioscorea* fueron desde tiempo muy remoto conocidos como comestibles y algunos como venenosos en el Viejo Mundo y en América; pero llamaron más la atención desde que se descubrió en 1940 la diosgenina, con los trabajos de Marker⁸.

Dioscorea mexicana es una planta dioica, trepadora, de rizoma hemisférico tuberoso, tubérculo prismático de 15-25 cm de grosor, a veces más grande, la mitad sobresale de la tierra

Planta robusta con el tallo liso, las hojas alternadas, largamente pecioladas, la lámina semicoriácea, anchamente ovada, truncada o profundamente cordada en la base, gradualmente acuminada y largamente apiculada en el ápice; verde brillante en la superficie superior y algo amarillento,

blanquecina en la inferior; completamente glabra, con 7-9 nervaduras prominentes.

Inflorescencia masculina simple o compuesta, de 15-30 cm de longitud con flores pequeñas que poseen 6 estambres fértiles, centrales, muy cortos, rodeando un rudimentario estilo cónico.

Inflorescencia femenina simple; los periantios globosos de 1.5-2 cm de ancho; los segmentos siempre en dos series sésiles iguales; con 6 estaminodios, pequeños; estigma subsésil, gruesos, divergentes, ahorquillado en el ápice cápsula oblongo-oval de 2.5 cm de longitud, semilla oblonga, alada por todos lados.

2.2.- ANTECEDENTES TEORICOS.

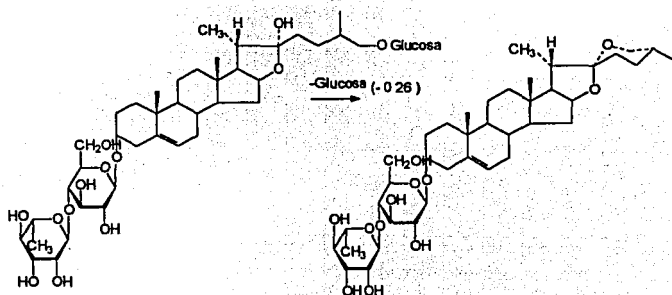
Los metabolitos secundarios son productos del metabolismo de rutas metabólicas especiales o de la biosíntesis a partir de metabolitos primarios (Los metabolitos primarios son los metabolitos del metabolismo general, que son esenciales y comunes para todo ser vivo, ejemplo de ello son los aminoácidos, la acetil coenzima A, monosacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, etcétera).

Los metabolitos secundarios se encuentran restringidos, encontrándose principalmente en plantas y microorganismos, como ejemplo de ello tenemos: alcaloides, glucósidos, terpenos, fenoles, y flavonoides, entre otros, que aparentemente no son esenciales para el organismo que los produce, pero pueden ser importantes reguladores de procesos bioquímicos de otros organismos⁹.

Los glucósidos esteroidales forman, particularmente, un grupo interesante de metabolitos secundarios, estos se detectan en alrededor de setenta familias de plantas ampliamente distribuidas en monocotiledonias, y principalmente en tres de ellas: *Liliaceae* (*Yucca* y *Trillium* spp), *Amaryllidaceae* (*Agave* spp) y *Dioscoreaceae* (*Dioscorea* spp).

Dioscorea mexicana produce durante su proceso metabólico ciertos compuestos que tienen una estructura esteroideal, la cual puede encontrarse unida a varios azúcares para dar lugar a glucósidos, en estos teóricamente pueden encontrarse todos los azúcares naturales conocidos en mayor o menor proporción, sin embargo, en la práctica se restringen a unas pocas moléculas. Los glucósidos cuyos aglucónes son de cadena abierta, están representados por una serie de compuestos aparentemente de transición, (figura No 1), que en el medio de hidrólisis, dan origen a sapogeninas de cadena cerrada (espirocompuestos), (figura No 1), especialmente diosgenina que se encuentra

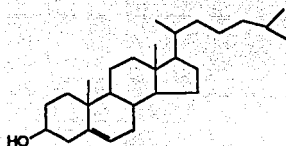
abundantemente en otras especies del género como los representados en *D. composita*.



Transformación de Glucósidos furostánicos en glucósidos espirostanicos

FIGURA 1

Se supone que todos los aglucones provienen biogénicamente del colesterol.



ESTRUCTURA DEL COLESTEROL

FIGURA 2.

El término más apropiado para nombrar a los glucósidos es el de heterósido, cuyo prefijo indica que la molécula está formada por dos clases diferentes de sustancias y el sufijo hace referencia a que una de ellas es un azúcar que se le llama "radical osídico", a la otra fracción se le conoce como aglucon o genina.

Los glucósidos cuyo aglucón deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno tienen gran importancia farmacológica y económica; ejemplo de ellos es el aglucón de los heterósidos cardiotónicos, la digitonina y el aglucón de las saponinas esteroidales la diosgenina.

La saponinas (del latin *sapon*: jabón consistencia de) esteroidales, ampliamente distribuidas en plantas superiores, se caracterizan por que forman soluciones coloidales con el agua y poseen la propiedad de formar espuma jabonosa con ella ya que abaten la tensión superficial; en este fenómeno se basa la identificación preliminar de estos compuestos, siendo muy útil en la investigación de campo durante la recolección de material vegetal.

Las saponinas esteroidales de 27 átomos de carbono, y con un esqueleto hidrocarbonado semejante al del colesterol son tóxicas y tienen acción hemolítica.

El aglucón de las saponinas se nombra sapogenina (son formadas como un resultado de la hidrólisis ácida o enzimática de saponinas).

De acuerdo a la estructura del aglucón las saponinas se dividen en dos diferentes grupos: saponinas neutras, que son derivados ciclopentanoperhidrofenantreno (I) y saponinas ácidas de naturaleza triterpénica (II). Los esqueletos bases de los aglucones se presentan en la figura 3.

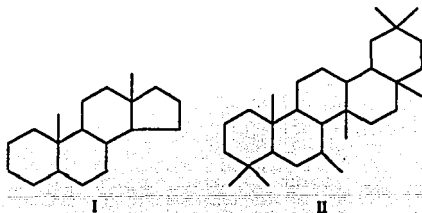


FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL AGLUCON DE LAS SAPOGENINAS.

2.3.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE GLUCÓSIDOS ESTEROIDES.

En general las saponinas son sustancias altamente emulsificantes, tóxicas, hemolíticas y capaces de formar complejos con el colesterol.

La actividad biológica de varias saponinas, particularmente de saponinas esteroidales se reportó durante el período de 1972-1979⁴. Estas actividades comprenden la acción sobre el metabolismo, acción sobre el sistema cardiovascular, en el sistema reproductor, actividad antimicrobiana¹⁰, antiesclerótica, hipotensiva y antiinflamatoria¹¹.

Un tipo especial de glucósidos esteroides es el de los glucósidos cardíacos.

2.4.- GLUCÓSIDOS CARDÍACOS.

De las plantas del género *DIGITALIS*, ha sido posible aislar más de quince glucósidos cardíacos, entre ellos la *Digoxina*, la *Digitoxina*, Ouabaina, lanatósido B, lanatósido C, Gitoxina, Gitalina, etcétera.

Estos compuestos químicos debido a su estructura molecular poseen un efecto terapéutico en la contractilidad muscular del corazón.

La planta *digitalis* produce durante su proceso metabólico ciertos compuestos que tienen una estructura esteroideal en forma de aglúcon¹², la cual puede encontrarse unida a un azúcar para dar lugar a su glucósido. Debido a que estos compuestos tienen actividad farmacológica sobre el corazón se les conoce como: glucósidos cardiotónicos.

La estructura química de los glucósidos cardíacos¹³ (*Digoxina*, *Digitoxina*, y *ouabaina*) se presenta en la figura 4.

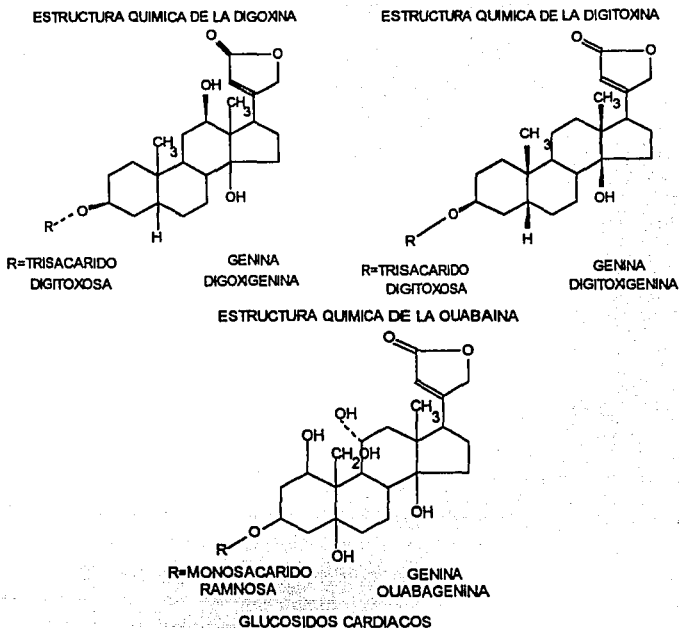
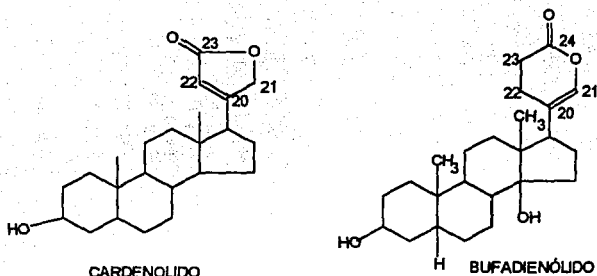


FIGURA 4

Las geninas poseen un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno y están relacionadas químicamente con los ácidos biliares, vitamina D, hormonas sexuales y venenos segregados por las glándulas parótidas y la piel de ciertos sapos¹³. Puede distinguirse dos tipos de geninas, según posean un anillo lactónico pentagonal o hexagonal, conocido como cardenólidos en el primer caso y bufadienólidos en el segundo caso (figura 5)¹⁴.



SAPOGENINAS DE GLUCÓSIDO CARDIACOS.

FIGURA 5

2.5.- PROPIEDADES QUÍMICAS.

Muchos de los heterósidos son solubles en agua, alcohol y en mezcla de alcohol-agua. Son escasamente solubles o insolubles en cloroformo y en éter.

La solubilidad depende tanto de la naturaleza del azúcar como de la del aglicón.

La solubilidad en disolventes orgánicos disminuye a medida que aumenta el número de azúcares.

Son relativamente estables frente a los álcalis, pero pueden ser hidrólizados fácilmente en medio ácido a sus correspondientes azúcares y aglicones.

2.5.1.- HIDRÓLISIS ALCALINA.

Los heterósidos por ser acetales deberían ser resistentes a la hidrólisis con bases y por lo tanto no exhibir poder reductor frente a la solución de Fehling, sin embargo, algunos si la reducen y esto es debido a la estructura que poseen¹⁵

Los sensibles a este tipo de hidrólisis comprenden los siguientes grupos:

- a) Heterósidos de fenoles.
- b) Heterósidos de enoles conjugados con un grupo carbonilo.
- c) Heterósidos de alcoholes con sustituyentes electronegativos en posición beta.

2.5.2.- HIDRÓLISIS ÁCIDA.

Esta reacción es de gran importancia en el estudio de los heterósidos puesto que permite establecer el tipo de aglucón y azúcares que lo componen. La mayor o menor facilidad de hidrólisis depende en gran medida de factores estructurales como:

a) Efecto del aglucón.- Por regla general los heterósidos con aglucón alifático serán hidrólizados menos rápidamente que los aromáticos. El tipo de sustituyentes que soporten los oxhidrilos libres hará más o menos estable el enlace heterosídico.

b) Conformación del anillo piranósido.- Las formas más estables de los ocho posible confómeros de la glucosa son los que corresponden a las formas de silla.

c) Substitución en el carbono 5.- Al incrementar la substitución en este carbono hay un efecto estabilizador que se refleja en una mayor resistencia a la hidrólisis.

Los heterósidos a diferencia de algunos azúcares no son compuestos capaces de reducir el nitrato de plata y las sales de cobre debido a que cuando se forma la unión heterosídica se bloquea la función aldehídica del azúcar. Sólo pueden reducir a tales agentes cuando su aglucón posee grupos reductores como sucede con el aglucón del estrofantósido K.

2.5.3.- REACCIÓN DE ACETILACIÓN.

Los grupos hidróxilos libres de los heterósidos pueden formar derivados acetilados, que son de gran utilidad en la determinación de su estructura.

Los agentes acetilantes más utilizados han sido el ácido acético glacial y el anhídrido acético. Los catalizadores más empleados son acetato de sodio anhidro o cloruro de zinc, también se han usado piridina, anhídrido trifluoroacético, ácido sulfúrico o perclórico.

Cuando el radical oligosacárido es relativamente grande y ramificado, da lugar a compuestos parcialmente acetilados. Los heterósidos acetilados, a su vez, son hidrolizables por tratamiento ácido. El impedimento estérico y la temperatura afectan la formación de los derivados acetilados de los heterósidos.

2.6.- DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS HETERÓSIDOS.

Es posible determinar la estructura química de un heterósido cuando se establece:

TABLA I

El tipo de aglucón y azúcar	(Estructura primaria)
El tipo y cantidad de azúcares que los constituyen	(Estructura secundaria)
La secuencia y el sitio de unión entre los azúcares. La estereoquímica de la unión glicosídica.	(Estructura terciaria)

La estructura de un heterósido se puede determinar por métodos químicos o instrumentales.

2.6.1.- LOS MÉTODOS QUÍMICOS. TABLA II.

TABLA II

Estructura que establece	Metodo principal	Identifica
Primaria	Hidrólisis total con ácidos minerales o enzimática y la posterior identificación de los productos de reacción por la formación de derivados o degradación de la molécula a compuestos conocidos	Tipo de aglúcon y azúcares.
Secundaria	Basado en las propiedades reductoras de los azúcares. Los productos de reducción pueden determinarse, por gravimetría, volumetría o colometría.	Si un heterósido se encuentra en forma de pirano o de furano.
Terciaria	Hidrólisis parcial	Secuencia y sitio de unión de un heterósido, que es homólogo superior de otros ya conocidos.
	Preparación de derivados metilados e hidrólisis y los productos son comparados con azúcares parcialmente metilados.	ibid
	Oxidación con ácido peryódico y análisis de los productos.	ibid
	Medición o determinación de las diferencias de rotación molecular entre el glucósido y su aglicón. Hidrólisis enzimática	La estereoquímica de la unión glicosídica. Enlace anomérico.

2.6.2.- METODOS INSTRUMENTALES.

Entre los métodos instrumentales que prestan gran ayuda para la determinación de la estructura de los metabolitos secundarios y en particular de los heterósidos tenemos; sólo o acoplada a cromatografía, la espectrometría de masas, la rotación óptica, la resonancia magnética nuclear de carbono¹³(R.M.N.¹³C) y de hidrógeno-1(R.M.N.¹H)¹⁶.

El estudio del espectro de R.M.N.-¹H de derivados acetilados de heterósidos y de azúcares puede ser en sus diferentes modalidades de gran utilidad en la identificación de éstos compuestos y en la asignación de su estereoquímica ^{17,18}.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- MATERIAL Y METODOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos: los espectros IR fueron registrados en un espectrofotómetro Nicolet FT-5SX, los espectros de RMN- H^1 se determinaron en un instrumento Varian VXR-300S (200 MHz), y en un instrumento Varian EM-360 (60 MHz), utilizando como disolvente piridina(d_5) y como referencia interna TMS.

Los espectros de absorción U.V se determinaron en un Espectrofotómetro BECKMAN DU-68, velocidad de barrido 750 nm/min.

Los análisis preliminares de los extractos, se realizaron mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice 60F₂₅₄, Merck). Para la detección de los constituyentes a la luz ultravioleta de onda corta y larga (UV 254/366 NM).

En la separación por cromatografía en placa preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20x20 cm con gel de sílice (60 F₂₅₄) con un espesor de capa de 2 mm, desactivada con acetona con 1% de agua. Para cromatografía en capa fina analítica se utilizaron placas de alta resolución de 10x10 cm, 200 μ de espesor.

Los glucósidos empleados en el presente trabajo se obtuvieron a partir de un rizoma de cabeza de negro, (*Dioscorea Mexicana*) colectado en Pichucalco, Chiapas.

La extracción se realizó con metanol utilizando el rizoma, desprovisto de corteza, cortado en trozos pequeños, y previamente desengrasado con hexano.

Los extractos se purificaron por sucesivas precipitaciones con metanol. Este material se nombró "mezcla o extracto purificado de glucósidos".

A partir de este extracto purificado se obtuvo por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando cloruro de metileno, metanol, agua

(8.5;1.5;0.1) como eluyente; una fracción que por análisis cromatográfico con reactivo de Ehrlich⁴, produjo varias manchas de color rojo. A esta fracción se le llamó "glucósidos furostánicos" y se usó como materia prima para una separación posterior.

El análisis preliminar mediante C.C.F, visualizando la cromatoplaque con luz U.V y posteriormente tratamiento con reactivo de Ehrlich y calentamiento se desarrolló un color rosa intenso, que identifica a los glucósidos furostánicos (aquellos en los que el anillo F está abierto y el oxhidrilo del C-26 está en forma glucosídica), fig 6, posteriormente en esa misma placa se detectan los glucósidos espirostánicos fig 6 mediante aspersion con H₂SO₄ 5N y calentamiento.

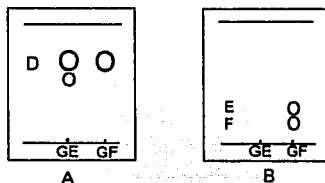


fig. 6. Cromatografía en capa fina del extracto de rizoma de *D.mexicana*, y *D.composita*. Sistema. CHCl₃-MeOH-H₂O(6.5:3.5:0.68). Revelado en A) react H₂SO₄ 5N. B) React de Ehrlich.

G.F: fracción de "glucósidos furostánicos" de *D.mex*, GE; extracto purificado de *D.comp* (glucósidos totales)

3.2.- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

Los análisis preliminares de los extractos, se realizaron mediante cromatografía en capa fina (c.c.f) y los sistemas de elución son los siguientes:

TABLA III

Sistema de disolvente	Composición	Proporción
A	CHCl ₃ :EtOAc	80:20
B	CHCl ₃ :EtOAc	50:50
C	CHCl ₃ :EtOAc	60:40
D	Benceno:EtOAc	8:2
E	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH:H ₂ O (desionizada)	8.5:1.5:0.01
F	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH:H ₂ O	7.0:2.9:1.0
G	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH:H ₂ O: CH ₃ -COOH.	8.5:1.6:0.019:5.4X10 ⁻³ * microlitros*
H	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH:H ₂ O: (CH ₃) ₂ CO	2.4:1.5:2.3:6.3
I*18	CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O	7:3:0.4
J*2	CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O	6.5:3.5:0.68
K	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH	9:0.5

REFERENCIAS:

Se utilizarón como muestras de referencia:

- a) un extracto purificado de *D. composita* (glucósidos totales).
- b) *D. mexicana*, "mezcla o extracto purificado de glucósidos".
- c) *D. mexicana*, fracción de "glucósidos furostánicos".
- d) diosgenina-3-O-bis(α -L-ramnopiranosil-1-2,1-4)- β -D-glucopiranosido (triglucósido D o dioscina).
- e) criptogenina.
- f) diosgenina.

****NOTA:** Las mezclas utilizadas han sido previamente separadas y determinado la estructura química de algunos de sus componente individuales 6,19,20.

Tomando en cuenta el Rf de cada uno de los constituyentes y comparando con el Rf de los patrones de referencia se visualizó a los componentes de la mezcla, permitiendo en ocasiones la identificación de algunos de ellos.

3.2.1.- SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN PLACA PREPARATIVA.**COMPONENTES MÁS POLARES DE LA MEZCLA.**

Inicialmente, la mezcla de glucósidos totales se analizó por C.C.F. analítica, usando el sistema de elución F. Al revelar con reactivo de Ehlich en la cromatoplaque se observan dos manchas ($Rf_1 = 0.26$, $Rf_2 = 0.18$) que se denominaron sustancias A y B respectivamente, la mancha correspondiente al punto de aplicación, da positiva la misma prueba, lo que indica la presencia de glucósidos furostánicos en todos los casos. Al revelar la misma placa con H_2SO_4 5N se detectan un mayor número de manchas, que corresponden a los glucósidos espirostánicos. Con el fin de establecer la cantidad de componentes

presentes en el punto de aplicación se utilizó el sistema de elución G, desarrollando cuatro veces y posteriormente en el sistema H, observándose una sola mancha ($R_f = 0.65$, sustancia C) que reveló con el reactivo de Ehrlich.

De acuerdo a los resultados anteriores una muestra (200 mg) de los glucósidos totales se sometió a una separación con C.C.F preparativa (sistema de elución F y después en G) después de desarrollarse la cromatoplaaca se recuperó la banda (3.6 mg) del punto de aplicación y se sometió a otra C.C.F. preparativa (sistema de elución H). La cromatoplaaca se reveló parcialmente con reactivo de Ehrlich para visualizar la banda del compuesto furostánico (sustancia C), que se recuperó de la cromatoplaaca.

3.2.2.- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

6.5 g de extracto purificado de glucósidos totales de *D.mexicana* adsorbidos en 8.5 g de SiO_2 , se fraccionaron por cromatografía en columna de gel de sílice en proporción 1/100, en una columna de vidrio de 121 cm de longitud y 4.7 cm de diámetro interno.

Se usaron como adsorbente 650 g de gel de sílice (diámetro de partícula 0.063-0.20 mm) desactivada con acetona-agua: el proceso de elución se efectuó con cloruro de metileno, cloruro de metileno-metanol; en diferentes proporciones hasta llegar al sistema de elución E (tabla III), para separar los glucósidos espirostánicos. Posteriormente se utilizó el sistema de elución G y por último se eluyó con el sistema H. El volumen de los eluatos fue de 200 ml y cada uno se concentró al vacío hasta un volumen de 20 ml, aproximadamente. La semejanza de los constituyentes, observados mediante el análisis en C.C.F, que permitió la reunión de cada uno de los eluatos obteniéndose 340 fracciones que se trataron por separado a fin de poder aislar y purificar los metabolitos.

Se evaporó el eluyente orgánico en condiciones de presión reducida y a bajas temperaturas, el agua se eliminó mediante el proceso de liofilización y se obtuvieron las fracciones, indicadas en la tabla V.

En la tabla IV, en las figuras 7 y tabla V se resume los sistemas de eluyentes empleados, el No. de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Tabla IV. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto purificado total de glucósidos de *D mexicana*.

TABLA IV.

Eluyente	Proporción	No de fracciones	fracciones combinadas
Cloruro de metileno-metanol	9:0.5	1-18	1-2,3-8,8-7,8-9,10-18
Cloruro de metileno-metanol	9:1.0	19-59	19-33, 34,35,36, 37-40,51,52-59
Cloruro de metileno-metanol-agua	8.5:1.5:0.001	60-111	60-69, 73-75, 77-84,85-100, 104-111
Cloruro de metileno-metanol-agua	8.5:1.5:0.01	112-174	112-134,135-144, 145-151,152-154, 155-159,160-165, 167-168,169-174
Cloruro de metileno-metanol-agua-ácido acético	8.5:1.6:0.019:5.4* *microlitros	176-324	176-236, 237-324.
Cloruro de metileno-metanol-acetona-agua	2.4:1.5:6.3:2.3	325-340	325-334. 335-340.

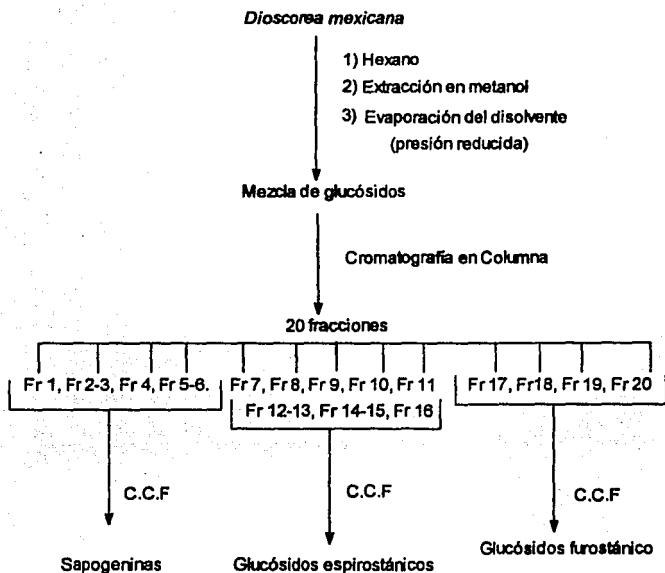
Figura 7.- Extracción y Fraccionamiento del *D. mexicana*.

Tabla V.- Fraccionamiento del extracto metanólico de *Dioscorea mexicana*

TABLA V

Fraccion	Fracciones de la columna	mg
1	3-5	8.0
2	10-18	9.0
3	19-28	
4	30-35	
5	36-40	
6	41-50	
7	51-63	79.8
8	73-75	29.3
9	85-100	147.6
10	104-143	81.7
11	145-151	77.0
12	152-154	104.4
13	155-159	30.8
14	160-165	69.0
15	167-169	5.4
16	170-174	54.8
17	176-236	393.7
18	237-324	177.1
19	325-334	1075.2
20	335-340	65.2

**3.3.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DEL
EXTRACTO PURIFICADO DE GLUCÓSIDOS TOTALES DE
D.MEXICANA.**

3.3.1.- SAPOGENINAS.

En los primeros eluatos (cloruro de metileno-metanol, 9:0.5, 9:1.0) después del volumen muerto, se detectó, la presencia de sapogeninas esteroides, de acuerdo a la siguiente tabla. VI.

TABLA VI.
Sapogeninas en el extracto total de *D.mexicana*

Fracción	Compuesto identificado	Rf Sistema	Metodo de identificación	características de la mancha.
1	dieno de diosgenina		Comparación con una muestra auténtica	color lila. (H ₂ SO ₄ 5N /calor)
2	diosgenina	0.97. B	comparación con una muestra auténtica espectroscopía R.M.N.H (espectro 1)	
3	diosgenina	0.52. A		
4	Pennogenina	0.63. B	Comparación con muestra auténtica.	mancha fluorescente azul morado que corre por arriba de criptogenina. (H ₂ SO ₄ 5N/calor).
5	criptogenina	0.29. B	comparación con una muestra auténtica espectro IR (espectro 2)	mancha roja (Ehrlich).
6				

Fracción 5 y 6. De estas fracciones se aisló un compuesto caracterizado como criptogenina que de acuerdo a los siguientes datos

p. f. = 166-172 °C. (cristalizada en metanol)

Espectro de IR (espectro 2): 3409, 3446 de mayor intensidad (-OH), 3561, 3636(-OH), 2727(C-H), 1726 (-C=O, anillo, cetónico de cinco miembros, cetona alifática), 1701 (-C=O, cetona alifática), 1626 (-C=C-), 1462 (-CH₃), 1377 (-CH₃), 1052. (-C-O). No se presentan las bandas características de las saponinas espirostánicas²⁰.

3.3.2.-GLUCÓSIDOS ESPIROSTÁNICOS.

En las fracciones 7 a 13, se identificarán los glucósidos espirostánicos. Lo anterior, se efectuó por comparación con muestras auténticas en el sistema de elución I, G, E (tabla III).

Tabla VII.- Comparación de los valores de R_f para los glucósidos aislados con los compuestos previamente identificados, utilizando la mezcla de disolvente indicada.

TABLA VII.

Fraccion	Compuesto Identificado	Rf sistema	Método de Identificación	características de la mancha
7	monoglucósido de diosgenina	0.11 K 0.30 E 0.78 J	Comparación con resultados previamente obtenidos, de muestra auténtica y previamente identificado.	revelado con H ₂ SO ₄ 5N y calor (mancha color violeta que al enfriar pasa café- claro)
8	diglucósido de diosgenina	0.03 K 0.17 E 0.60 I 0.75 J	Comparación con resultados previamente obtenidos de muestra auténtica y previamente identificado	café-claro
9	triglucósido de diosgenina	0.15 E 0.48 I 0.67 J	Comparación con el compuesto auténtico espectro, R.M.N. ¹ H R.M.N. ¹³ C (espectro 3 y 4)	café-claro
10	Glucósido D*	I		
11		I		
12		0.62 I	No identificada	café -claro
13		0.59 I		
		0.54 I 0.47 J		

Se separan 3 manchas denominadas como 1, 2, 3 (tabla VII) y que corresponden a los compuestos identificados en, un trabajo previo⁶ como: "glucósido A mex", "glucósido B mex", "glucósido D mex" cuya estructura es:

Compuesto 1."glucósido A mex", diosgenina-3-O- β -glucopiranosido.
(monoglucósido de diosgenina).

Compuesto 2."glucósido B mex", diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil, 1-4)- β -D-glucopiranosido. (diglucósido de diosgenina)

Compuesto 3."glucósido D mex", diosgenina-3-O-bis (α -L-ramnopiranosil-1-2, 1-4)- β -D-glucopiranosido (triglucósido de diosgenina, glucósido *D composita*)^{19,20}.

Este último fué caracterizado por sus constantes físicas y espectroscópicas.

P f: 257°C.

R.M.N¹H (espectro 3), RMN¹³C.(espectro 4).

Se encuentra además una mancha por debajo del triglucósido D, espirostánico, que no se identificó.

Comparación de los espectros de Diosgenina (espectro 1) y del Glucósido D de Diosgenina, Diosgenina-3-O-bis(α -L-ramnopiranosil-1-2,1-4)- β -D-glucópiranosido (espectro 4)

TABLA .VIII

No de carbono	Diosgenina	Diosgenina ²¹	glucósido D
1	37.84	37.43	37.54
2	32.25	31.79	32.33
3	71.16	71.89	78.79
4	43.4	42.46	42.00
5	142.0	141.02	140.87
6	121.0	121.60	121.82
7	32.54	32.25	32.2
8	31.82	31.64	31.74
9	50.49	50.25	50.355
10	37.07	36.84	37.16
11	21.2	21.07	21.13
12	40.02	39.99	39.9
13	40.54	40.46	40.49
14	56.83	56.72	56.69
15	32.35	32.04	32.33
16	81.14	81.03	81.14
17	62.96	62.28	62.9
18	16.4	16.49	16.34
19	19.6	19.63	19.4
20	42.49	41.80	42.0
21	15.0	14.73	15.0
22	109.2	109.50	109.27
23	30.61	31.59	31.8
24	29.3	28.99	29.3
25	30.6	30.49	30.6
26	66.89	67.04	66.9
27	17.5	17.35	17.33

Fracción de carbohidretos del glucósido D de diosgenina (300.049 en MHz, en C_5D_5 a temperatura ambiente, espectro 4).

TABLA IX

Número de carbono	Glucósido D
3-Glucósido	
1	102.93
2	81.14
3	77.16
4	78.1
5	77.89
6	61.3
Ramnosa (1-2)	
1	102.02
2	72.5
3	72.8
4	74.13
5	70.4
6	19.4
Ramnosa (1-4)	
1	100.32
2	72.11
3	72.7
4	73.90
5	69.5
6	18.6

En el espectro de R.M.N.- C^{13} (espectro 4) de la fracción de sapogenina se observan un total de 27 átomos de carbono y tres señales de carbono anomérico de un triglicósido^{21,22}

El espectro de R.M.N.C¹³ del glucósido D muestra tres señales de carbono anómero de un triglicósido, los cuales corresponden a los átomos de carbonos anómeros, a 102.93 ppm que corresponde a D-glucosa, 102.2 ppm una molécula de L-ramnosa y 100.32 ppm que corresponde a L-ramnosa ^{22 23}

La configuración del C-3 es beta y la fusión ente el anillo A y B es trans, la unión es ecuatorial en el oxígeno del carbono 3 de la aglicona²⁴. Existe una insaturación entre C5 y C6 que introduce señales fácilmente reconocibles de 140.0 + ó - 0.8 y 121.0 + ó - 0.4 ppm asignados al carbono C5 y C6 respectivamente²⁵

Exhibe las señales de los carbonos para grupos hidroxilos, δ 66.89 corresponde al C26, δ 71.16 (d) para el C3 y δ 81.14 (d) para el carbono 16, que puede ser comparados con aquellos del espectro de R.M.N.-C¹³ de Diosgenina²¹.

En el espectro H¹NMR (espectro 3) es de notarse que el C-3 de la diosgenina, en los glucósidos se encuentra desplazado + 7.0 ppm debido a la substitución glucósídica, a bajo campo en compañía de efectos inasimétricos en carbonos vecinales altamente protegidos del C-4 (1.8 - 4.6 ppm) que el C-2 (1.0 - 3.0 ppm)²⁷

La configuración anómerica del D-glucosa y L-ramnosa es establecida como alfa y beta respectivamente, por la constante de acoplamiento de las señales del proton anómero en el espectro de H¹NMR²⁶.

Entre 2 - 0.6 ppm se localizan las interacciones de los protones alfa y beta de los anillos A, B, C, y D excepto C-10, C-13²⁴.

La señal de dos metilos ángulares beta, terciarios aparecen entre δ H 0.65 -1.35 ppm (18-H y 19-H)²⁸

Entre 1 - 1.98 ppm (H, 21 - Me ó 27 - Me; ancha, d, 5H -ramnosa ó 6-CH₃ ramnosa x 2; -CH₂- ; d, 3H ramnosa. Entre 1.99 - 2.2 ppm (3H de ramnosa, 5 -

Me, d, H-6'' de ramnosa, 6 CH₃ de ramnosa x 2; 25-H. Entre 3.35 - 3.65 ppm se encuentran las bases de los grupos hidroxilo. Entre 4.0 ppm - 4.99 ppm (1H, triplete 16-H; 2-H'' de ramnosa; 1H; s, de ramnosa, d; 1-H, dd; 1-H, d, de glucosa; 1H, dd, H-3, de ramnosa; 1 H, m, 3-H; d,H-5'ramnosa)^{26,29}

La señal que se encuentra entre 4.5 - 5.4 indica la presencia del grupo CH-O-CH (azúcar) y HC=CH del aglicón^{5,17}.

La identificación fue hecha y confirmada por comparación con los datos reportados en la literatura de los espectros H¹.N.M.R y C¹³ N.M.R^{20,21,22}.

El glucósido C no es muy evidente cuando se revela con H₂SO₄ 5N.

Aparentemente no se encuentra libre en la planta y sólo aparece como producto de hidrólisis de otros glucósidos de tipo furostánicos (figura 10) situado entre el glucósido B y el glucósido D. Se considera que el glucósido C de diosgenina es un isómero del glucósido B de diosgenina en el cuál una ramnosa está unida al glucósido en la posición 1-2, mientras que en el glucósido B lo hace en la posición 1-4 (figura 10).

3.3.3.- GLUCÓSIDOS FUROSTÁNICOS

Tabla X. Glucósidos furostánicos.

Fraccion	compuesto	Rf. sistema	Método de identificación	características de la mancha
14 15	glucósido E	0.43 I	Comparación con el compuesto auténtico	Rosa intenso (Ehrlich)
16	glucósido E glucósido F	0.43 I 0.34 I	Comparación con el compuesto auténtico	Rosa intenso (Ehrlich)

Glucósidos del punto de aplicación

17	Glucósido E Glucósido F	0.46 J 0.35 J	Comparación con muestra auténtica	Rosa intenso (Ehrlich)
18	Glucósido E Glucósido F	J	Comparación con muestra auténtica	Rosa intenso (Ehrlich)
19	Glucósido F Glucósido G	J	Comparación con muestra auténtica	Rosa intenso (Ehrlich)
20	Glucósido F Glucósido G	J	Comparación con muestra auténtica	Rosa intenso (Ehrlich)

En las fracciones 15 y 16 cuyos valores de Rf en el sistema J son de 0.46, 0.35 respectivamente (tabla X) se identificaron los glucósidos 4 y 5 llamados E y F de tipo furostánico, que aparecen también en el punto de aplicación de las fracciones 17-20.

El sistema de disolvente E, I (tabla III), se utilizó para intentar separar los componentes más polares que permanecen en el punto de aplicación (p.a). Esta porción mostró por C.C.F tener Rf muy cercanos por lo cual resulta difícil de separar. Se decidió probar otras mezclas de disolventes, y se llegó al sistema J (tabla III).

Con el objeto de separar las fracciones pertenecientes al punto de aplicación los glucósidos 4' y 5', (que corresponden por C.C.F. a los glucósidos E y F obtenidos anteriormente, de la fracción a la que se le llamó "glucósidos furostánicos", ya que sus componentes revelan con el reactivo de Ehrlich, característico de saponinas furostánicas) se llevarón acabo las siguientes operaciones:

1. -I.- La fracción 17, constituída por una mezcla de componentes, que presentan por C.C.F, (sistema J), iguales características de revelado con Ehrlich que los glucósidos E y F provenientes de *D.mexicana* de Rf 0.46, 0.35 respectivamente, se cristaliza en metanol, en frío, obteniéndose una substancia de color café; se decanta el metanol, y se recristaliza con acetona, hexano, produciéndose un sólido cristalino de color café. Peso de los cristales: 178.7 mg.

II.- 50 mg de esta fracción 17 se aplican, en una placa cromatografica identificándose dos fragmentos que se extraen por separado. Del fragmento a, se obtiene 6.5 mg y del fragmento b (9.1 mg). Mediante C.C.F. y utilizándose como eluyente el sistema J. Se obtuvieron los siguientes valores de Rf: para el fragmento a de 0.28, 0.41 y para el fragmento b de 0.41, que corresponden a los glucósidos llamados E' y F'.

2.- 137.1 mg obtenidos de la fracción liofilizada 18, fuerón separados por cromatografía en columna abierta (137.1 mg absorbidos en 0.2g de SiO₂

desactivada, utilizando en proporción 100:1 se realizó una cromatografía en columna de vidrio de 65 cm de longitud; diámetro interno 1.1 cm).

El proceso de elución se inició con cloroformo, incrementando la polaridad hasta llegar a la mezcla J. Los productos obtenidos se identifican mediante C.C.F. como glucósidos 4 y 5 ó como E Y F

Estos productos se purifican por cromatografía en capa fina sin embargo no fue posible separarlos de esta manera ni mediante cromatografía preparativa. Para comprobar la naturaleza furostánica de estos compuestos, se intentó la formación de derivados (3.3.5).

3.3.4 - COMPONENTES MÁS POLARES, FRACCIÓN 19, 20 (PUNTO DE APLICACION).

Los intentos para separar e identificar los componentes más polares en los diferentes medios dieron aproximadamente los mismos resultados: en el sistema J. (tabla III) de Rf 0.46 y 0.35, en el sistema I de Rf 0.43, 0.34 que corresponden a los glucósidos denominados 4' y 5' o E' y F'.

En la separación de los glucósidos, de la fracción 19 mediante C.C.F (placas de alta resolución) utilizando el sistema J, como eluyente visualizado con lámpara de U.V. y después con el reactivo Ehrlich; se aprecian tres manchas que fueron denominadas: glucósido 4', 5' ó E', F' y una mancha más, denominada compuesto 6 ó G, que no pudieron ser aislados en forma pura en cantidades suficientes para su estudio químico y espectroscópico.

3.3.5.- OBTENCIÓN DE DERIVADOS

3 3 5 1.- OBTENCIÓN DE DERIVADOS METOXILADOS.

Para comprobar la naturaleza furostánica de estos compuestos se intento la formación de derivados metoxilados, 20 mg de la fracción 18 se colocan a

reflujo con 2 ml de MeOH por una hora, treinta y cinco minutos, después, se evapora completamente a sequedad el producto de la reacción y se analizó por H¹.R.M.N. El espectro muestra una banda característica de grupo metoxi, posiblemente, debido a la formación del cetál.

3.3.5.2. OBTENCIÓN DEL DERIVADOS ACETILADOS.

Se hicieron reaccionar

a) 1 ml de piridina anhidra y 5.6 ml de anhídrido acético por cada 100 mg de la fracción 19.

b) 3 ml de piridina anhidra y 6 ml de anhídrido acético por 170.6 mg de la fracción 17.

En los dos casos la mezcla de reacción se dejó 24 horas a temperatura ambiente, al transcurrir el tiempo señalado se procesó de la manera habitual¹⁹ vertiendo la mezcla de reacción en hielo y extrayendo con CHCl₃.

El producto resultante fué analizado por cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice, utilizando como eluyente cloroformo:metanol 90:10, Se observa una mancha con R_f de 0.60 y con estela, cuando se utiliza Benceno-Acetato de etilo 6:4, se encuentran 4 productos con diferentes R_f que no se aislaron.

3.3.6.- OTROS GLUCÓSIDOS.

3.3.6.1. Entre los glucósidos llamados D y E, aparecen otras manchas que revelan con reactivo de Ehrlich y a las que se les identifica preliminarmente como los posibles precursores de los glucósidos B y C, espirostánico, que se encuentran en las fracciones 11 (77.0 mg), 12 (104.4 mg), 13 (30.8 mg). Cuando estos se comparan con los patrones de referencia de los glucósidos espirostánicos mencionados como a), b), c), d), y que presentan por C.C.F.

0.62, 0.59 y 0.54 como valores de Rf en el sistema de elución I, se observan: como manchas de color rosa (Ehrlich) por abajo del glucósido D, con Rf = 0.62, mancha de Rf, 0.59 y otra cuyo Rf es de 0.54 (visualizada con H₂SO₄ 5N).

Esta última se denominó glucósido C y es espirostánico (no revela con Ehrlich), finalmente se detectó otra mancha cuyo valor de Rf es de 0.47 (visualizada con el reactivo de Ehrlich).

3.3.7.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA ANALÍTICA, PLACAS DE ALTA RESOLUCIÓN.

En un análisis preliminar de los patrones de referencia: *D. mexicana*, "mezcla o extracto purificado de glucósidos", *D. mexicana*, fracción de "glucósidos furostánicos". Mediante cromatografía en capa fina analítica, placas de alta resolución empleando el eluyente J, la fracción de glucósidos furostánicos (liofilizada): 19 que originalmente pertenece el punto de aplicación.

Una variante consiste en desarrollar el cromatograma por dos veces consecutivas en el disolvente J. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta se detectan los constituyentes, marcando la zona, raspando la franja correspondiente de gel de sílice y extrayendo con un disolvente (metanol-cloroformo). Cada uno de las fracciones se concentra posteriormente.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

La presencia de las sapogeninas en la "mezcla o extracto purificado de glucósidos" no es evidente. Durante la separación de glucósidos utilizando cromatografía en columna, en los primeros mililitros de volumen eluido después del volumen muerto, la presencia de sapogeninas se detectó por C.C.F. muy posiblemente como productos de descomposición por el paso a través de la columna de gel de sílice y no como componentes originales del extracto.

Se identificaron, un posible dieno de diosgenina, producto de la deshidratación de diosgenina, cuya polaridad en C.C.F. es menor que la de cualquier sapogenina, además de diosgenina, pennogenina y criptogenina, esta última característica de *D. mexicana* y que no se encuentra en otras especies de *Dioscorea*, aunque se ha reportado en algunas otras sapogeninas^{1,2}

La Criptogenina es un acompañante invariable de diosgenina cuya estructura tiene la particularidad de presentar la cadena lateral completamente abierta (derivado del colestano o del coprostano) con dos grupos cetónicos y un OH primario terminal. En cuanto al núcleo, es el mismo de la diosgenina, y su estructura completa está representada por (25R)-3 β , 26-dihidroxi-5-colesterol-16,22-diona o colesterol-5 ene, 16, 22-diona, 3, 26 dihidroxi (3 β , 25 R)¹⁶.

El extracto purificado de glucósidos que fué utilizado en este trabajo, mostró contener dos tipos de compuestos: los que por sus características no producen un resultado positivo con el reactivo de Ehrlich, y que se identificarán por C.C.F por comparación con compuestos auténticos, que corresponden a los glucósidos espirostánicos A, B y D de *D. composita*.

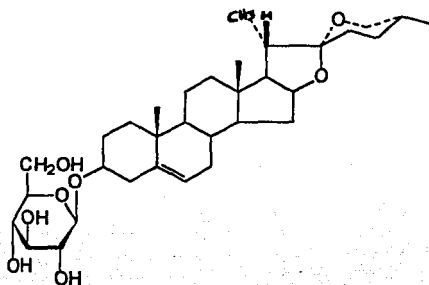
Estos fuerón definidos como;

Compuestos de la serie A:

Las estructuras de estos glucósidos fueron determinadas en un trabajo anterior^{19,20} y caracterizados como:

Glucósido A.

p.f 250-540.°C; ir,cm⁻¹: 3450, 2900-3000. 1650 (s), 890, 920 (señal iso-sapogenina), identificado por comparación con el auténtico como glucósido espiroestánico, Diosgenina-3-O-β-D-glucopiranosido (figura 8).



ESTRUCTURA I. GLUCOSIDO A.
Diosgenina -3-O-β-D-glucopiranosido.

FIGURA 8.

Glucósido B.

p. f 222-224 °C; ir, cm⁻¹: 3420, 2900-2980, 2650, 1390, 910-890 (señal iso-sapogenina), identificado por comparación con un compuesto auténtico como glucósido espiroestánico Diosgenina-3-O-(α-L-ramnopiranosil,1-4)-β-D-glucopiranosido.

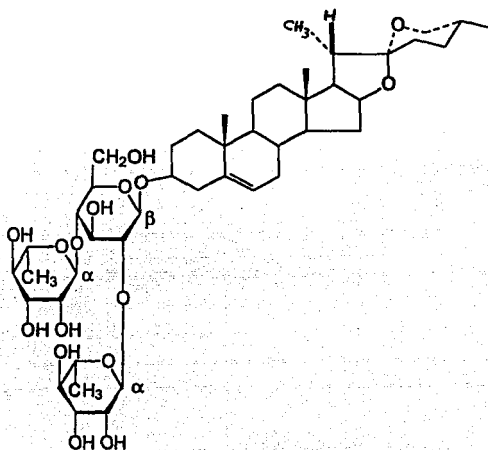
Glucósido D.

pf 257°C

Caracterizado como el glucósido *D mex*, fué identificado por C.C.F no sólo por comparación con una muestra auténtica de Dioscina, sino identificado

así mismo por sus características fisicoquímicas y espectroscópicas³² (espectros 3, 4) sobre la cuál se hicieron los estudios que le llevarón a la determinación de la estructura.

Este compuesto fue caracterizado como: Diosgenina-3-O-bis-(α -L-ramnopiranosil 1-2, 1-4)- β -D- glucópiranosido. (figura 9).



ESTRUCTURA 2 GLUCOSIDO D

Diosgenina -3-O-bis -(α -L-ramnopiranosil 1-2, 1-4)- β - D- glucopiranosido .

FIGURA 9

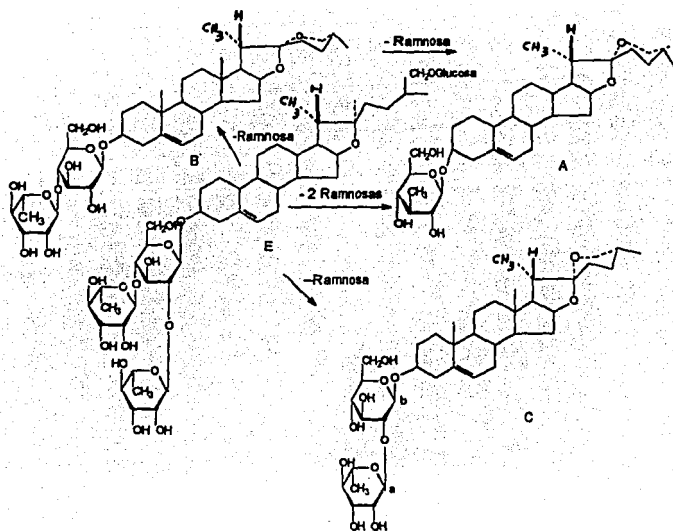


FIGURA 10.

Compuestos serie B.

El primero de estos compuestos es el denominado glucósido D*, de cadena abierta (por revelar, positivo rosa intenso con el reactivo de Ehrlich) y se encuentra situado por debajo del triglucósido D espiroestánico.

Ademas el glucósido C y el D* (triglucósido) son productos simultaneos de la hidrólisis del glucósido E, puesto que aparecen al mismo tiempo^a(figura 10, 11).

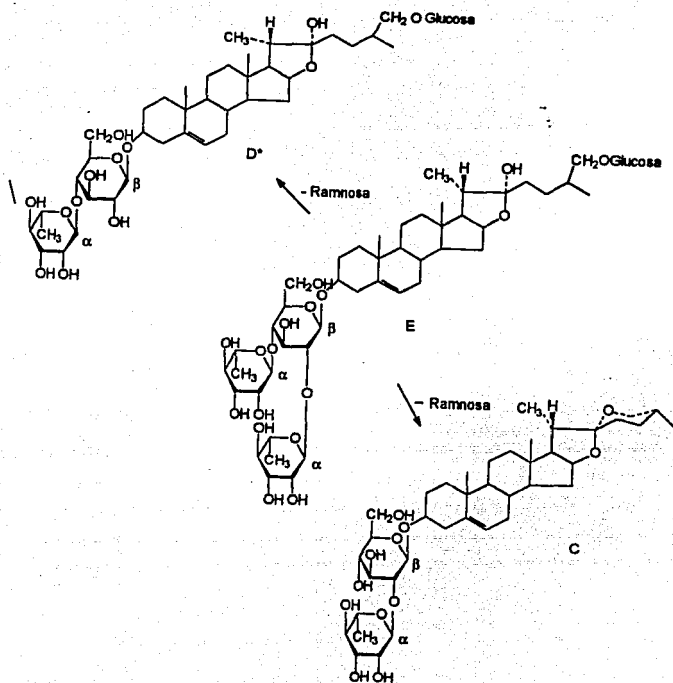


FIGURA 11

Los glucósidos furostánicos están presentes en cantidades que aparentemente son comparables con las del glucósido D, considerando como mayoritario y en el caso de *D.composita* a veces considerado como único.

Las constantes físicas de los glucósidos fueron determinadas en un trabajo anterior^{5,6,20} y caracterizados como:

Glucósido E

p.f 204-205 °C [α]= - 66 (MeOH); ir, cm^{-1} 3400, 2930, 1630-1650, 1630-1650, 1380 (no existen bandas iso-sapogeninas en 920 y 890 cm^{-1}).

Glucósido F

p.f 215-216 °C ir, cm^{-1} : 3400, 2920, 1630, 1380, (no existen bandas iso-sapogeninas en 920-890 cm^{-1}).

Estos compuestos fueron identificadas por C.C.F por similitud con los compuestos 4 y 5 ó E y F.

Por otra parte, en este trabajo en el contenido de la fracción del punto de aplicación, se separan por C.C.F dos glucósidos, compuestos de aparente transición, que en medio de hidrólisis dan origen a diosgenina.

Se trató de separar estos glucósidos de la fracción del punto de aplicación por medio de una serie de métodos cromatográficos en placa, columna, sin embargo no se obtuvieron buenos resultados.

La pequeña cantidad obtenida hizo imposible su identificación directa y la C.C.F comparativa con los glucósidos E y F obtenidos e identificados en las otras fracciones y en un trabajo anterior no fue definitiva, ya que no fué posible determinar si simplemente son los glucósidos E, F, anteriormente identificados, o se trata, de nuevos glucósidos ya que se quedan retenidos en el punto de aplicación o se separan de él en forma más o menos errática, dependiendo de los disolventes.

Uno de estos compuestos denominado glucósido F presenta un OH hemiacetálico que desaparece al hacer reaccionar el compuesto con metanol del compuesto original, es sustituido en el H¹.N:M:R. por un metoxilo.

La señal de un grupo MeO en 3.47 ppm sugiere la estructura de un compuesto 22 metoxilfurostánico (figura 12).

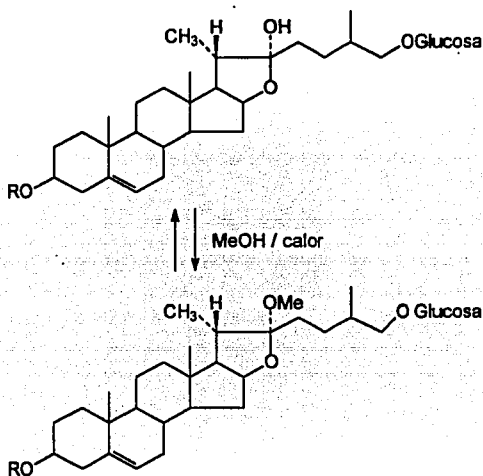


FIGURA 12

Con el empleo de cromatografía en capa preparativa (placas de alta resolución) se obtiene una buena resolución para estos glucósidos E', F' y aparece un compuesto más, denominado glucósido G.

La preparación de derivados acetilado, tampoco dió buenos resultados ya que el producto de reacción da como resultado una mezcla de 4 compuestos.

En comparación con los precursores glucosídicos de la Diosgenina en *D.composita*, que son practicamente en forma exclusiva de naturaleza espirostánica, en *D. mexicana* se encuentran mayoritariamente glucosídica.de cadena abierta, de naturaleza furostánica (figura 13).

ESTRUCTURA QUIMICA DEL GLUCOSIDO E DE *D. Mexicana* .

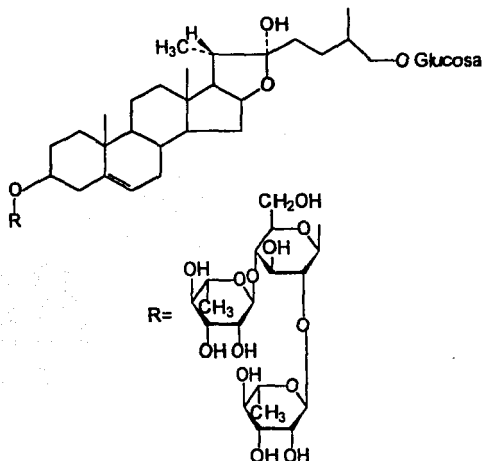


FIGURA 13.

Aparentemente esta diferencia hace que tenga una actividad biológica diferente de la *D.Composita*.

De acuerdo con trabajos publicados³⁰ la mezcla purificada de los glucósidos de *D.mexicana* tiene efecto sobre la metamorfosis del insecto cuculionido *Tenebrio molitor* y un efecto letal por via oral sobre la mosca de la fruta *Anastrepha ludens*, que es menor en el caso de los glucósidos *composita*.

El primero de los efectos fue atribuido a la semejanza que existe entre los glucósidos furostánicos y la ecdisona (figura 14), hormona de la muda de ciertos insectos.

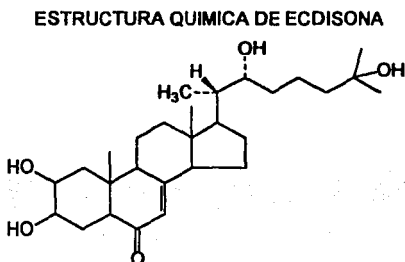


FIGURA 14

Tomando como punto de partida las experiencias de este trabajo, sería deseable continuar el trabajo experimental e intentar el aislamiento de los llamados "glucósidos del punto de aplicación" para determinar tanto su estructura como su posible actividad biológica sobre insectos.

Como resultado del estudio del extracto metanólico total de *Dioscorea mexicana* Guillemín se obtuvieron las siguientes:

V. CONCLUSIONES

1.- SAPOGENINAS ESTEROIDES.

Se identificaron como componentes del extracto metanólico: diosgenina, pennogenina y criptogenina, además de un dieno de diosgenina.

Sin embargo, la presencia de sapogeninas como componentes originales de la planta, no es evidente, ya que las sapogeninas pueden ser productos de descomposición de los glucósidos originales ocasionadas por el adsorbente.

2.- GLUCÓSIDOS ESTEROIDES.

D. mexicana (Guillemín) contiene dos tipos de componentes glucosídicos de naturaleza esteroide: los llamados glucósidos espiroestánicos con seis anillos en su estructura (serie A) y los clasificados como furoestánicos, con cinco anillos (serie B).

I.- Se identificó por comparación con muestras auténticas a los siguientes glucósidos de la serie A:

"glucósido A mex", diosgenina-3-O- β -glucopiranosido (figura 8).

"glucósido B mex", diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil, 1-4)- β -D-glucopiranosido (figura 10).

II El glucósido D de la serie A, fué identificado por métodos espectroscópicos (R.M.N.¹H, R.M.N.¹³C) y comparación con una muestra auténtica como:

Diosgenina-3-O-bis-(α -L-ramnopiranosil 1-2,1-4)- β -D-glucopiranosido
(figura 9)

III.- Se identificó por comparación con muestras auténticas los siguientes compuestos de la serie B, como:

"glucósido D* mex", 26-O- β -D-glucopiranosido-(25 R)-furostano-5-ene-3 β , 22, 26-triol 3-O-(4-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido.

"glucósido E mex", 26-O- β -D-glucopiranosido-(25 R)-furostano-5-ene-3 β , 22, 26-triol 3-O-(2,4-di-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido.

IV.- El extracto purificado que contiene principalmente glucósidos de la serie B (Glucósidos furostánicos), muestra la presencia de al menos dos compuestos más polares que los Glucósidos E y F, y que fueron inicialmente denominados Glucósidos E' y F', y que no fue posible purificar adecuadamente para efectuar su descripción e identificación.

ANEXO
V.- ESPECTROS

ESPECTRO 1.

R.M.N.¹³C. DIOSGENINA

ESPECTRO 2.

IR CRIPTOGENINA

ESPECTRO 3.

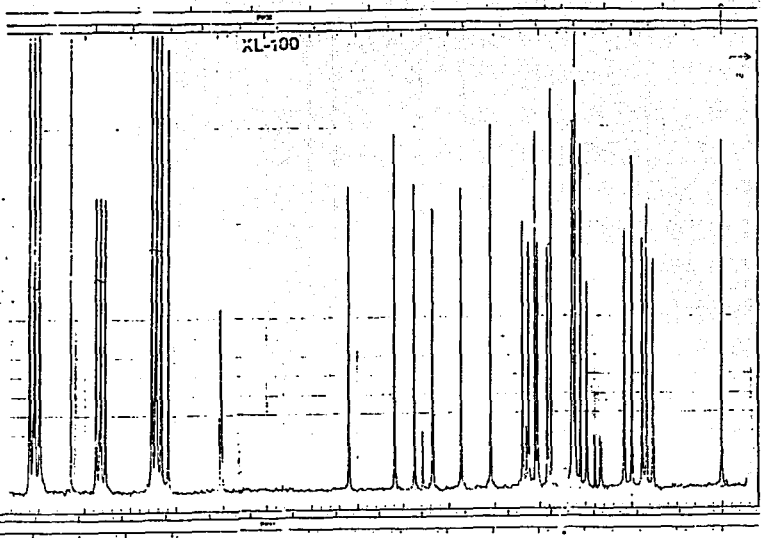
R.M.N.¹H GLUCÓSIDO D

ESPECTRO 4.

R.M.N.¹³C GLUCÓSIDO D

ESPECTRO 5

R.M.N.¹³C GLUCÓSIDO D



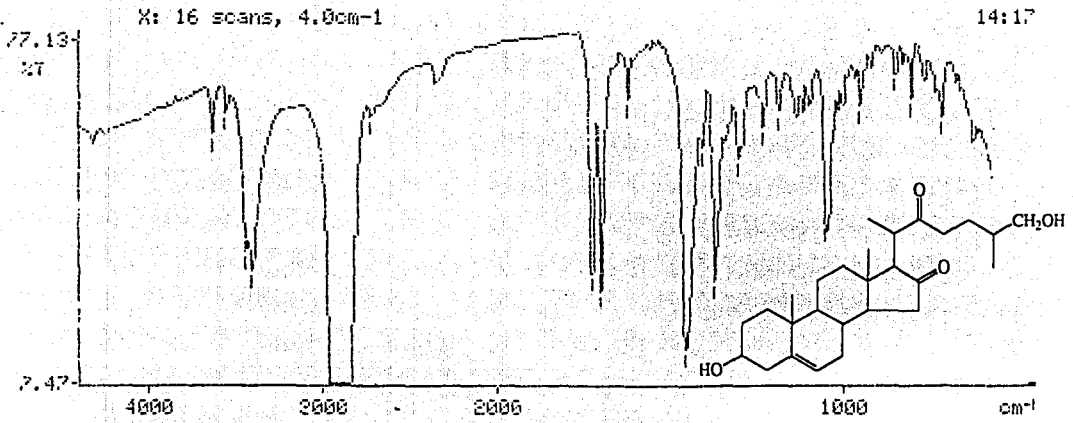
ESPECTRO 1

R.M.N. ¹³C

DIOSGENINA

FALLA DE ORIGEN
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FALLA DE ORIGEN



Default Region: X

Espectro total

Setup

Copy

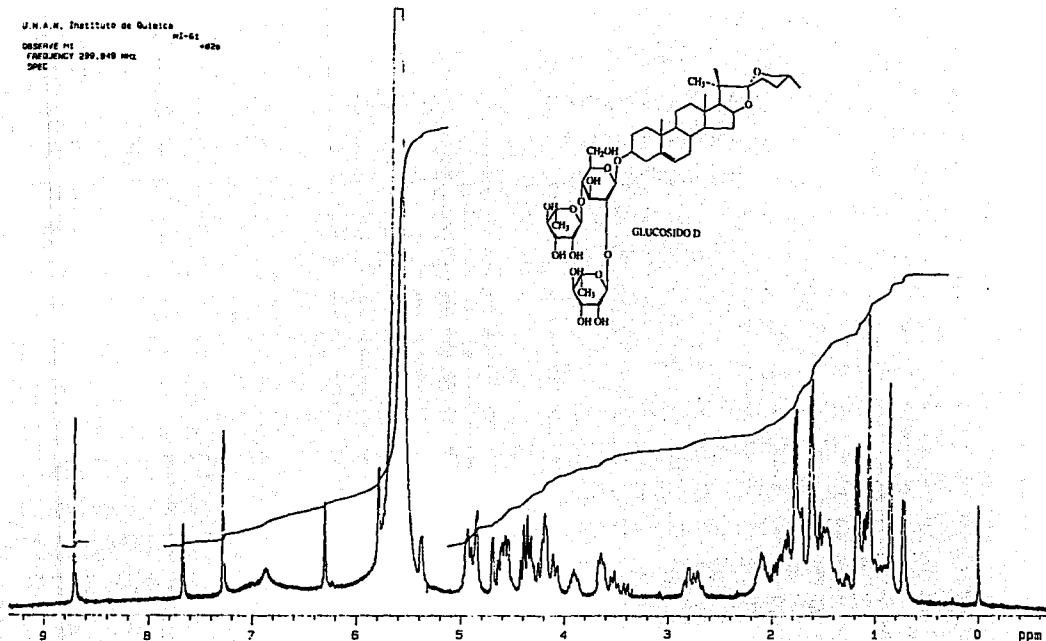
scan
READY

Derive

ESPECTRO 2

IR CRIPTOGENINA

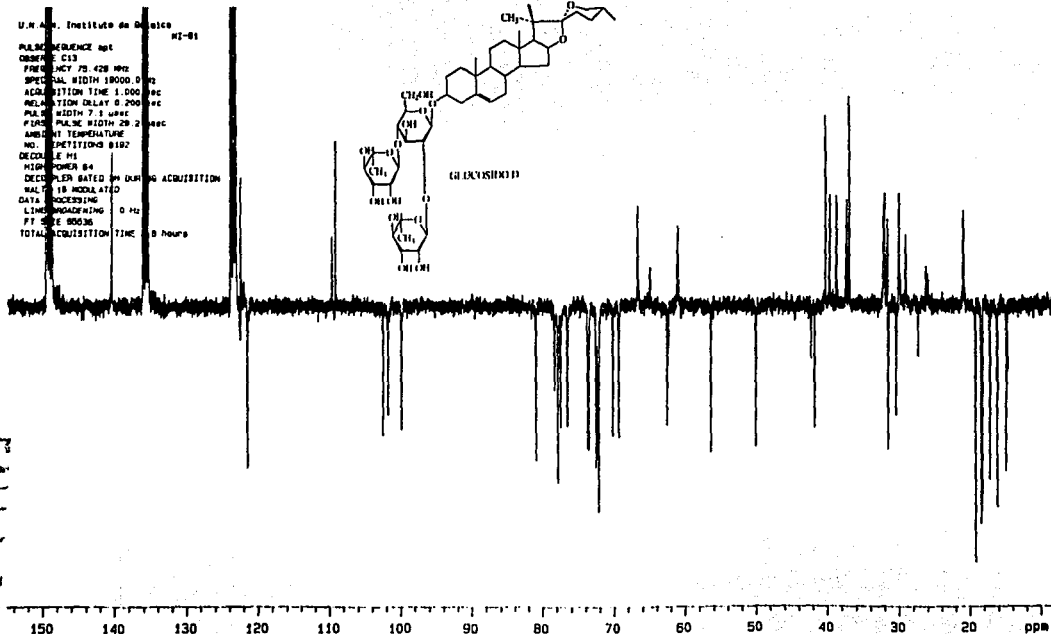
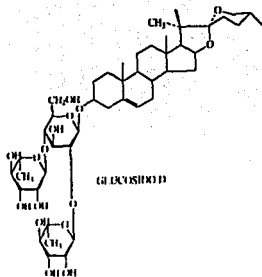
J.N.A.M. Instituto de Químico
#1-61
OBSERVE #1
FREQUENCY 200.849 MHz
SPEC



FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 3
R.M.N. ¹H GLUCÓSIDO D

U.N.A. Instituto de Químico
 HI-81
 PULS SEQUENCE apt
 OBSERVE C13
 FREQ NCY 75 428 MHz
 SPECIAL WIDTH 18000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 1.000 sec
 RELAXATION DELAY 0.200 sec
 PULSE WIDTH 7.5 usec
 P1P2 PULSE WIDTH 29.2 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. SPECTITIONS 8192
 DECUPLE H1
 HIGH POWER 84
 DECOUPLED 84 DURING ACQUISITION
 MAG 18 MODULATED
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0 Hz
 FT SIZE 80036
 TOTAL ACQUISITION TIME 8 hours



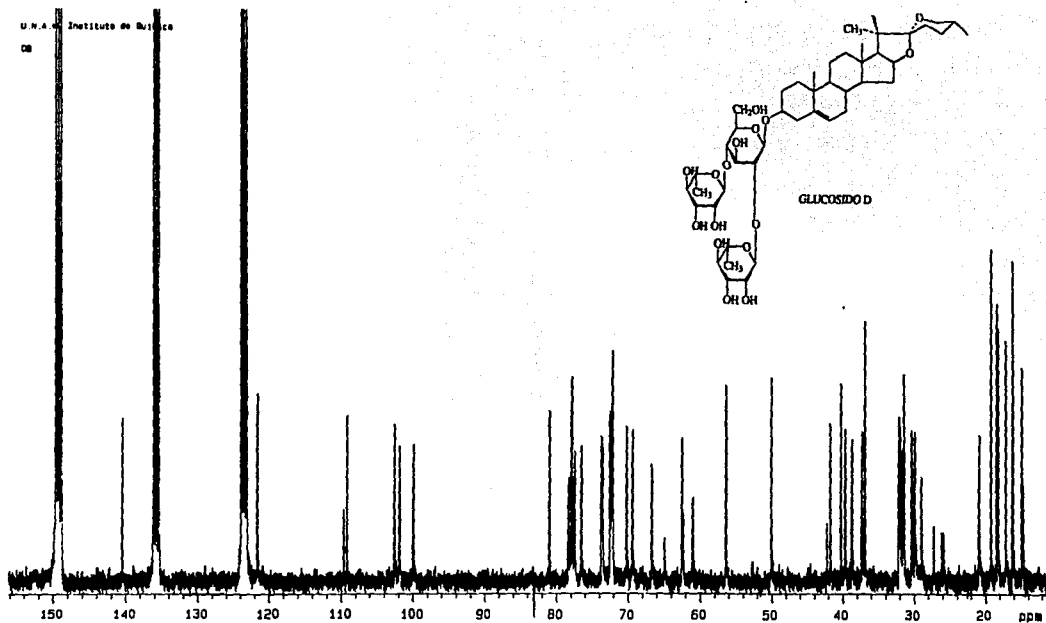
FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 4

R.M.N.13C

GLUCÓSIDO D

FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 5

R.M.N.¹³C GLUCÓSIDO D

VI. - BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Toshihiro Nohara, Kazumoto Miyahara, *Chem. Pharm Bull*, **1974**,22,1772.
- 2.- Toshio K, Tetsuya K, *Chem. Pharm. Bull*, **1974**,22,2164.
- 3.- Mahato S.B, Ganguly A. N. and Sahu N P, *Phytochemistry*, **1982**,21,959.
- 4.- Shu K, Masakazu H, *Chem Pharm Bull*, **1968**,16,1162.
- 5.- Jung Cook Helgi, "Contribución al Estudio de los glucósidos de *Dioscorea composita*". Tesis, UNAM,1975.
- 6.- Hernández Reyna, José G, "Contribución al Estudio de los glucósidos de *Dioscorea mexicana*". Tesis, UNAM. 1986.
- 7.- Matuda, E, *Anales del Instituto de Biología*, UNAM, **1953**, XXIV
- 8.- Marker, R.E, D.L. Turner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62,2542
- 9.- Siegiel, D, and Price, P.W. *Amer. Natur*, **1976**,110,101-105
- 10.- Segal, R and Schloesser, E. *Arch, microbio*, **1975**,104,147
- 11.- Capra, C, *Fitoterapia*, **1972**,43,99
- 12.- Got A, *Farmacología Medica, principios y conceptos*.
Ed. Interamericana, (1975).
- 13.- Kirk and Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Tomo V, Fourth edition, (1978).
- 14.- The Merck Index and encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals,
Merck & Co. Inc, Eleventh Edition, 1989, Pág
- 15.- Ballow, C. E. *Advances in Carbohydrate Chem*, **1954**,9,59.
- 16.- S. Koto, R Lemieux, *Tetrahedron*, **1974**,30,1933.
- 17.- P.K. Agrawal, D.C. Jain, *Phytochemistry*, **1985**,24,2479.
- 18.- Wesley A. Pearson. *Journal of Chem, Educ*, **1975**,52,814.
- 19.- Campos L, Jesús, "Glucósidos de *Dioscorea Composita*". Tesis, U.N.A.M
1977.

- 20.- Espejo O, J Campos, Giral Francisco, *Pytochemistry*,**1982**,21,413.
- 21.- Raman Puri and Tuck C Wong, *Magnetic Resonance in Chemistry*
1993,31,278
- 22.- Mohamed S.Kamel. Kazuhiro Ohtani, *Chem. Pharm. Bull*,**1991**,39
- 23.- Kotaro Idaka, Yasuaki Hirai, *Chem. Pharm Bull*,**1991**,39,1455
- 24.- Hiroko Shimomura, Yutaka Sashida, *Chem Pharm Bull*,**1988**,36,3226
- 25.- Shujiro Seo, Atsuko Uomorio, *J. Chem Soc Perks Trans I*,**1984**,869
- 26.- Hiroko Shimomura, Yutaka Sashida, *Phytochemistry*,**1989**,28,3163
- 27.- R.J.Weston, Gottlieb,B. *Aust. J. Chem*,**1977**,30,917
- 28.- *Chem Pharm Bull*,**1971**,22(6), 1407
- 29.- Rajesh K. Gupta, Dharam C. Jain, *Phytochemistry*,**1984**,23,2605
- 30.- .Anaya Lang, J.H.Reyna,O Espejo, and F.Giral. *Intern J. Pharmacognosy*
1991,29,161
- 31.- W. Willker and D.Leibfritz *Magnetic Resonance in Chemistry*,**1992**,30,645
- 32.- Daniel M, Tal. Ping H, *Journal of Liquid Chromatography*
1984,7(13),2591.