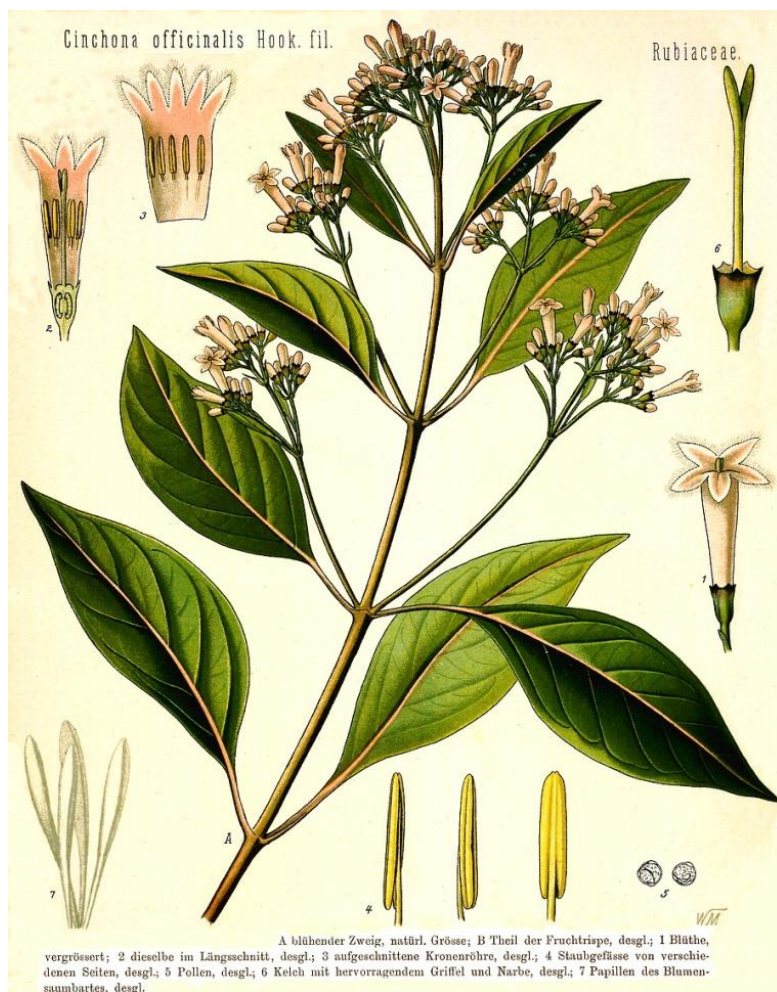


EXERCICIS DE FARMACOGNÒSIA

Professors Rosa M^a Giner Pons i Salvador Máñez Aliño



Imatge d'una branqueta de l'arbre de la quina

Cinchona officinalis: Köhler's Medizinal-Pflanzen 1 (1887)

<http://www.delta-intkey.com/angio/images/kohl793.jpg>

Prèambul

La present col·lecció de materials de suport a la docència de l'assignatura Farmacognòsia de 3r curs del Grau en Farmàcia està estructurada en la forma clàssica d'exercicis resolts. Per tant, s'inicia amb el plantejament d'un problema que, en termes generals, conté un esquema semblant d'exigències paral·leles a les competències que comprenen l'aprenentatge de la matèria. Essencialment, es demana saber identificar el grup fitoquímic i l'origen biosintètic dels productes naturals, dominar alguns aspectes de caire analític i instrumental (reaccions d'identificació o espectroscòpia), establir un procés seqüencial d'aïllament dels metabòlits secundaris, i definir els aspectes farmacològics que atorguen projecció terapèutica a la droga d'origen o d'altres directament relacionades.

Després d'allò que denominem en el text *Exercici*, oferim la *Resposta*, la qual conté elements de certesa, però també de proposta, sobretot en allò referit al procés d'extracció i separació dels diferents constituents químics que es presenten en el problema. L'estructura que en resulta respon a un tipus d'activitat àmplia, i a la vegada detallada, que durant els darrers anys s'ha formulat en les avaluacions de la part teòrica de l'assignatura, així com en l'activitat inclosa dins les tutories d'aula. Tanmateix, cal dir que manté certa connexió amb el tipus d'examen de la part pràctica. És per això que l'aportació d'aquests treball a l'aula virtual pot ser d'utilitat polivalent per a l'estudiant.

La tercera part és la que es designa com a *Apèndix*, el qual ofereix un suport científic, bé en forma *additiva* o d'aprofundiment (exercicis 1 al 25), bé en forma *diversiva* o de complement (exercicis 26-50). La forma i quantitat dels apèndixs són asimètriques, així com el desenvolupament de la Farmacognòsia al llarg del curs acadèmic és també asimètric; no sols sota un punt de vista temporal, ja que el primer quadrimestre té previstes 25 hores de classes teòriques i el segon en té 15, sinò també pel motiu de la diversitat de continguts. El primer quadrimestre conté la part general de l'assignatura –allò que eminentment interessa per resoldre una bona part dels exercicis–, a més de dedicar-se a l'estudi de drogues amb compostos fenòlics i terpenoides, mentre que el segon tracta exclusivament de l'extens camp de les drogues amb alcaloides. La concreció dels primers apèndixs i la divagació dels últims, en el millor dels sentits d'ambdós termes, podria harmonitzar-se al llarg del curs amb una creixent compressió global de la matèria.

Abreviatures i acrònims

CC: Cromatografia en columna

CCP: Cromatografia en capa prima

CCPAR: Cromatografia en capa prima d'alta resolució

CLAR: Cromatografia líquida d'alta resolució

CLMP: Cromatografia líquida de mitjana pressió

COSY: Espectroscòpia de RMN de correlació

CPC: Cromatografia de partició centrífuga

DEPT: Millora sense distorsió per transferència de polarització, tècnica de ^{13}C -RMN en què es desacoblen els senyals corresponents als grups metil (CH_3), metilè (CH_2) i metí (CH) (de l'anglès *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*, i que permet diferenciar entre els C, CH, CH_2 i CH_3)

EI-MS: Espectrometria de masses de ionització electrònica

HMBC: Correlació heteronuclear d'enllaços múltiples o llarga distància

HMQC: Correlació heteronuclear d'un enllaç (acoblament C-H directe)

HRESIMS: Espectrometria de masses d'alta resolució per ionització d'electrosprai

HRFABMS: Espectrometria de masses de bombardeig d'àtoms d'alta resolució

LC-ESI-MS: Cromatografia líquida amb detector per ionització d'electrosprai acoblada a espectrometria de masses

NOESY: Espectroscòpia de ressonància per l'efecte nuclear d'Overhauser

RMN: Ressonància magnètica nuclear

RP: Fase invertida (de l'anglès *reverse phase*)

UFLC-DAD-Q-TOF-MS/MS: Cromatografia líquida ultraràpida amb detector de fotodiode acoblada a espectrometria de masses

VLC: Cromatografia líquida per buit

Ara: Arabinosa

Cim: Cimarosa

Glc: Glucosa

Glr: Àcid glucurònic

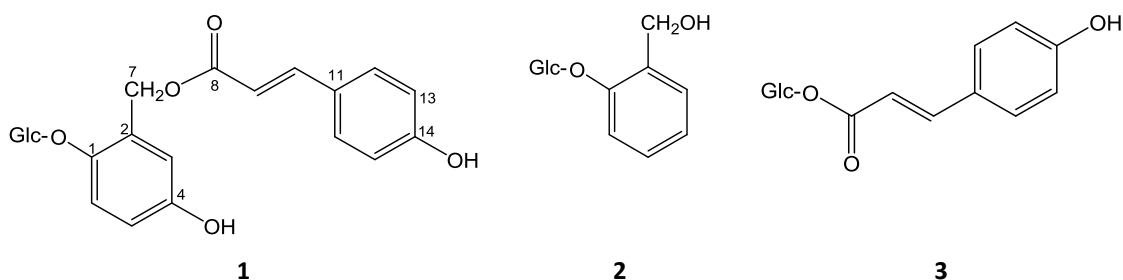
Ole: Oleandrosa

Rha: Ramnosa

Xil: Xilosa

Exercici 1.

A partir de l'espècie *Populus davidiana* Dode (Salicaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris populòsid A (**1**), salicòsid (**2**) i *p*-cumaroil- β -D-glucòsid (**3**).



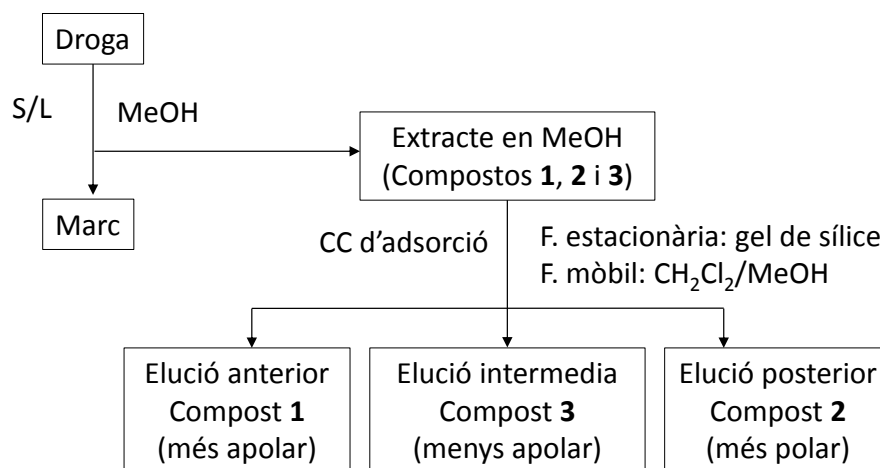
Indiqueu:

- El grup fitoquímic a què pertanyen els tres metabòlits i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament de les tres substàncies.
- Alguns senyals observables en l'espectre ¹H-RMN del compost **1**.
- Nom d'una droga coneguda que continga algun d'aquests compostos i la seua activitat farmacològica.

1. Resposta

a) Els tres metabòlits són compostos fenòlics glucosilats. El compost **1** és un èster d'un alcohol primari, concretament l'alcohol 4-hidroxi-salicílic, amb un àcid fenilpropanoide, un derivat de l'àcid cinàmic com és l'àcid *para*-cumàric. A més, l'hidroxil fenòlic al C-1 de l'alcohol es troba unit mitjançant un enllaç èter amb un sucre, la glucosa. El compost **2** és un glucòsid de l'alcohol salicílic, mentre que **3** és l'àcid *para*-cumàric esterificat amb la glucosa. Els tres compostos deriven biogenèticament de la via de l'àcid shikímic que comença amb la condensació de fosfoenolpiruvat i 4-fosfat d'eritrosa i acaba amb la biosíntesi de l'àcid corísmic, precursor d'aminoàcids aromàtics així com d'altres metabòlits com són els fenilpropanoides (compostos C6-C3) perquè tenen un anell aromàtic amb un radical propílic, el qual presentadiferent grau d'oxidació i pot perdre's donant els fenols simples o retallar-se donant els àcids fenòlics simples.

b) Els tres compostos són solubles en metanol, per la qual cosa la droga s'extrau amb aquest dissolvent i l'extracte obtingut es pot purificar per cromatografia en columna (CC) en gel de sílice eluint, amb mesclures de diclorometà-metanol, en primer lloc el compost **1**, més apolar, després el compost **3**, menys apolar, i finalment el compost **2**, el més polar.



c) L'espectre ^1H -RMN del compost **1** mostra tres senyals de protons aromàtics a δ 6,71 ppm (d, $J = 3,0$ Hz, H-3), 6,65 (dd, $J = 3,0$ i 8,4 Hz, H-5), i 7,0 (d, $J = 8,4$ Hz, H-6), i indica la presència d'un anell fenòlic 1,2,4-trisubstituit. A més, un parell de protons a 5,25 i 5,30 (1H cadascun, d, $J = 13,2$ Hz, H-7) són evidents deguts a un grup metilè oxigenat. També s'hi observa la presència d'un sistema AA'BB' a 6,80 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-13 i H-15) i 7,58 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-12 i H-16), així com dos protons *trans*-olefínics a 6,48 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-9) i 7,66 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-10) (Zhang *et al.*, 2006).

d) A partir de l'escorça de salze, obtinguda de diferents espècies del gènere *Salix* pertanyent a la mateixa família Salicaceae, com són *S. alba* L., *S. x fragilis* L., *S. purpurea* L., s'obté el salicòsid, glucòsid de l'alcohol salicílic, a més d'altres heteròsids fenòlics. El salicòsid és hidrolitzat a l'intestí gros i oxidat a àcid salicílic, principi responsable de les propietats analgèsiques, antipirètiques i antiinflamatòries de la droga.

Apèndix exercici 1

El gènere *Populus* comprén més de cent espècies distribuïdes en regions temperades i subtropicals. Entre elles, *P. davidiana*, distribuïda a Corea, nord-est de Xina i Sibèria, s'utilitza tradicionalment per al tractament de diferents malalties, incloent-hi diarrea, afeccions pulmonars, varicel·la i verola. Estudis fitoquímics d'aquesta planta van revelar l'existència d'heteròsids fenòlics, incloent-hi flavonoides. A partir de la fracció soluble en EtOAc de l'extracte metanòlic d'aquesta espècie, per successives CC en gel de sílice, fase invertida C18, i Sephadex[®]LH-20, es van aïllar deu compostos que es van identificar com heteròsids fenòlics per comparació de les constants fisicoquímiques i les dades espectroscòpiques amb les de la bibliografia. *Sephadex* és un nom comercial registrat que designa una fase estacionària polisacàrida subjecta a derivatització, per arribar a una poli-hidroxiopropilació en el cas de l'LH-20. D'aquests, tres d'ells són nous en la natura: els populòsids A, B i C, identificats com 2-cumaroïloximetil-4-hidroxifenil- β -D-glucopiranòsid, 2-cumaroïloximetilfenil- β -D-glucopiranòsid, i 2-feruloïloximetilfenil- β -D-glucopiranòsid, respectivament, a més de set compostos coneguts, populòsid o 2-cafeoilmetilfenil- β -D-glucopiranòsid, tremulacina, tremuldina, salicòsid, grandidentatina, salirepòsid, i coumaroïl- β -D-glucopiranòsid.

D'aquests, 2-cumaroïlmetil-4-hidroxifenil- β -D-glucopiranòsid, salicina i cumaroïl- β -D-glucopiranòsid han estat seleccionats per al present exercici i corresponen als compostos **1**, **2** i **3**, respectivament.

D'acord amb Zhang i col·laboradors (2006), l'escorça dessecada i trossejada de *P. davidiana* va ser extreta amb MeOH i l'extracte metanòlic concentrat es va suspendre amb H₂O i fraccionat successivament amb C₆H₁₄ i EtOAc. La fracció soluble en EtOAc va ser purificada per CC en gel de sílice eluint amb mesclures CHCl₃/Me₂CO de polaritat creixent (80:1→1:1) per donar vuit fraccions (E1-E8). La fracció E5 va ser fraccionada per CC en gel de sílice eluint amb CHCl₃/MeOH/H₂O (15:1:0,1→1:2:0,1) per donar set subfraccions (E5.1-E5.7). La subfracció E5.4 va ser purificada en gel de sílice amb MeOH/H₂O (1:9, 3:7, 1:1, i 1:0) per donar quatre subfraccions (E5.4.1-E5.4.4). La subfracció E5.4.1 va ser purificada per CC en gel de sílice amb MeOH/H₂O (8:1) i després en fase invertida C18 amb MeOH/H₂O (2:3) per donar el compost **2**. La fracció E5.4.3 va ser cromatografiada en gel de sílice eluint amb CHCl₃/MeOH (15:1), i les subfraccions obtingudes, cromatografiades sobre fase invertida C18 amb MeOH/H₂O (1:1,5) per donar els compostos **4** i **5**. La fracció E5.7 va ser cromatografiada sobre gel de sílice amb CHCl₃/MeOH/H₂O (6:1:0,1) per donar cinc subfraccions (E5.7.1-E5.7.5). Les subfraccions E5.7.1 i E5.7.3 van ser purificades per C18 amb MeOH/H₂O (1:1) per donar els compostos **1** i **3**, respectivament.

A continuació es detalla l'elucidació estructural dels compostos nous en la natura (populòsids A-C). La fórmula molecular del compost **1** C₂₂H₂₄O₁₀ va ser deduïda en base al pic a m/z 471 [M + Na]⁺ en espectrometria de masses de bombardeig d'àtoms d'alta resolució (HRFABMS). A més dels senyals de l'espectre ¹H-RMN abans descrits, el parell de protons a δ 5,25 i 5,30 ppm (H-7) va ser evident degut a un grup metilè oxigenat (δ C 61,2) en l'espectre de correlació heteronuclear d'un enllaç o C-H directe (HMQC), que el correlaciona amb el carboni aromàtic (δC 148,3) per l'espectre de correlació heteronuclear d'enllaç a llarga distància (HMBC). L'espectre ¹³C-RMN d'1 va revelar dos parells de senyals de carboni superposats a δ 130,9 (C-12, 16) i 116,2 (C-13, 15), a més de dos carbonis quaternaris a δ 125,6 (C-11) i 160,4 (C-14). Aquestes observacions van suggerir la presència d'un agrupament *p*-cumàric acilant que va ser confirmat pels acoblaments ¹H-¹H COSY entre H-9/H-10, H-12/H-16, i H-13/H-15 i per les correlacions a llarga distància ¹³C-¹H observades en l'espectre HMBC. La unió del agrupament *p*-cumàric amb l'alcohol gentsílic (2-hidroximetilbenzé-1,4-diol) va ser determinat en base a les correlacions HMBC entre els protons de l'hidroximetil (δ 5,25 i 5,30) i el carbonil (δ 167,1).

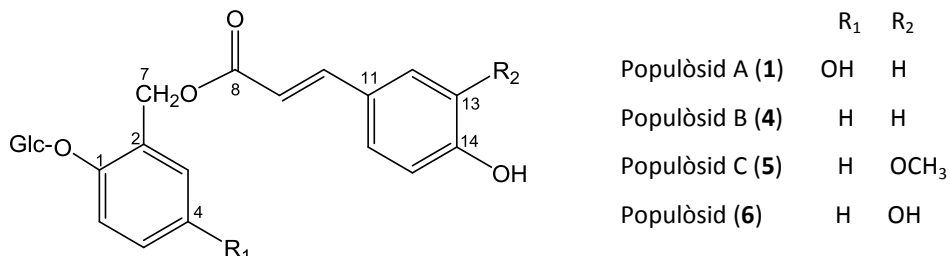
La hidròlisi enzimàtica d'**1** va donar alcohol gentsílic, àcid cumàric, i β-D-glucosa. La configuració de la unió glicosídica pel glucopiranòsid va ser determinada com a β en base al valor *J* del protó anomèric a 7,2 Hz (δ 4,86). Així, l'estructura del compost **1**, anomenada populòsid A, va ser assignada com a 2-cumaroïloximetil-4-hidroxifenil-β-D-glucopiranòsid.

Els espectres d'¹H i ¹³C-RMN del compost **4** van revelar un sucre deduït com una unitat de β-D-glucopiranososa, un agrupament benzoïl i un altre cumaroïl, així és que es va suggerir un esquelet semblant a **1**. Però en l'¹H-RMN es van observar quatre senyals de protons a δ 7,16 ppm (d, *J*= 8,4 Hz, H-6), 7,29 (td, *J*= 7,8 i 1,2 Hz, H-5), 7,03 (t, *J*= 7,2 Hz, H-4), i 7,33 (d ample, *J*= 7,8 Hz, H-3) (Taula 1). Aquests són indicatius de la presència d'un anell *orto*-disubstituint en **4**, enlloc de l'anell fenòlic 1,2,4-trisubstituint d'**1**, confirmat per les correlacions de l'espectre ¹H-¹H COSY. Aquesta observació és consistent amb la fórmula molecular C₂₂H₂₄O₉, establerta pel pic a m/z 455 [M + Na]⁺ del HRFABMS. Addicionalment, la hidròlisi enzimàtica de **4** donà alcohol salicílic, àcid cumàric, i D-glucosa. Així, el compost **4** va ser caracteritzat com a 2-cumaroïloximetilfenil-β-D-glucopiranòsid, anomenat populòsid B.

El compost **5**, anomenat populòsid C, va presentar espectres d'¹H i ¹³C-RMN molt semblants als de **4**, amb l'excepció de la presència d'un grup metoxi (δH 3,81, δC 56,2). L'espectre

HMBC va demostrar que el metoxi es troba en l'agrupament feruloil, la qual cosa indica un grup ferúlic acilant en **5** enloc del grup cumaroil de **4**. Aquesta evidència va permetre assignar **5** a 2-feruloiloximetilfenil- β -D-glucopiranosid. La fórmula molecular $C_{23}H_{26}O_{10}$ va ser determinada pel pic molecular m/z 485 $[M + Na]^+$ en HRFABMS.

A continuació es presenta l'estructura química dels populòsids:



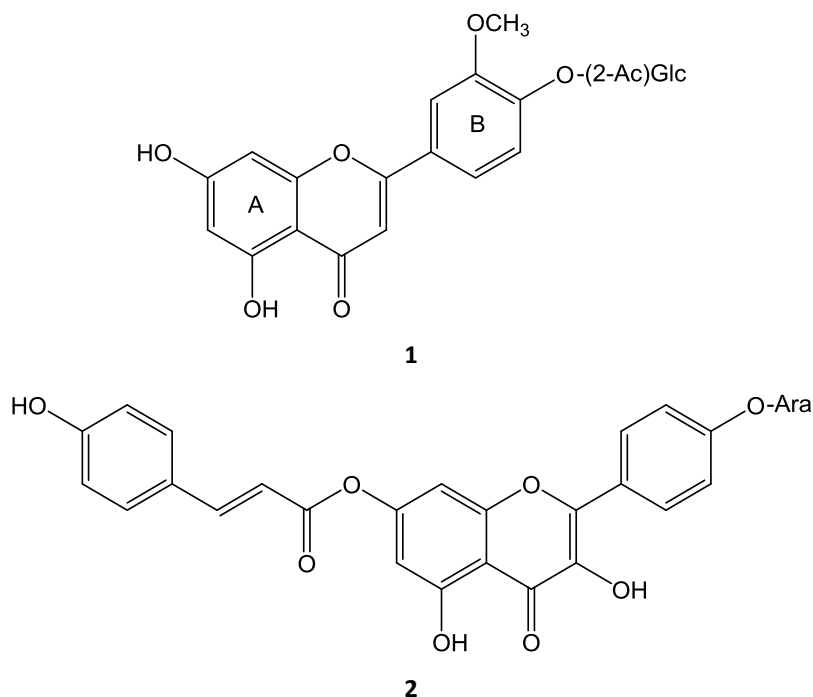
Taula 1. Dades espectroscòpiques d'¹H-RMN (δ , ppm) dels compostos **1**, **4**, **5** i **6**.

Protó	1 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^b
3	6,71 d (3,0)c	7,33 d ample (7,8)	7,35 d ample (7,8)	7,34 d ample (7,6)
4		7,03 t (7,2)	7,03 t (7,8)	7,04 t (7,6)
5	6,65 dd (3,0, 8,4)	7,29 td (7,8, 1,2)	7,31 td (7,8, 1,2)	7,28 td (7,6, 1,5)
6	7,0 d (8,4)	7,16 d (8,4)	7,17 d (7,8)	7,23 d (7,6)
7	5,19 d (13,2)	5,25 d (13,2)	5,26 d (13,2)	5,29 d (13,2)
	5,22 d (13,2)	5,30 d (13,2)	5,31 d (13,2)	5,41 d (13,2)
9	6,45 d (15,6)	6,48 d (16,2)	6,56 d (15,6)	6,32 d (16,0)
10	7,60 d (15,6)	7,66 d (16,2)	7,62 d (15,6)	7,59 d (16,0)
12	7,56 d (8,4)	7,58 d (8,4)	7,35 d ample (7,8)	7,36 d (2,0)
13	6,80 d (8,4)	6,80 d (8,4)		
15	6,80 d (8,4)	6,80 d (8,4)	6,80 d (7,8)	6,77 d (8,0)
16	7,58 d (8,4)	7,58 d (8,4)	7,13 dd (1,2, 8,4)	6,95 dd (2,0, 8,0)
1	4,63 d (7,2)	4,86 d (7,2)	4,87 d (7,2)	4,93 d (7,2)
2'-5'	3,17-3,33 m	3,17-3,33 m	3,18-3,34 m	3,30-3,52 m
6'	3,71 dd (3,6, 12,0)	3,71 dd (3,6, 12,0)	3,71 dd (3,6, 12,0)	3,87 dd (1,6, 12,0)
	3,49 m	3,49 m	3,49 m	3,68 m
OCH ₃			3,81 s	

^aEspectre a 600 MHz en $(CD_3)_2SO$. ^bEspectre a 400 MHz en CD_3OD . Els valors entre parèntesis corresponen a J (en Hz).

Exercici 2

Els compostos abutilina A (**1**) i abutilina B (**2**) s'han aïllat a partir de l'espècie *Abutilon pakistanicum* Jafri & Ali (Malvaceae), per primera vegada en la natura.



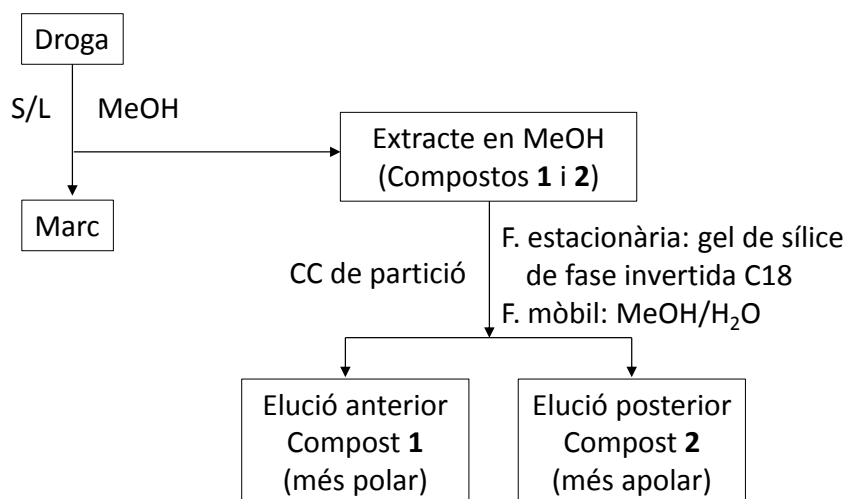
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels dos principis.
- Reacció de caracterització d'un dels compostos.
- Alguns senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN de la molècula **1**.

2. Resposta

a) Els dos compostos són fenòlics glicosilats, més concretament són dos *O*-heteròsids flavonoides (presenten un esquelet bàsic 2-fenilcromà o 2-fenil-benzo- γ -pirona amb diferent grau d'oxidació). El compost **1** és un 4'-*O*-heteròsid de flavona, ja que presenta una insaturació al C-2, mentre que **2** és un 4'-*O*-heteròsid de flavonol (flavona hidroxilada al C-3) amb l'hidroxil en posició 7 esterificat amb l'àcid *para*-cumàric. Biogenèticament, els dos compostos són metabòlits mixtos (compostos C₆-C₃(C₂)_n, en què *n* és 3) derivats de la combinació de la via de l'àcid shikímic i de l'acetat. L'anell A, amb dos hidroxils fenòlics al C-5 i C-7, deriva de la ciclització inicial de tres restes d'acetat, mentre que l'anell B prové de l'àcid cinàmic, via àcid shikímic.

b) Els dos compostos són solubles en metanol, per la qual cosa la droga s'extrau en metanol i l'extracte obtingut es purifica per CC de partició en fase invertida C18 amb mesclures metanol-aigua, eluint primer el compost **1**, més polar, i seguidament el compost **2**, més apolar.



c) Els compostos **1** i **2** poden donar coloració diversa amb clorur fèrric per la presència de l'agrupament fenòlic, i positives a la reacció de Molish (α -naftol + àcid sulfúric, detecció de sucres) i a la reacció de Shinoda o cianidina (magnesi metàl·lic + àcid clorhídric, detecció de flavonoides).

d) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **1** mostra senyals de dos protons aromàtics acoblats en *meta* a δ 6,74 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz) i 6,81 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) corresponents a l'anell A oxigenat al C-5 i C-7. A més, l'espectre presenta tres protons aromàtics de l'anell B que formen un sistema ABX a 7,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,71 (1H, dd, $J = 8,8$ i 2,1 Hz) i 7,55 (1H, d, $J = 2,1$ Hz). El senyal de l'H-3 ressona a 6,96 (s, 1H), i un grup metoxil s'observa a 3,75 (s, 3H). La presència d'una hexosa acetilada amb configuració β és evident pel senyal d'un protó anomèric a 5,74 (1H, d, $J = 7,6$ Hz) i un singlet de metil a 1,95 (3 H) degut a l'agrupament acetil (Ali *et al.*, 2010).

Apèndix exercici 2

El gènere *Abutilon*, pertanyent a la família Malvaceae, comprén cent cinquanta espècies distribuïdes en regions subtropicals d'Àsia i altres parts del món, en forma de plantes i arbusts perennes i, rarament, petits arbres. Entre aquestes espècies, hi destaca *A. pakistanicum*, perquè les seues fulles, arrels i tiges contenen quantitats considerables de mucíl·lacs, els quals s'utilitzen per al tractament del reumatisme i com a demulcent i diürètic.

Ali i col·laboradors (2010) van descriure l'extracció i aïllament de dos flavonoides, 5,7,4'-trihidroxí-3'-metoxiflavona-4'- O - β -D-(2''- O -acetil)-glucopiranòsid, designat com a abutilina A (**1**) i 7- O -(E)- p -cumaroil kaempferol 4'- O - α -L-arabinopiranòsid (**2**), anomenat abutilina B, els quals han sigut descrits per primera vegada en la natura. L'elucidació estructural s'ha realitzat partint de tècniques espectroscòpiques. A més, s'han aïllat per primera vegada en aquesta espècie àcid ferúlic (**3**), àcid (E)-cinàmic (**4**), 5-hidroxi-4'-,6,7,8-tetrametoxiflavona (**5**), kaempferol (**6**), luteolina (**7**) i luteolina 7- O - β -D-glucopiranòsid (**8**) (Figura 1).

D'aquests, els compostos **1** i **2** han sigut seleccionats per a l'exercici.

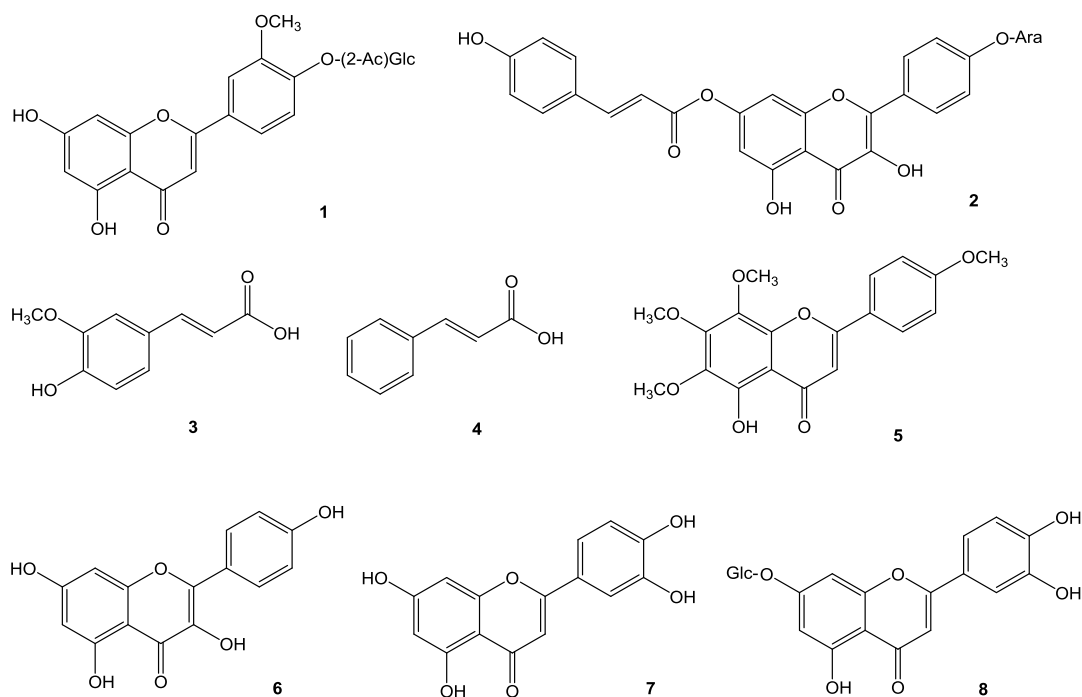


Figura 1. Estructures químiques dels compostos **1-8**.

L'extracció i aïllament dels compostos ha sigut de la manera següent: la planta sencera fresca recol·lectada a Karachi (Pakistan), va ser extreta amb MeOH i l'extracte obtingut va ser fraccionat líquid-líquid (L/L) amb dissolvents de polaritat creixent com C₆H₁₄, CHCl₃, EtOAc i *n*-BuOH. La fracció soluble en CHCl₃ va ser purificada per CC de gel de sílice eluint amb mesclures de C₆H₁₄/CHCl₃, CHCl₃ pur, i CHCl₃/MeOH, la qual cosa va permetre l'aïllament de tots els compostos.

En detall, a partir de la fracció eluïda amb C₆H₁₄/CHCl₃ (3,5:6,5) s'hi van aïllar els compostos **3** i **4**. La fracció eluïda amb C₆H₁₄/CHCl₃ (1,0:9,0) va ser recromatografiada per CC en gel de sílice eluint, amb C₆H₁₄/CHCl₃ (1,5:8,5), el compost **5**. La fracció eluïda amb CHCl₃/MeOH (9,0:1,0) es va recromatografiar sobre gel de sílice i de la subfracció eluïda amb CHCl₃/MeOH (9,5:0,5) es van aïllar els compostos **6** i **7**; de la subfracció eluïda amb CHCl₃/MeOH (9,3:0,7) els compostos **1** i **8**; i de la subfracció eluïda amb CHCl₃/MeOH (8,0:2,0) el compost **2**.

Les estructures dels compostos van ser establertes per espectroscòpia UV, masses i RMN. A continuació s'explica l'elucidació estructural de les noves molècules.

En l'espectre d'¹H-RMN d'**1** es van observar, a més dels senyals descrits anteriorment, els protons d'oximetins i oximetilens del sucre a δ 4,77 ppm (1H, m, H-2''), 4,25 (1H, m, H-3''), 4,14 (1H, m, H-4''), 4,28 (1H, m, H-5''), 4,96 (1H, dd, *J* = 11,2 i 2,6 H-6''a) i 4,39 (1H, dd, *J* = 11,2 i 2,8, H-6''b) (Taula 1). La fórmula molecular C₂₄H₂₄O₁₂ va ser deduïda de l'espectre de masses que va mostrar un pic M⁺ a *m/z* 504. Un fragment a *m/z* 300 va resultar de la pèrdua d'una hexosa acetilada i els fragments retro Diels–Alder a *m/z* 152 i *m/z* 148 van confirmar la presència dels grups metoxil i hidroxil a l'anell B, i dos hidroxils a l'anell A, respectivament.

En l'espectre d'¹H-RMN de **2** es van observar dos doblets acoblats en *meta* (*J* = 2,0 Hz), cadascun integrat per un protó a δ 6,67 i 6,65 ppm, diagnòstic d'un anell A amb els C-5 i C-7 oxigenats. La presència de quatre protons aromàtics d'un anell B *para*-substituït va mostrar un sistema AA'XX' a 8,42 (d, *J* = 8,7 Hz) i 7,21 (d, *J* = 8,7 Hz), respectivament. La presència de l'agrupament (E)-*p*-cumaroïl podria ser deduïda dels protons *trans*-olefínics a 7,82 i 6,48 (d, *J*

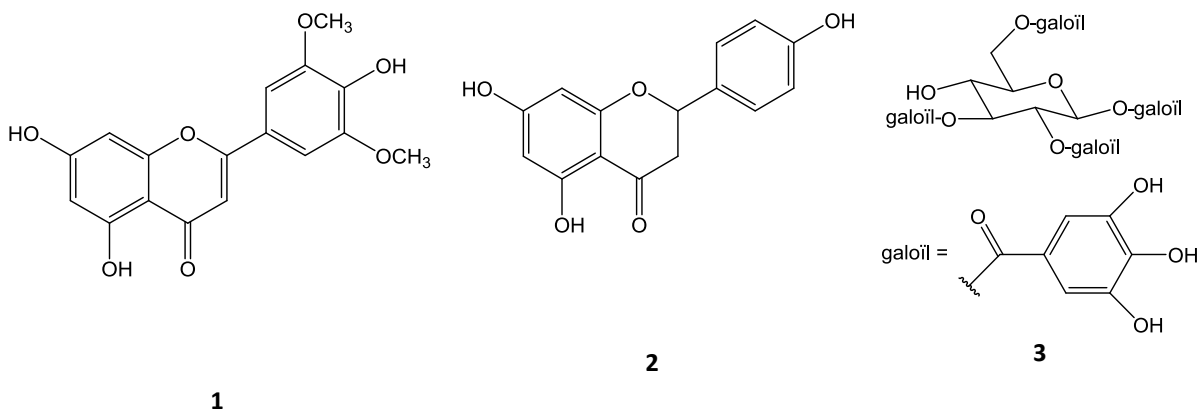
= 15,8 Hz) així com dels protons d'un altre sistema AA'XX' a 7,48 (d, $J = 8,6$ Hz) i 7,13 (d, $J = 8,6$ Hz), respectivament. La presència d'una pentosa va ser revelada pel senyal del protó anomèric a 6,21 i els senyals dels protons d'oximetins i oximetilens a 4,21 (m, H-2''), 4,18 (m, H-3''), 4,82 (m, H-4''), 4,95 (dd, $J = 9,8$ i $2,0$, H-5''a) i 4,38 (dd, $J = 9,8$ i $4,1$, H-5''b) (Taula 1). Aquesta estructura també va ser confirmada per ^{13}C -RMN i espectrometria de masses de ionització electrònica (EI-MS), que va mostrar fragments a m/z 432 [M^+ -*p*-cumaroïl] i 286 [M^+ -*p*-cumaroïl-L-arabinosa]. A més, la presència del fragments retro Diels–Alder a m/z 152 i m/z 134 van confirmar un agrupament hidroxil i (E)-*p*-cumaroïl en l'anell A.

Taula 1. Assignacions dels protons dels compostos **1** i **2** en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Compost 1		Compost 2	
Posició	^1H -RMN	Posició	^1H -RMN
2	–	2	–
3	6,96 (1H, s)	3	–
4	–	4	–
5	–	5	–
6	6,74 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	6	6,67 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	–	7	–
8	6,81 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	8	6,65 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	–	9	–
10	–	10	–
5-OH	13,6	1'	–
1'	–	2', 6'	8,42 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
2'	7,55 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	3', 5'	7,21 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
3'	–	4'	–
4'	–	3-OH	12,34
5'	7,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz)	5-OH	13,18
6'	7,71 (1H, dd, $J = 8,8$ i $2,1$ Hz)	1''	6,21 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)
1''	5,7,4 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	2''	4,21 (m)
2''	4,77 (m)	3''	4,18 (m)
3''	4,25 (m)	4''	4,82 (m)
4''	4,14 (m)	5''a	4,95 (1H, dd, $J = 9,8$ i $2,0$ Hz)
5''	4,28 (m)	5''b	4,38 (1H, dd, $J = 9,8$ i $4,1$ Hz)
6''a	4,96 (1H, dd, $J = 11,2$ i $2,6$ Hz)	1'''	–
6''b	4,39 (1H, dd, $J = 11,2$ i $2,8$ Hz)	2'''	6,48 (1H, d, $J = 15,8$ Hz)
2''-	1,95 (3H, s)	3'''	7,82 (1H, d, $J = 15,8$ Hz)
O COCH_3	3,75 (3H, s)	4'''	7,48 (2H, d, $J = 8,6$ Hz)
3'-O CH_3	–	5''', 9'''	7,13 (2H, d, $J = 8,6$ Hz)

Exercici 3

A partir de l'espècie botànica *Ceratonia siliqua* L. (Leguminosae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:



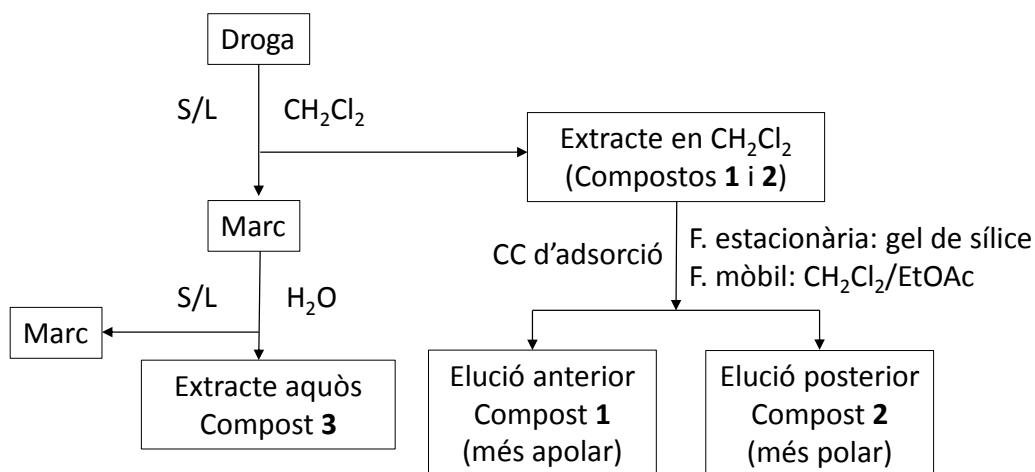
Indiqueu:

- Grup fitoquímic i precursors biogenètics a què pertany cada compost.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament de les tres substàncies.
- Una reacció de caracterització per als compostos **1** i **3**.
- Nom d'altra droga coneguda que continga compostos amb un esquelet químic semblant a **3** i la seua activitat farmacològica.

3. Resposta

a) Els tres compostos són fenòlics, **1** i **2** són flavonoides mentre que **3** és un taní. El compost **1** és una 5,7,4'-trihidroxí-3',5'-dimetoxi-flavona. El compost **2** és una flavanona, perquè no té la insaturació al C-2; més concretament, és una 5,7,4'-trihidroxí-flavanona. Els dos flavonoides són metabòlits mixtos derivats biogenèticament de la via de l'àcid shikímic i de tres restes d'acetat. En la biogènesi, primerament, s'origina l'esquelet calcona (sense l'anell pirona), que es converteix espontàniament en flavanona (amb l'anell piran-4-ona hidrogenat). El compost **3** és un taní gàl·lic hidrolitzable, és a dir un oligoèster d'un sucre central, glucosa, amb quatre hidroxils de la qual es troben esterificats amb molècules d'àcid gàl·lic; és 1,2,3,6-tetra-O-gal·loil- β -D-glucosa. El taní gàl·lic deriva biogenèticament de la via de l'àcid shikímic, l'àcid gàl·lic prové de la deshidrogenació de l'àcid 3-deshidroshikímic, encara que també pot produir-se per l'oxidació de l'àcid protocatèquic, derivat de l'àcid cafeic.

b) Els dos flavonoides són solubles en diclorometà o en acetat d'etil, mentre que el taní és hidrosoluble. La droga es pot extraure amb diclorometà i purificar l'extracte diclorometànic per CC en gel de sílice eluint amb mesclures diclorometà/acetat d'etil (9:1) per a separar els compostos **1** i **2**. Primerament eluirà **1**, més apolar i, a continuació **2**, més polar. El marc s'extrau amb aigua, en què es solubilitzarà el compost **3**.



c) La reacció de la cianidina permet caracteritzar els flavonoides per la coloració roja obtinguda addicionant magnesi metàl·lic a una solució d'àcid clorhídric. El taní gàl·lic es caracteritza per la coloració rosa produïda pel tractament amb iodur potàssic.

d) Una droga que conté tanins hidrolitzables són les gales del roure (*Quercus infectoria* G. Olivier, Fagaceae). Els tanins exerceixen en el vegetal un paper de protecció davant predadors com insectes. Concretament, les gales són teixits que creixen a causa de les secrecions produïdes per larves d'himenòpters de diferents gèneres (*Aphis*, *Cynips*, ...) quan ixen dels ous dipositats a les branques joves del roure. Les gales contenen àcid tànic, un taní oficial que és una mescla de tanins hidrolitzables a més dels àcids gàl·lic i el·làgic lliures.

Els tanins tenen propietats astringents, antidiarriques, hemostàtiques, antiinflamatòries i antisèptiques. S'utilitzen, per aplicació tòpica, per al tractament d'afeccions de la pell, ferides, cremades i hemorroides, i via oral, per insuficiència venosa i fragilitat capil·lar.

Apèndix exercici 3

La garrofera (*Ceratonia siliqua*, Leguminosae) és un arbre originari de la conca Mediterrània àmpliament distribuït en aquesta regió, els fruits del qual són coneguts com garrofes, contenen un 40-60% de sucres de baix pes molecular, principalment sacarosa, a més d'elevades quantitats de fibra dietètica i polifenols.

S'ha descrit que els principals polifenols de les beines de la garrofera insolubles en aigua són tanins condensats altament polimeritzats, constituïts per unitats de flavan-3-ol i flavan-3,4-diol. Els polifenols hidrosolubles inclouen àcid gàl·lic, epigal·locatequina, catequina, gal·lat d'epicatequina i gal·lat d'epigal·locatequina com a principals components. L'extracció de les beines amb MeOH/H₂O al 0,5% d'AcOH (9:1) solubilitza, a més, àcid el·làgic i heteròsids de quercetina.

A partir de les beines de garrofera s'obté la fibra dietètica per extracció aquosa i posterior eliminació de la fracció soluble, amb un alt contingut en lignina i polifenols i d'un alt valor nutricional. La fibra afavoreix la digestió, redueix els valors de colesterol i glucosa en sang, és potencial quimiopreventiva de certs càncers, en particular del tracte gastrointestinal, i té propietats antioxidants, antiproliferatives i antiestrogèniques.

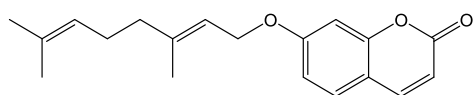
D'acord amb Owen i col·laboradors (2003), la fibra de les garrofes es va obtenir amb un extractor tipus Soxhlet, primer amb C₆H₁₄ per eliminar-ne els lípids i després amb MeOH.

L'extracte metanòlic es va fraccionar per CC en gel de sílice eluint amb mesclures $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Les fraccions obtingudes van ser analitzades per cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR) i purificades per CLAR semipreparativa. La majoria dels compostos fenòlics van ser identificats per comparació dels temps de retenció i espectres UV amb patrons i per espectrometria de masses.

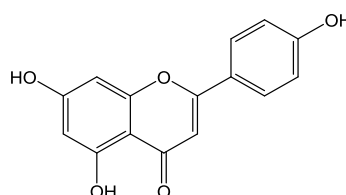
En aquest estudi, el rendiment total de polifenols identificats en la fibra de garrofes va ser 3,9 g/kg referit a pes sec. En el perfil cromatogràfic fenòlic dominà l'àcid gàl·lic en diferents formes, àcid gàl·lic lliure (42% del total de compostos fenòlics), gal·lat de metil (1%), i gal·lotanins (29%). Els fenols simples van representar un 2% del total, contribuint-hi principalment l'àcid cinàmic (1,3%). Els flavonoides (lliures i glicosilats) van representar un 26% del total de compostos fenòlics, amb un predomini de miricetin-3-O- α -L-ramnòsid (9%) i quercetin-3-O- α -L-ramnòsid (10%).

Exercici 4

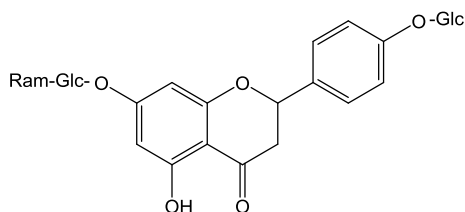
A partir de l'espècie botànica *Citrus grandis*(L.) Osbeck (Rutaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:



1



2



3

Indiqueu:

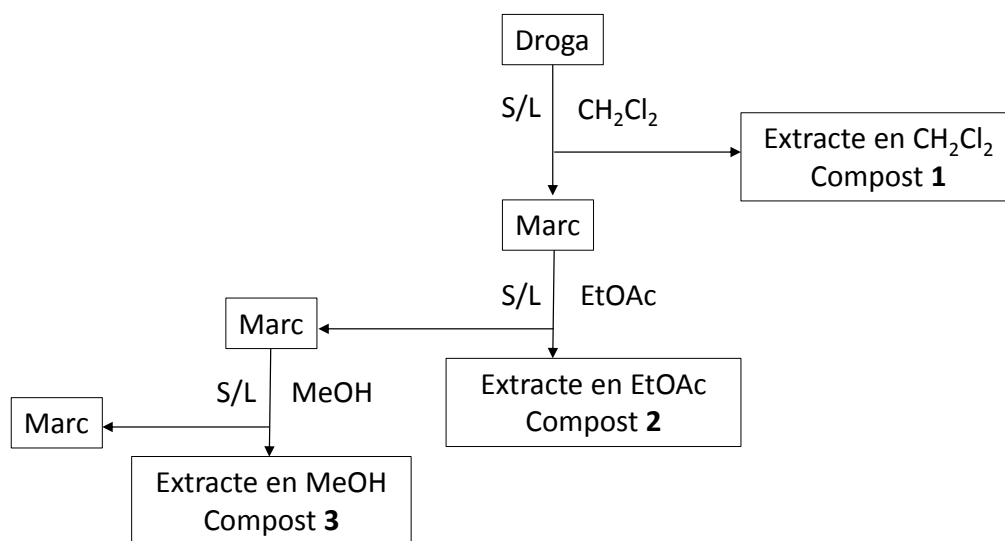
- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i els precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels tres principis.
- Una reacció de caracterització per al compost **3**.
- Nom d'altra droga coneguda que continga algun dels compostos **2** i **3**, i la seua activitat farmacològica.

4. Resposta

a) Els tres compostos són fenòlics. El compost **1** és una cumarina, ja que presenta un esquelet bàsic benzo- α -pirona amb l'hidroxil fenòlic en posició 7 substituït amb un monoterpè lineal (deu carbonis). Els compostos **2** i **3** són flavonoides (2-fenil-benzo- γ -pirona), el primer és una 5,7,4'-trihidroxi-flavona (insaturació al C-2), mentre que el segon és un O-heteròsid de flavanona (dihidrogenació als C-2 i C-3) amb dos unions èter, una a l'hidroxil 7 (amb un disacàrid de glucosa i ramnosa) i l'altra a l'hidroxil 4' (amb la glucosa).

Biogenèticament, les cumarines deriven de l'àcid *orto*-cumàric, en el qual el doble enllaç de la cadena lateral canvia de *trans* a *cis*; l'anell aromàtic s'oxida en *orto*, i l'àcid 2,4-dihidroxicis-cinàmic resultant sofreix una deshidratació entre l'àcid carboxílic i l'hidroxil. El monoterpè deriva de la condensació de pirofosfat d'isopentenil o 4-hidroxi-2-metil-1-butè i de pirofosfat de dimetilal·lil, provinents de la via de l'àcid mevalònic. Els flavonoides són metabòlits mixtos derivats de la via de l'àcid shikímic i d'acetat.

b) Les genines són solubles en dissolvents orgànics de polaritat mitjana mentre que l'heteròsid, més polar, és soluble en alcohols, mesclades hidroalcohòliques i aigua. Els compostos **1** i **2** són genines, però la cadena monoterpènica en **1** li confereix lipofília i serà soluble en diclorometà. El compost **2**, amb tres hidroxils lliures, s'arrossegarà amb acetat d'etil. L'heteròsid s'extraurà amb metanol.



c) A més de la reacció de la cianidina descrita en l'exercici anterior, els flavonoides es poden caracteritzar mitjançant l'anàlisi per cromatografia en capa prima (CCP) en què s'observen les taques a la llum visible i UV, i després del tractament amb clorur d'alumini o amb el reactiu de Neu (l'èster aminoetilic de l'àcid difenilbòric). A més, la presència dels sucres en el compost **3** es pot caracteritzar amb la reacció de Molisch (α -naftol i àcid sulfúric) per la coloració morada deguda a la formació de l'hidroxi-metilfurfural (2-formil-furà), deguda a la forta deshidratació del sucre per l'àcid, en presència del compost aromàtic α -naftol.

d) Els citroflavonoides es troben en els pericarpis i les polpes d'espècies del gènere *Citrus*. Un altre flavonoide, rutòsid, s'extrau dels botons florals de sòfora (*Sophora japonica* L., Leguminosae) i de les fulles del fajol (*Fagopyrum esculentum* Moench, Polygonaceae) o de l'eucaliptus (*Eucalyptus macrorrhyncha* F. Muell. ex Benth., Myrtaceae). S'han descrit nombroses propietats farmacològiques dels flavonoides. Són vasoprotectors, ja que disminueixen la permeabilitat dels capil·lars i n'augmenten la resistència, captadors de radicals lliures, antiinflamatoris, hepatoprotectors, antiespasmòdics, hipocolesterolemiant, diürètics, etc.

Apèndix exercici 4

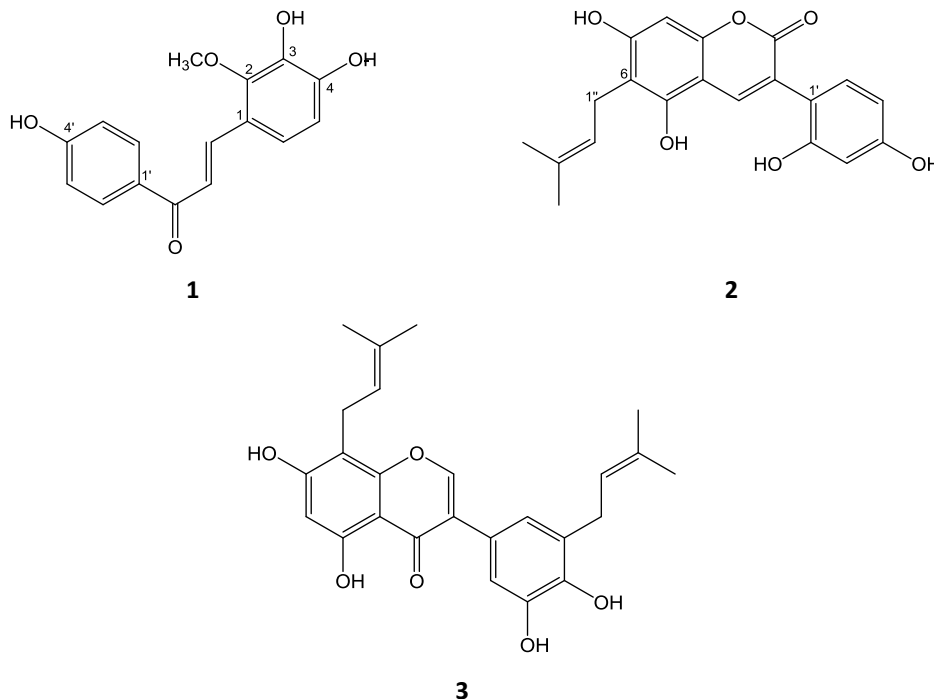
El fruit de *Citrus grandis* és ben conegut pels seus beneficis nutricionals i efectes farmacològics. L'epicarpí d'aquesta espècie botànica constitueix la medicina tradicional xinesa "Huajuhong" en la farmacopea xinesa oficial. Encara que és extremadament amarg, ha sigut utilitzat des de fa segles com antitussigen i expectorant, i recentment s'ha demostrat experimentalment la seua activitat antiinflamatòria, antioxidant, antimicrobiana i protectora davant la formació de plaques d'ateroma.

Li i col·laboradors (2014) van determinar les diferències fitoquímiques quantitatives entre l'epicarpí i el fruit sencer de *C. grandis*, ja que aquest últim és el que s'utilitza bàsicament en la medicina tradicional, probablement perquè l'epicarpí és molt prim i té un sabor amarg.

L'anàlisi sistemàtica dels constituents de *C. grandis* es es va realitzar mitjançant cromatografia líquida ultraràpida amb detector de fotodiode acoblada a espectrometria de masses (UFLC-DAD-Q-TOF-MS/MS). Quaranta-vuit components, majoritàriament flavonoides i cumarines, hi van ser identificats per comparació amb estàndards i en base als temps de retenció, espectre UV, mesures de masses per als ions moleculars i fragments característics. Sols el contingut en els tres flavonoides majoritaris, naringina, roïfolina i neoeriocitrina va fou significativament superior en el fruit sencer que en el pericarpí, mentre que no es van observar diferències significatives en la resta de constituents. Aquest mètode analític va ser d'utilitat per a l'estandardització del material en cru i dels seus derivats, ja que ha permès determinar-hi diferències químiques que poden dur a possibles diferències en les activitats biològiques.

Exercici 5

A partir de l'espècie *Glycyrrhiza inflata* Batalin (Leguminosae) s'han aïllat, entre d'altres, els següents principis antioxidants i antiinflamatoris **1**, **2** i **3**.



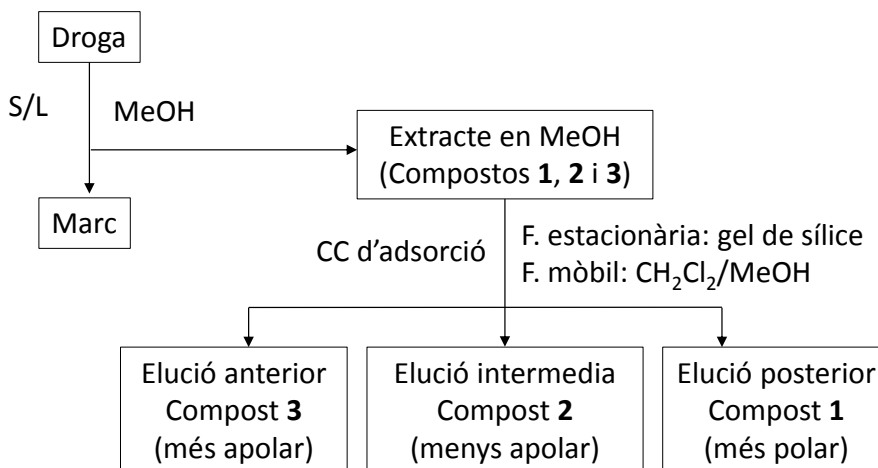
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament de les tres substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **1**.

5. Resposta

a) Els tres compostos són fenòlics. El compost **1** és una 2-metoxi-3,4,4'-trihidroxi-calcona. Aquest esquelet és el primer que es forma en la biosíntesi dels flavonoides i que resulta de la condensació de tres restes d'acetat (via de l'acetat) i l'àcid cinàmic (via de l'àcid shikímic). El compost **2** és una 5,7-dihidroxi-cumarina prenilada en posició 6 i substituïda en posició 3 amb un 2',4'-dihidroxi-benzè. La cumarina és un metabòlit que prové de la via de l'àcid shikímic. El compost **3** presenta un esquelet 3-fenil-benzo- γ -pirona (isoflavona) 5,7,3',4'-tetrahidroxilada i isoprenilada en posició 8 i 5'. L'esquelet isoflavonoide s'origina per desplaçament de l'anell aromàtic del C-2 al C-3 del piran, i és un metabòlit mixt que prové de la via de l'àcid shikímic i d'acetat.

b) Els tres compostos són solubles en metanol i una vegada extrets es poden purificar per CC en gel de sílice eluint, amb mesclures diclorometà-metanol, en primer lloc el compost **3**, més apolar, després el compost **2**, menys apolar, i finalment el compost **1**, el més polar.



c) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **1** mostra senyals de protons aromàtics corresponents a H-5 i H-6 que apareixen com doblets acoblats en *orto* a δ 6,62 ppm (1H, d, $J = 8,5$ Hz) i 7,30 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), dos doblets acoblats en *orto* que integren per dos protons equivalents cadascun, a 6,87 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-3' i H-5'), i a 8,00 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-2' i H-6'). A més, s'hi observen dos doblets corresponents als protons del doble enllaç exocíclic a 7,60 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H α) i 7,83 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H β), i un singlet del metoxil a 3,80 ppm (3H, s, OCH₃) (Kajiyama *et al.*, 1992).

Apèndix exercici 5

La regalíssia comprèn les arrels i rizomes de diverses espècies del gènere *Glycyrrhiza* (Leguminosae), com són *G. uralensis* Fisch., *G. inflata* Bat. i *G. glabra* L. Es tracta d'una planta altament nutricional i terapèutica utilitzada per tot el món com a aliment i medicament. Degut al seu sabor dolç, la regalíssia és un important edulcorant i saboritzant, tant en productes alimentaris, com en llepolies, xicles, dentífrics i begudes. A més, és una de les medicines tradicionals més antigues i més freqüentment utilitzades, tant als països orientals com occidentals. En la farmacopea xinesa es prescriu per al tractament de l'asma, la febre i la tos.

A partir d'espècies de *Glycyrrhiza* s'han aïllat més de quatre-cents compostos, entre els quals els saponòsids triterpènics i els flavonoides són els constituents majoritaris. Prèviament, les investigacions se centraven en la glicirrizina i els seus derivats com els responsables dels seus efectes hepatoprotectors i antiulcerosos, mentre que més recentment l'interès recau en els flavonoides per les seues propietats antiinflamatòries, antioxidants i antitumorals.

D'acord amb Fu i col·laboradors (2013), l'extracció i aïllament es va fer de la manera següent: les arrels i rizomes de *G. uralensis* polvoritzats van ser extrets amb EtOH 70% i el residu obtingut després d'eliminar el dissolvent es va suspendre en aigua i fraccionat L/L amb CH₂Cl₂, EtOAc, i *n*-BuOH. Després d'avaluar l'activitat antioxidant dels extractes i observar que l'extracte EtOAc hi va ser el més actiu, aquest es va cromatografiar sobre gel de sílice amb mescles CH₂Cl₂/MeOH com a fase mòbil. La fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (100:5) va ser recromatografiada i en la fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (100:4) es va aïllar el compost **2**. La fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (100:15) va ser recromatografiada i el compost **3** s'aïllà de la fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (100:17). La fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (15:1) va ser sotmesa a filtració en gel sobre Sephadex®LH-20 i en la fracció eluïda amb CH₂Cl₂/MeOH (1:1) s'aïllà el compost **1**.

A continuació es detallen les dades espectrals dels tres compostos.

El compost **1** va ser identificat en base a les dades espectrals com licocalcona B (Kajiyama *et al.*, 1992). HRESIMS (-) a *m/z* 285,0781 [M-H]⁻. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 3,80 (3H, s, OCH₃), 6,62 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-5), 6,87 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-3' , H-5'), 7,30 (1H, d, *J* = 8,5, H-6), 7,60 (1H, d, *J* = 15,6 Hz, α-H), 7,83 (1H, d, *J* = 15,6 Hz, β-H), 8,00 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-20 , H-6'), 10,31 (3H, ample, OH x 3); ¹³C-RMN (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 60,7 (OCH₃), 187,2 (C=O), 119,1 (Cα), 138,1 (Cβ), 119,2 (C-1), 148,5 (C-2), 138,2 (C-3), 149,5 (C-4), 111,6 (C-5), 118,5 (C-6), 130,8 (C-2'), 115,3 (C-3'), 161,8 (C-4'), 115,3 (C-5'), 129,5 (C-6').

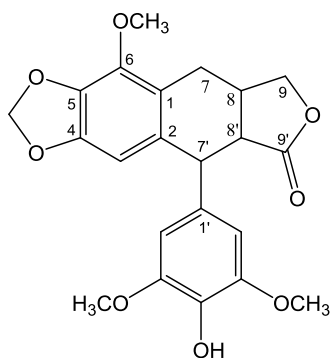
El compost **2** va ser identificat per comparació de les dades espectrals amb la literatura (Zhu *et al.*, 1984) com a glicicumarina. HRESIMS a *m/z* 369,1349 [M+H]⁺. ¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 1,73 (3H, s, CH₃), 1,64 (3H, s, CH₃), 3,26 (2H, d, *J* = 6,8 Hz, H-1''), 3,77 (3H, s, OCH₃), 5,15 (1H, s, *J* = 6,8 Hz, H-2''), 6,26 (1H, dd, *J* = 2,3 i 8,5 Hz, H-5'), 6,37 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H-3'), 7,10 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-6'), 7,81 (1H, s, H-4), 9,36 (2H, s, OH x 2), 10,54 (1H, s, OH). ¹³C-RMN (75 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 159,9 (C-2), 120,3 (C-3), 136,3 (C-4), 106,1 (C-4a), 158,3 (C-5), 62,7 (5-OCH₃), 113,4 (C-6), 159,2 (C-7), 97,8 (C-8), 152,9 (C-8a), 118,3 (C-1'), 155,9 (C-2'), 102,6 (C-3'), 155,2 (C-4'), 106,0 (C-5'), 131,5 (C-6'), 22,2 (C-1''), 122,6 (C-2''), 130,6 (C-3''), 17,7 (3''-CH₃), 25,3 (3''-CH₃).

El compost **3** va ser identificat com a gliuralina B també per comparació de les dades espectrals amb la literatura (Shihano *et al.*, 1997). HRESIMS a *m/z* 423,1819 [M+H]⁺. ¹H-RMN

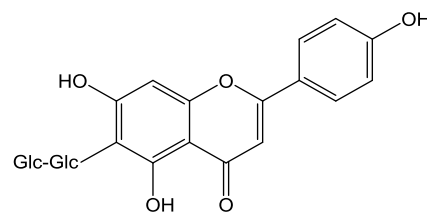
(300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (ppm): 1,63 (3H, s, 3''-CH₃), 1,67 (3H, s, 3''-CH₃), 1,62 (3H, s, 3'''-CH₃), 1,73 (3H, s, 3'''-CH₃), 3,23 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, H-2''), 3,23 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-2'''), 5,17 (1H, t, $J = 7,2$ Hz, H-1'), 5,28 (1H, t, $J = 7,3$ Hz, H-1''), 6,44 (1H, s, H-6), 6,66 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-5'), 6,88 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 8,23 (1H, s, H-2), 8,33 (1H, s, -OH), 9,33 (1H, s, -OH), 10,83 (1H, s, -OH), 13,26 (1H, s, -OH). ¹³C-RMN (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (ppm): 153,5 (C-2), 122,9 (C-3), 180,2 (C-4), 104,2 (C-4a), 161,8 (C-5), 92,7 (C-6), 158,7 (C-7), 110,9 (C-8), 155,2 (C-8a), 122,1 (C-1'), 113,9 (C-2'), 143,1 (C-3'), 144,4 (C-4'), 127,9 (C-5'), 120,4 (C-6'), 20,9 (C-1''), 121,1 (C-2''), 130,6 (C-3''), 17,6 (3''-CH₃), 28,2 (C-1'''), 122,5 (C-2'''), 130,8 (C-3'''), 25,4 (3'''-CH₃).

Exercici 6

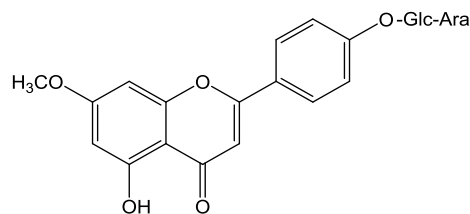
A partir de l'espècie botànica *Linum mucronatum* Bertol (Linaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:



1



2



3

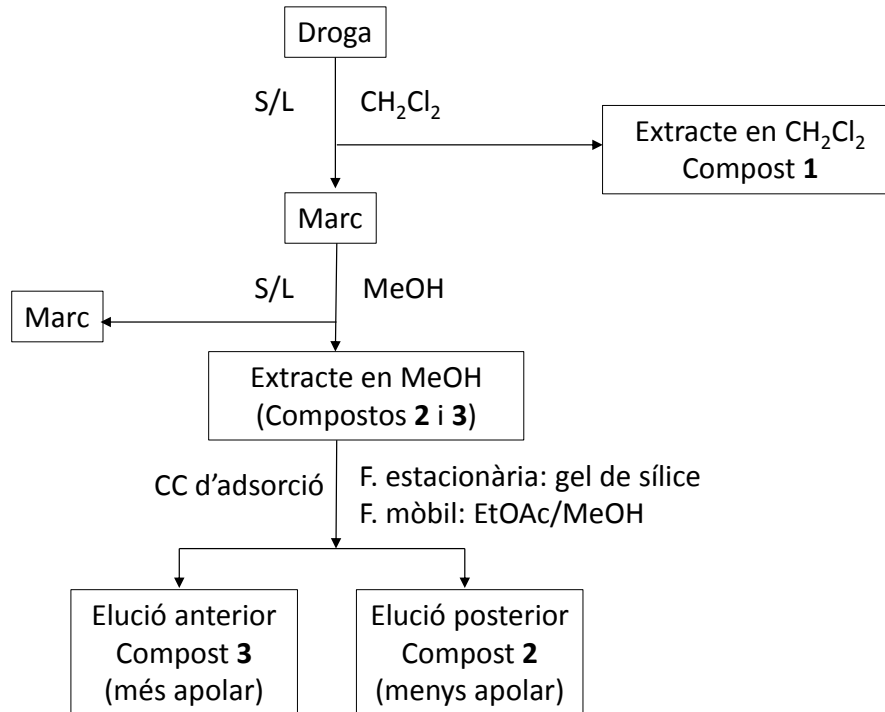
Indiqueu:

- Precursors biogenètics i grup fítoquímic a què pertany cada compost.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Una reacció de caracterització per al compost **3**.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN per a la molècula **3**.

6. Resposta

a) Els tres compostos són fenòlics. El compost **1** és un lignà, dímer d'unitats fenilpropà que deriva biogenèticament de la via de l'àcid shikímic, resultant de la dimerització oxidativa de dues unitats fenilpropanoides. Els compostos **2** i **3** són flavonoides, concretament flavones glicosilades. El compost **2** és un C-heteròsid de flavona, la cadena de dues glucoses es troba unida al C-6 de la genina, mentre que **3** és un O-heteròsid amb la cadena disacàrida unida a la genina mitjançant unió d'èter a l'hidroxil en posició 4'. Els compostos **2** i **3** són metabòlits mixtos derivats de la via de l'àcid shikímic i de tres restes d'acetat.

b) El compost **1** és apolar, soluble en diclorometà, mentre que els heteròsids flavònics són polars, solubles en metanol. Per CC en gel de sílice amb mesclures acetat d'etil/metanol, el compost **3**, lleugerament més apolar, eluirà abans que **2**, més polar. Però també es podria utilitzar fase invertida C18 amb mesclures metanol/aigua, en què l'elució seria al contrari, primer eluiria **2** i després **3**.



c) El compost **3** és fenòlic i es solubilitza amb l'hidròxid potàssic, que intensifica la coloració de la seua solució. A més, mitjançant les reaccions de la cianidina i de Molisch, ja descrites, es caracteritzen el flavonoide i els sucres, respectivament.

d) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **3** mostra dos doblets a δ 6'50 ppm (1H, $J = 1,8$ Hz, H-6) i 6'88 (1H, $J = 1,8$ Hz, H-8), característics d'un flavonoide 5,7 disubstituit. A més, s'hi observen dos doblets a δ 7'98 (2H, $J = 8,7$ Hz, H-2' i H-6') i 6'95 (2H, $J = 8,7$ Hz, H-3' i H-5') típics de l'anell B 4' substituit. Un singlet a δ 3'68 que integra per 3H s'assigna al grup metoxi unit a C-6 (Zare *et al.*, 2014).

Apèndix exercici 6

Els lignans i els flavonoides són compostos fenòlics àmpliament distribuïts en el regne vegetal. Els lignans i neolignans són una classe de metabòlits secundaris amb interès creixent per les nombroses activitats farmacològiques, principalment com a agents antineoplàsics i antivirals, i han servit com a composts cap de sèrie per al desenvolupament de nous fàrmacs anticàncer i antivirals. L'exemple més conegut és la podofil·lotoxina, un antimitòtic que s'uneix a la tubulina i inhibeix la seua polimerització i, per tant, la divisió cel·lular en la metafase. La podofil·lotoxina s'obté de la podofil·lina, resina del rizoma i les arrels d'espècies de podòfil com són *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae) planta espontània a l'est del Canadà i els Estats Units, o *P. hexandrum* Royle a l'Índia. La ingestió de podofil·lotoxina provoca una greu toxicitat hematològica, a més de trastorns digestius i neurològics, raó per

la qual se n'han obtingut derivats semisintètics. Actualment aquestos derivats semisintètics, etopòsid, tenipòsid i fosfat d'etopòsid, l'activitat antitumoral dels quals és la inhibició de la topoisomerasa II, s'utilitzen en quimioteràpia per a diversos tipus de càncer.

Tenint en compte que la principal font comercial de podofil·lotoxina són les espècies de *Podophyllum*, que creixen a Nord-amèrica, l'Índia, Pakistan i algunes regions d'Afganistan i el Tibet, la gran demanda d'aquestes les ha posades en perill d'extinció degut a la falta de planificació i desordenada recol·lecció. Així doncs, s'estan buscant altres fonts naturals alternatives per a la producció de podofil·lotoxina. Però les investigacions han revelat que el gènere *Linum* podria ser una nova font de podofil·lotoxina. Els lignans ariltetralínics es troben àmpliament distribuïts en *Linum* i poden ser usats com a marcadors quimiotaxonòmics.

En aquest sentit, el gènere *Linum* (Linaceae) comprén dues-centes trenta espècies, subdividides en cinc seccions (*Syllinum*, *Cathartolinum*, *Dasylinum*, *Linum* i *Linastrum*), àmpliament distribuïdes pel món. Les seccions *Syllinum* i *Cathartolinum* produeixen una gran varietat de lignans del tipus ariltetralin-lactones, entre els quals els més abundants són 6-metoxi-podofil·lotoxina i els seus derivats, glicòsids i èster. *L. mucronatum* subsp. *orientale*, pertanyent a la secció *Syllinum*, creix al nord-est de l'Iran com a espècie endèmica.

Zare i col·laboradors (2014) en van proposar el següent mètode d'extracció i purificació: les parts aèries de *L. mucronatum* Bertol. subsp. *orientale* van ser extretes en Soxhlet amb C_6H_{14} , CH_2Cl_2 i MeOH. L'extracte diclorometànic es va cromatografiar per CC en gel de sílice eluint amb mesclures $C_6H_{14}/CHCl_3$. Les fraccions que contenien taques morades en ser analitzades per CCP de gel de sílice amb indicador de fluorescència i monitoritzades sota la llum UV (254 nm) abans, després de revelar-les amb 70% H_2SO_4 en EtOH i d'escalfar a 120 °C cinc minuts, indicaven la presència de lignans. Aquestes fraccions van ser sotmeses a CCP preparativa de doble recorregut, primer amb $CHCl_3/MeOH$ (90:10) i després amb toluè/ Me_2CO (65:35). Dels compostos separats, per cristal·lització/recristal·lització a partir de la dissolució, se'n va aïllar el compost **1**. L'extracte metanòlic es va sotmetre a fraccionament per extracció en fase sòlida de fase invertida C18, eluint amb mesclures MeOH/ H_2O . La fracció eluïda en MeOH 20% va ser purificada per CLAR preparativa en C18 i mesclures MeOH/ H_2O i donà el compost **2**, mentre que de la fracció eluïda en MeOH 40% i purificada per CLAR preparativa, en les mateixes condicions, se n'aïllà el compost **3**.

A continuació es detallen les dades espectrals dels compostos **1-3**. El compost **1** es va identificar com a 6-metoxi- α -peltatina en base a les dades espectrals d' 1H - i ^{13}C -RMN. Els senyals de l'espectre 1H -RMN del compost **1** van ser molt semblants a les dades d' α -peltatina obtingudes de la literatura (Broomhead i Dewick, 1990), amb mínimes diferències degudes al grup metoxi unit al C-6 (Taula 1). L'aïllament de lignans tipus ariltetralina d'aquesta espècie està d'acord amb estudis previs que van identificar 5-metoxipodofil·lotoxina, podofil·lotoxina, α -peltatina, i β -peltatina en espècies de *Linum*, concretament de la secció *Syllinum* com *L. flavum*L. i *L. Album* Kotschy ex Boiss.

Taula 1. Dades espectrals d'¹H-RMN de 6-metoxi α-peltatina (**1**) i α-peltatina en CDCl₃ (400 MHz). Desplaçaments químics (δ, ppm) i constant d'acoblament (J, Hz).

Protò	6-Metoxi-O-α-peltatina	α-peltatina ^b
3	6,51, s	6,25
2'	6,37	6,37
6'	6,37	6,37
7	2,35, m ample ^a	3,20 m
8	2,35, m ample ^a	2,7 m
9	4,41, dd ample ^a ; 3,71, dd ample ^a	4,48, ca. dd; 3,95, dd
7'	4,60, dample	4,60, d (3,7)
8'	n.s.	-
OCH ₂ O	5,98, d (1,5); 6,09, d (1,5)	5,94, d (1,4); 5,96, d (1,4)
3',5'-OCH ₃	3,76, s	3,79, s
6-OCH ₃	3,81	-

^a senyals que es superposen; n.s.; senyals no observables.

^b Dades de la literatura (Broomhead i Dewick, 1990).

Taula 2. Dades espectrals de ¹³C-RMN de 6-metoxi α-peltatina (**1**) en CDCl₃.

Carboni	δ (ppm)	Carboni	δ (ppm)
1	117,4	1'	134,9
2	142,1	2'	106,8
3	103,8	3'	149,3
4	150,1	4'	130,5
5	138,9	5'	149,3
6	143,3	6'	106,8
7	25,7	7'	45,7*
8	36,8	8'	45,9*
9	71,2	9'	173,2
OCH ₂ O	101,1		
3''-OCH ₃	56,3		
5'-OCH ₃	56,3		
6-OCH ₃	61,1		

*Els senyals poden ser bescanviables.

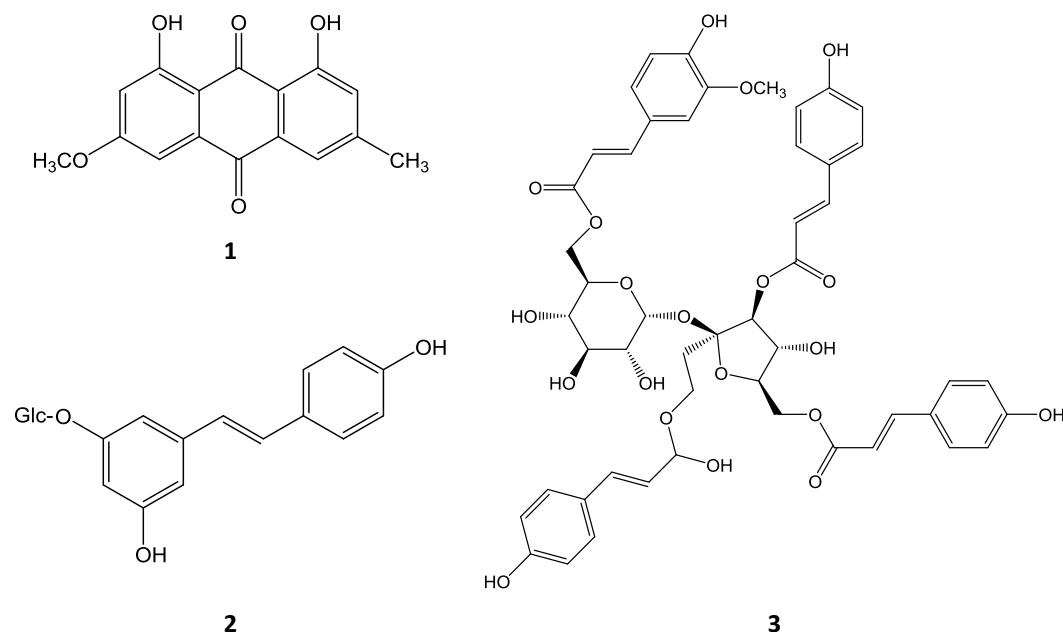
El compost **2** va ser identificat com a 6-[β-D-glucuronopiranosil (1→6)-O-β-D-glucuronopiranosid] apigenina (Mucronatòsid 1) per comparació dels espectres d'¹H- i ¹³C-RMN amb la bibliografia (Taula 3). L'espectre de ¹³C-RMN de **3** està d'acord amb l'estructura de 7-metil-apigenina, i va confirmar la unió del sucre a la posició C-4' i la unió interglicosídica (1→6). La presència del protò anomèric a δ 5'21 ppm (d, J = 4,3 Hz) i el senyal del carboni a 107,46 van confirmar l'arabinosa com a segon sucre. El compost **3** va ser identificat com a 7-O-metil[-4'-O-β-D-arabinofuranosil (1→6)-O-β-D-glucopiranosid] apigenina. Els derivats 5,4'-dihidroxí-7-metoxiflavona (genkwanina) han sigut descrits prèviament en gèneres de les famílies Aspleniaceae, Asteraceae, Cistaceae, Eupomataceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pteridaceae, Saxifragaceae i Betulaceae. Però aquesta és la primera vegada que s'identifiquen en espècies del gènere *Linum* (Linaceae).

Taula 3. Dades espectrals d'RMN d'¹H i ¹³C dels compostos **2** i **3** en (CD₃)₂SO. Desplaçaments químics (δ, ppm) i constant d'acoblament (*J*, Hz).

Posició	Compost 2		Compost 3	
	δH	δC	δH	δC
2		164,16		163,96
3	6,91s	101,15	6,92s	104,84
4		182,09		182,09
5		159,31		156,43
6		104,84	6,50d (1,8)	100,82
7		162,44		164,15
8	6,88s	93,70	6,88d (1,8)	93,69
9		156,43		159,31
10		103,23		107,46
1'		120,88		120,91
2'	7,97d (8,8)	128,16	7,98 d (8,7)	128,68
3'	6,95d (8,8)	116,01	6,95 d (8,7)	115,99
4'		161,14		162,44
5'	6,95d (8,8)	116,01	6,95 d (8,7)	115,99
6'	7,97d (8,8)	128,16	7,98 d (8,7)	128,61
OCH ₃			3,68s	56,02
1''	4,65d (9,6)	73,76	4,98 d (7,2)	101,15
2''		69,52		73,58
3''		78,88		77,19
4''		70,90		70,93
5''		80,07		76,83
6''		70,82		69,53
1'''	4,97 d(7,2)	103,16	5,21 d (4,3)	107,46
2'''		75,72		73,76
3'''		77,10		72,62
4'''		72,62		80,90
5'''		77,15		60,62
6'''		60,23		

Exercici 7

A partir del rizoma d'espècies de *Reynoutria* (Polygonaceae) s'han aïllat i identificat, entre d'altres, els següents compostos:



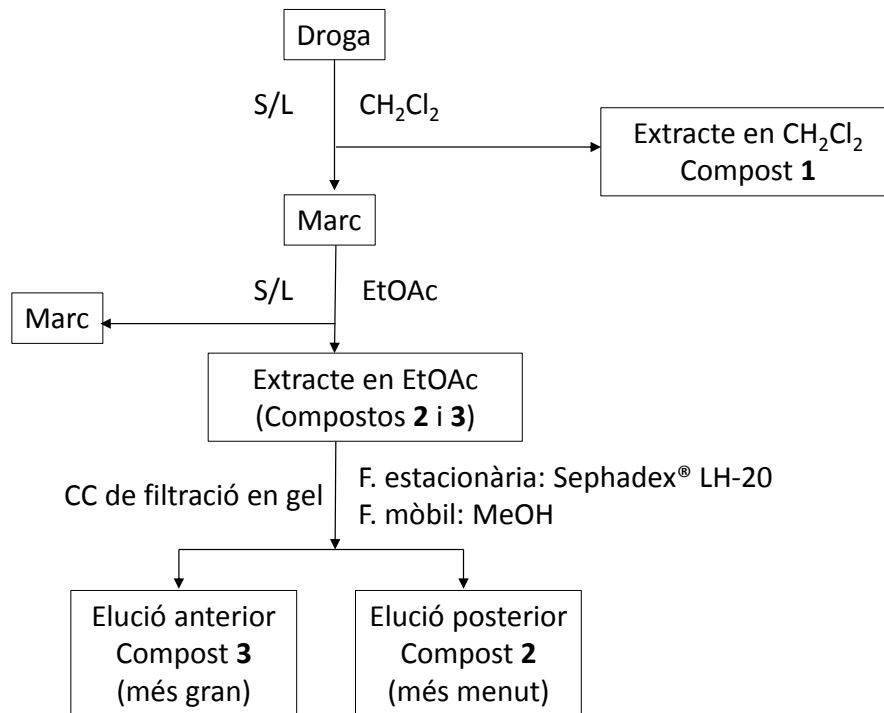
Indiqueu:

- Tipus d'estructura d'aquests compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Una reacció de caracterització del compost **1**.

7. Resposta

a) Els tres compostos són fenòlics. El compost **1** és una 1,8-dihidroxi-antraquinona, atenent al grau d'oxidació de l'anell central, i biogenèticament és un derivat poliacetat resultat de la ciclització d'unitats d'acetat. El compost **2** és un estilbé (trans-1,2-difeniletilè) glucosilat en l'hidroxil del C-3. Biogenèticament és un metabòlit bis-benzílic mixt relacionat amb els flavonoides i per tant derivat de l'àcid shikímic i de tres restes d'acetat, però amb pèrdua d'un carboni de la unitat tricetona inicial. El compost **3** és un polièster constituït per quatre àcids hidroxicinàmics esterificant un disacàrid format per una hexosa i una pentosa. Biogenèticament els àcids fenilpropanoides, freqüentment esterificats en la natura, són derivats de l'àcid shikímic.

b) El compost **1** en forma de genina és apolar i soluble en diclorometà, mentre que els compostos **2** i **3**, amb sucres, són més polars. La droga s'extrau amb el diclorometà amb què es solubilitza **1**. El marc s'extrau amb acetat d'etil i en l'extracte es solubilitzen **1** i **2**, que es separen per mida molecular mitjançant CC per filtració en gel eluint amb metanol en primer lloc el compost **3**, més voluminós, i després el compost **2**, més menut.



c) L'antraquinona lliure es caracteritza amb la reacció de Bornträger, consistent a afegir a l'extracte diclorometànic en què es troba dissolta una solució aquosa d'hidròxid potàssic, que després d'agitar dona una coloració roja en solubilitzar-se la genina ionitzada.

Apèndix exercici 7

Reynoutria japonica Houtt (Polygonaceae) és una de les plantes herbàcies natives d'Àsia oriental considerada més invasora a Europa i Nord-amèrica, el rizoma de la qual s'ha utilitzat durant segles en la medicina tradicional de la Xina i el Japó per al tractament d'inflamació, icterícia, cremades a la pell i hiperlipèmia. Recentment ha sigut inclosa en la Farmacopea Europea.

Nawrot-Hadzik i col·laboradors (2018) van realitzar una anàlisi comparativa per CLAR-DAD/MS del perfil cromatogràfic de tres espècies pròximes del gènere *Reynoutria* (*R. japonica*, *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, i un híbrid, *R. x bohemica* Chrtek & Chrtková) de diferent procedència. Van quantificar-hi sis compostos dels tres grups fitoquímics principals que contenen, incloent-hi estilbens (picèid i resveratrol), antraquinones (emodina i fisiona), i èsters hidroxicinàmics de sacarosa (vanicòsid A i vanicòsid B). *R. japonica* va ser l'espècie amb més contingut en estilbens, mentre que la de Xina va donar dues vegades més que l'espècie europea de Polònia (picèid 14,83 mg/g droga dessecada vs. 7,45 mg/g, i resveratrol 1,29 mg/g vs. 0,65 mg/g). *R. sachalinensis* europea va contenir major quantitat de derivats hidroxicinàmics glicosilats, menys d'antraquinones i estilbens no detectables. L'híbrid europeu va contenir valors intermedis dels metabòlits analitzats entre les dues espècies mare. L'anàlisi quantitatiu va demostrar que *R. japonica* no pot ser substituïda per les altres dues espècies.

D'acord amb Nawrot-Hadzik i col·laboradors (2018), el rizoma de cada espècie es va extraure amb Me₂CO 70%, després es va suspendre en H₂O i es va fraccionar L/L amb CH₂Cl₂, Et₂O, EtOAc i *n*-BuOH, d'on es van obtenir els corresponents extractes.

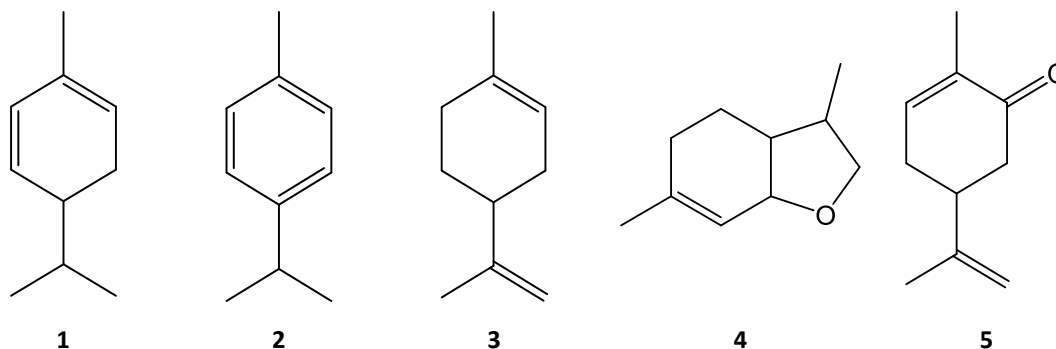
L'extracte diclorometànic de *R. japonica* es va fraccionar per CC en gel de sílice eluint amb un gradient CH₂Cl₂→100% MeOH i va donar deu fraccions. La tercera fracció es va recromatografiar sobre gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₄-EtOAc-HCO₂H (75:24:1→0:99:1) que va donar deu fraccions; en la primera es va aïllar l'antraquinona fisiona i en la segona, emodina.

L'extracte acetat d'etil *R. japonica* es va fraccionar per CC en fase invertida C-18 amb mesclures MeCN-H₂O (10:90→100:0) i va donar sis fraccions. De la fracció segona per CLAR preparativa es va aïllar l'estilbè picèid, que és el *trans*-resveratrol substituït en posició 3 per β-D-glucosa.

L'extracte èter etílic de *R. sachalinensis* es va fraccionar per CC de fase invertida C18 eluint amb un gradient MeCN-H₂O (10:90→100:0), que va donar sis fraccions (FrS1-6). La fracció FrS3, eluïda amb 40% MeCN, es va recromatografiar per filtració en gel (Sephadex®LH-20) amb MeOH i va donar dotze fraccions (FrS3a-l); en la novena FrS3i es va aïllar vanicòsid B. A partir de la fracció FrS4, eluïda amb 60% MeCN, i recromatografiada per CLAR preparatiu, es va aïllar vanicòsid A.

Exercici 8

L'anàlisi qualitativa i quantitativa de l'oli essencial de l'espècie *Anethum graveolens* L. (Apiaceae) ha permès identificar quinze dels compostos que representen el 99,5% del total. Hi destaquen els següents components majoritaris: α-felandré (**1**, 4,7%), *p*-cimé (**2**, 1,9%), limoné (**3**, 6%), èter d'anet (**4**, 8%), i carvona (**5**, 14%).



Indiqueu:

- Què és un oli essencial?
- Tipus d'estructura d'aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Un mètode d'obtenció de l'oli essencial.
- Una tècnica d'anàlisi de l'oli essencial, amb justificació de l'ordre d'elució dels components.

Resposta 8

a) Els olis essencials són mesclades volàtils amb nombrosos constituents, majoritàriament terpens, principalment mono- i sesquiterpens que poden ser lineals, cíclics o aromàtics amb diferent grau de funcionalització. Minoritàriament, contenen substàncies alifàtiques de cadena curta com hidrocarburs, alcohols, aldehids, etc., i substàncies benzèniques com són els derivats en C₆-C₁ i fenilpropanoides.

b) Tots aquests metabòlits són monoterpens (deu carbonis) resultat de la unió de dues unitats d'isoprè o 2-metilbutadié. Són hidrocarburs mono- i bicíclics amb diferent grau d'insaturació, dels quals **2** és aromàtic, **4** i **5** oxigenats. Els terpenoides tenen un nombre de carbonis múltiple de cinc i es biosintetitzen per condensació repetida de molècules de pirofosfat d'isopentenil i de pirofosfat de dimetilal·lil, concretament els monoterpens resulten de la unió "cap-cua" d'aquestes dues unitats i donen el geranil pirofosfat. Tradicionalment, es considera que els terpens es biosintetitzen a partir de l'àcid mevalònic (3,5-dihidroxi-3-metilpentanoic), format per condensació de tres molècules d'acetil CoA. Tanmateix, es coneix una altra ruta biosintètica de l'isoprè, minoritària i plàstica, anomenada *ruta del fosfat de desoxixilulosa*, perquè es forma el metabòlit intermediari, 5-fosfat d'1-desoxi-D-xilulosa, a partir del piruvat i el 3-fosfogliceraldehid.

c) El mètode d'obtenció dels olis essencials més tradicional i utilitzat al laboratori és la hidrodestil·lació en un aparell on la droga se submergeix en aigua dins un matràs i s'escalfa amb una manta calefactora fins a ebullició. El vapor d'aigua arrossega els components volàtils; l'aigua i l'essència destil·len, i els vapors passen a un refrigerant que els condensa i es recullen en un col·lector, on se separen l'essència i l'aigua, immiscibles, per diferència de densitat. Mitjançant l'aparell de Clevenger es pot quantificar el rendiment en l'oli essencial, referint el volum d'essència obtingut a la quantitat de droga de partida i obtenint-ne el percentatge.

d) L'anàlisi cromatogràfica es pot realitzar per CP sobre gel de sílice eluint amb mesclades de dissolvents apolars com hexà i diclorometà, i revelant amb vanil·lina o anisaldehyd-àcid sulfúric. Tanmateix, la cromatografia de gasos és la tècnica més adequada i imprescindible per a determinar-ne la composició qualitativa i quantitativa. La possibilitat d'acoblament amb espectrometria de masses permet identificar els pics cromatogràfics dels constituents en diferents temps d'elució (temps que tarden a travessar la columna) mitjançant els corresponents espectres de masses. En el cromatograma de l'oli essencial eluiran primer els hidrocarburs (**1**, **2** i **3**), seguidament l'èter, i finalment la cetona. D'acord amb la literatura (Manzuoerh *et al.*, 2019), els índexs de retenció corresponents per als constituents majoritaris (**1-5**) són 1002, 1020, 1024, 1184, i 1239 respectivament.

Apèndix exercici 8

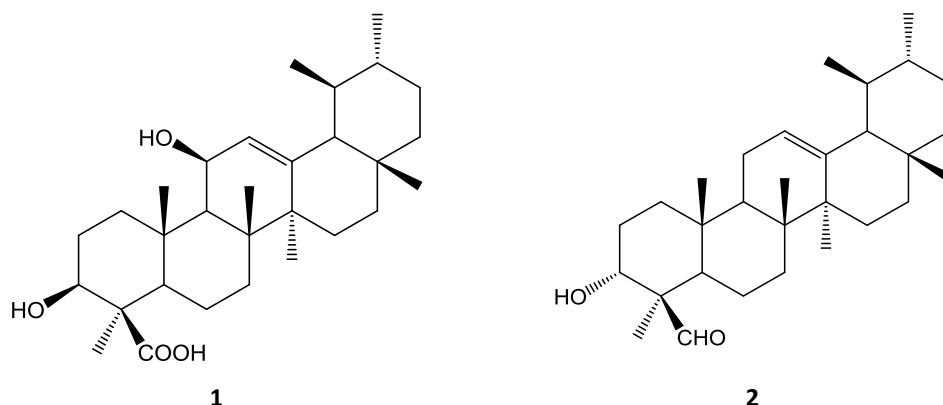
L'espècie *Anethum graveolens* (Apiaceae), anomenada anet, s'utilitza comunament per al tractament de dispèpsia i flatulència, així com per les seues propietats antiinflamatòries, antimicrobianes, antioxidants i analgèsiques.

Es coneixen certes plantes medicinals que poden accelerar el procés de cicatrització de ferides perquè exerceixen efectes immunomoduladors que indueixen l'apoptosi i la proliferació cel·lular. En aquest sentit, Manzuoerh i col·laboradors (2019) van avaluar els efectes de l'administració tòpica d'un ungüent que conté l'oli essencial de l'anet en un

procés de cicatrizació de ferides induït experimentalment en ratolins i infectats amb *Staphylococcus aureus*, resistent a meticil·lina. L'aplicació tòpica d'oli essencial al 2 i 4% va reduir l'àrea de la ferida i va impedir el creixement bacterià. Va reduir significativament la fase inflamatòria i la reepitelització accelerada, l'angiogènesi i l'acúmulo de fibroblasts i de col·lagen, demostrant així que l'ungüent preparat a partir de l'oli essencial de l'anet, amb els seus principals constituents α -felandré, *p*-cimé i carvona es pot utilitzar com a agent per a accelerar la cicatrizació de ferides infectades.

Exercici 9

A partir de la resina de *Boswellia sacra* Flueck. (Burseraceae) s'han aïllat i identificat, entre d'altres, els compostos **1** i **2** :



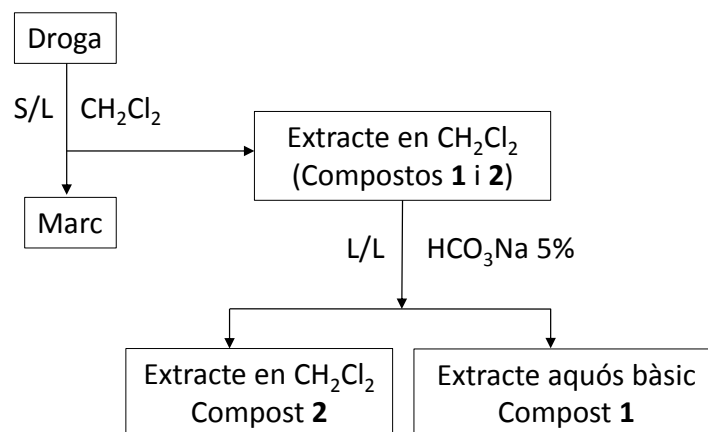
Indiqueu:

- Tipus d'estructura dels compostos i els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquests compostos.
- Una reacció de caracterització d'un d'ells.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN del compost **1**.

9. Resposta

a) Els compostos **1** i **2** són terpènics, més concretament són triterpens (presenten una estructura de trenta carbonis amb repetició del motiu metil-buté) pentacíclics tipus ursà per la disposició dels metils 29 i 30 sobre el C-19 i C-20, respectivament. Biogenèticament, els dos compostos deriven de la via de l'àcid mevalònic, més concretament provenen de l'acoblament "cua-cua" de dues unitats de pirofosfat de farnesil (quinze carbonis) que donen lloc a la formació de l'esqualè, un precursor lineal poliènic de trenta carbonis que, per protonació i posterior ciclització via l'intermediari 2,3-epoxi-esqualè, forma els diferents esquelets triterpènics.

b) Les dues substàncies són apolars, solubles en diclorometà, però a més, la presència d'un grup carboxil en el compost **1** el fa soluble en dissolucions aquoses alcalines. Així, la droga s'extrau amb diclorometà i l'extracte diclorometànic es pot fraccionar per CC en gel de sílice amb diclorometà/acetat d'etil (95:5), eluint en primer lloc el compost **2**, més apolar, i a continuació el compost **1**, més polar. Alternativament, l'extracte diclorometànic es pot fraccionar L/L amb una dissolució de bicarbonat sòdic en la qual es dissol el compost **1**, que se separa del **2**, el qual romandria en la fase orgànica.



c) Ambdós compostos donen positiva la reacció de Liebermann, que consisteix a afegir una solució d'anhídrid acètic i àcid sulfúric concentrat a un extracte enriquit en el compost, en el qual s'observa una coloració roig-rosàcia.

d) L'espectre d'¹H-RMN del compost **1** mostra cinc metils terciaris singlets que integren per tres protons cadascun a δ 1,24 ppm (H-23), 1,14 (H-26), 1,05 (H-27), 1,03 (H-25) i 0,78 (H-28), dos metils secundaris a 0,98 (3H, doblet, *J* = 6,6 Hz, H-30) i 0,88 (3H, doblet, *J* = 6,5 Hz, H-29) i un protó olefínic trisubstituint a 5,35 (1H, doblet, *J* = 3,0 Hz, H-12), senyals característics d'un triterpè tipus ursà relacionat amb els àcids boswèl·lics (Al-Harrasi *et al.*, 2018).

Apèndix exercici 9

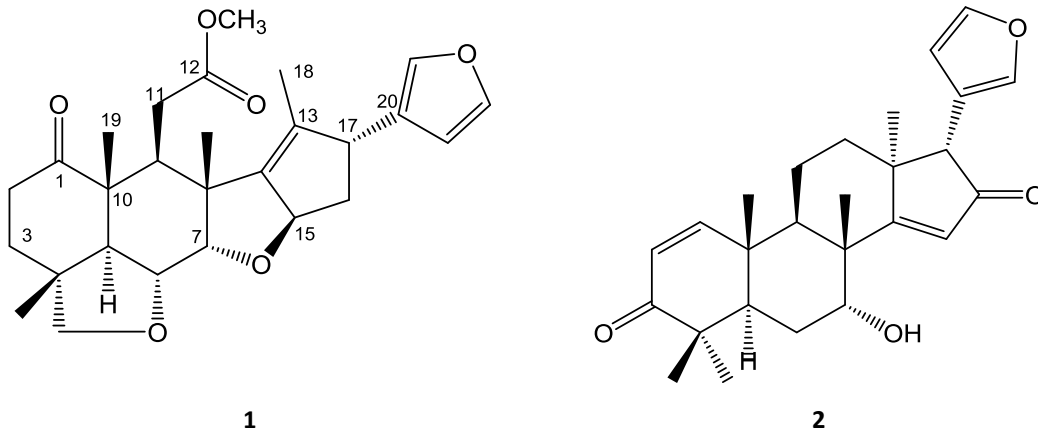
L'espècie botànica *Boswellia sacra* (Burseraceae) és un arbre amb gran interès econòmic perquè és una font important d'encens d'alta qualitat, així com de compostos bioactius amb un gran ventall d'activitats biològiques.

L'encens és una resina oleo-gomosa marró groguenc que exsuda i se solidifica després d'una sèrie d'incisions en l'escorça de l'arbre, el rendiment de la qual depèn de la grandària i edat de l'arbre així com de les condicions ambientals. L'encens està compost d'oli essencial, polisacàrids i una part lipòfila constituïda per terpens, majoritàriament àcids boswèl·lics, però qualitativa i quantitativament diferent segons les espècies. L'encens és constituent de pomades, sabons, locions, perfums i inclús saboritzant d'aliments. El seu oli essencial s'ha descrit com a analgèsic, antiinflamatori, antioxidant, diürètic, anticoagulant, protector cardíac, i útil davant trastorns gàstrics, hepàtics i de la pell.

Al-Harrasi i col·laboradors (2018) han descrit els àcids boswèl·lics com constituents químics específics per a les diferents espècies del gènere *Boswellia*. A partir de la resina de *B. sacra* s'han aïllat i caracteritzat per anàlisi espectroscòpica mono i bidimensional l'estructura del compost **1**, deduïda com l'àcid 3β, 11β-dihidroxi-urs-12-en-24-oic, més comunament conegut com l'àcid 3β, 11β-dihidroxi-β-boswèl·lic, i la del compost **2** com 3α-hidroxi-urs-12-en-24-al, comunament anomenat β-aldehid boswèl·lic, dos nous components químics.

Exercici 10

A partir de les llavors de l'espècie *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos **1** i **2**, de fórmula molecular $C_{27}H_{34}O_6$ i $C_{26}H_{31}O_4$ respectivament.



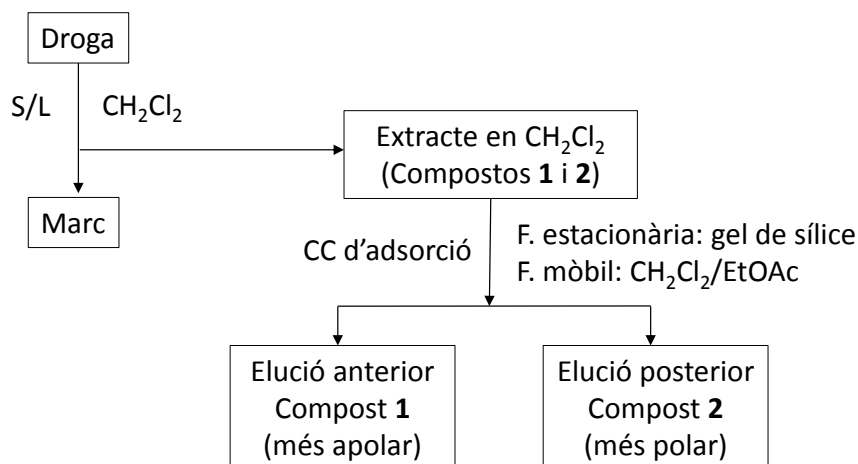
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quin són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquests dos compostos.
- Una reacció de caracterització del compost **2**.

10. Resposta

a) Els dos compostos són terpènics. Les fórmules moleculars suggereixen que es tracta d'esteroides o triterpenoides que han perdut algun àtom de carboni, però la presència de dos metils en posició 4, dels quals un d'ells forma en el compost **1** part d'un anell, indica que són triterpenoides. Els dos compostos són tetracíclics amb addicionals ciclitzacions furàniques, i biogenèticament deriven de la via de l'àcid mevalònic.

b) Els dos compostos són apolars i s'extrauen amb diclorometà. Aquest extracte es fracciona per CC en gel de sílice amb mesclures diclorometà/acetat d'etil (9:1) com a fase mòbil, eluint primer el compost **1**, més apolar, i després el compost **2**, lleugerament més polar.



c) El compost **2** es pot caracteritzar mitjançant la reacció de Liebermann, que consisteix a afegir anhídrid acètic i àcid sulfúric, i en funció de la coloració obtinguda permet diferenciar triterpenoides (color roig rosaci) i esteroides (color verd blavós).

Apèndix exercici 10

Azadirachta indica (Meliaceae) és una espècie nativa d'Índia i Myanmar, coneguda com a arbre "Neem" i utilitzada des de temps antics com a insecticida en medicina tradicional a l'Índia i altres països d'Àsia i Àfrica. Totes les parts d'aquest arbre (fulles, tiges, escorça, arrels, flors, fruits i llavors) constitueixen la droga vegetal, i poden utilitzar-se per al tractament de tos, ferides, úlceres en la pell, helmints intestinals, diabetis, diarrea, còlera, etc.

Nombrosos estudis fitoquímics han identificat en aquesta espècie més de tres-cents compostos diferents. D'aquests, més de cent trenta són triterpenoides tipus limonoide. Els limonoides deriven de triterpenoides amb un esquelet característic del tipus apotirucallà o apoeufà, la cadena lateral dels quals perd els quatre carbonis terminals i en la majoria dels casos forma un anell furà. Els limonoides han demostrat diverses activitats farmacològiques com antitumoral, antiinflamatòria, antimalària, antibacteriana i antiprotozoària, entre d'altres.

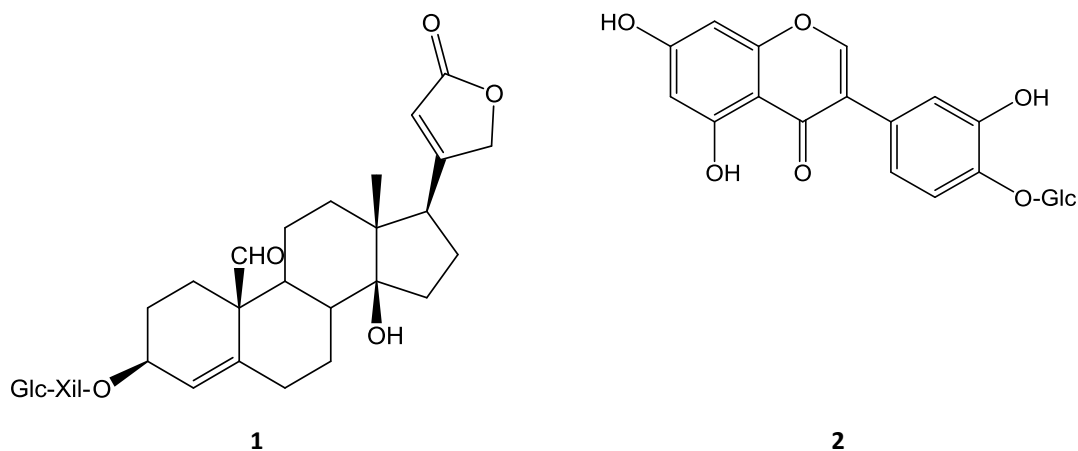
A partir de les llavors d'*A. indica*, Cheng i col·laboradors (2018) van aïllar quatre nous nor-triterpenoides tipus limonoide que van identificar per anàlisi espectroscòpica com a 28-desoxo-2,3-dihidronimbòlid (**1**), 1-destigloil-1-*O*-metacriloilsalannina, 12-acetoxi-3-*O*-acetil-7-*O*-tigloïlvilasinina i 12-acetoxi-3-*O*-acetil-7-*O*-metacriloïlvilasinina. D'aquests, el compost **1** va demostrar activitat citotòxica davant una línia cel·lular de càncer de pulmó, la qual cosa suggeria l'interès potencial en la recerca de nous agents anticancerosos.

D'acord amb Cheni col·laboradors (2018), l'extracció i aïllament dels compostos va ser de la manera següent: les llavors d'*A. indica* polvoritzades i dessecades es van macerar amb EtOH 95%. L'extracte obtingut es va concentrar, es va suspendre en H₂O i posteriorment es va fraccionar L/L amb C₆H₁₄, EtOAc, i *n*-BuOH.

L'extracte EtOAc concentrat es va cromatografiar per CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₄/Me₂CO (100:0→50:50) seguit de CHCl₃/MeOH (95:5→0:100) i va donar divuit fraccions (E1-18). La fracció E10 va ser recromatografiada sobre gel de sílice amb C₆H₁₄/EtOAc (90:10→0:100) i va donar vint-i-sis fraccions (E10a-10z). La fracció E10t es va fraccionar sobre fase invertida C18 eluint amb un gradient de MeOH/H₂O (55:45→100:0); va donar trenta subfraccions (E10t1-10t30). La subfracció E10t10 va ser purificada per CLAR preparativa en C18 i va donar el compost **1**. La subfracció E10w va ser purificada per CC de filtració en gel (Sephadex®LH-20) amb una mescla de C₆H₁₄/CH₂Cl₂/MeOH (5:4:1) i va donar sis subfraccions (E10w1-10w6). E10w1 era el compost **2**.

Exercici 11

A partir de les llavors de l'espècie *Securigera securidaca* (L.) Degen & Dorfl. (Leguminosae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos **1** i **2**.



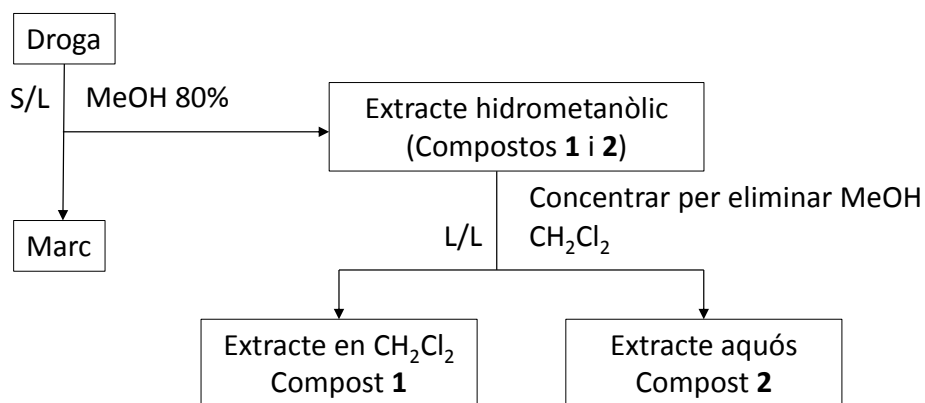
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquests compostos.
- Dues reaccions de caracterització del compost **1**.

11. Resposta

a) Els dos compostos són *O*-heteròsids, ja que la genina es troba unida mitjançant un enllaç èter a una part glucídica; tanmateix, el compost **1** és terpenic, mentre que el **2** és fenòlic. El compost **1** presenta un esquelet $3\beta,14\beta$ -dihidroxi-esteroide amb una lactona pentagonal monoinsaturada en posició 17β i una cadena de dos sucres unida a l'hidroxil sobre el C-3, característiques que indiquen que es tracta d'un heteròsid cardiotònic. Biogenèticament, l'esteroide deriva de la via de l'àcid mevalònic i la lactona de la via de l'acetat. El compost **2** és un flavonoide, més concretament un *O*-heteròsid d'isoflavona per la presència del doble enllaç en posició 2-3 i que suporta en el C-3 l'anell B, amb patró catecol (*orto*-dihidroxi) al qual s'uneix un sucre en el C-4'.

b) Els dos compostos s'extrauen amb metanol 80%. Després de concentrar l'extracte hidrometanòlic per-hi reduir el volum de metanol, la suspensió aquosa es purifica per partició L/L amb diclorometà, i se separa en la fase orgànica el compost **1**, encara que cap de les oses és del tipus desoxi-sucres, mentre que en l'aquosa roman el compost **2**.



c) Una reacció de caracterització específica de l'anell γ -lactònic α -insaturat és la reacció de Kedde, que utilitza un derivat aromàtic nitrat com és l'àcid 3,5-dinitrobenzoic en medi alcalí amb l'aparició d'una coloració roig-violeta estable. Per a caracteritzar els sucres, s'utilitza la reacció general o reacció de Molisch (aparició d'un anell morat després de l'addició d' α -naftol i d'àcid sulfúric). En aquest cas, la reacció de Keller-Killiani (addició d'àcid sulfúric a una solució acètica de l'heteròsid en presència de sals fèrriques) no dona positiva perquè és específica de 2-desoxisucres.

Apèndix exercici 11

Securigera securidaca (Leguminosae) és una espècie nativa d'Iran, les llavors de la qual s'utilitzen en medicina tradicional per controlar la diabetis, no només a l'Iran sinó també a l'Índia i Egipte.

L'activitat hipoglucèmia d'aquestes llavors s'ha demostrat en animals d'experimentació. Tant l'administració per via intraperitoneal com oral de la infusió aquosa i de l'extracte etanòlic van reduir significativament els nivells de glucosa en animals diabètics. L'extracte aquós va disminuir l'activitat catalasa d'eritròcits com un mecanisme antioxidant de defensa en animals diabètics. També es va observar que l'administració de l'extracte clorofòrmic a rates normoglicèmiques va reduir-ne els nivells de glucosa en sang i va millorar la tolerància a la glucosa. Altres activitats farmacològiques de les llavors descrites són hipolipemiant, gastroprotectiva, antinociceptiva i citotòxica (Tofighi *et al.*, 2017).

Tofighi i col·laboradors (2017) van aïllar de les llavors d'aquesta planta tres heteròsids cardiotònics com a responsables de l'activitat antihiperoglucèmica i els van identificar com a securigenin-3-*O*- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -xilopiranosid, securigenin-3-*O*-inositol-(1 \rightarrow 3)- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -xilopiranosid i securigenin-3-*O*- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -glucopiranosid. Els dos últims s'han descrit per primera vegada en la natura. Els tres compostos administrats a una dosi de 10 mg/kg a ratolins diabètics, per estreptozocina, van reduir-ne significativament els nivells de glucosa en sang per estimulació de la secreció d'insulina, amb un efecte comparable a glibenclàmida a 3 mg/kg.

A partir de les llavors també van aïllar tres heteròsids flavonoides identificats com a orobol-4'-*O*-glucopiranosid, isoramnetina-3-*O*-neohesperidòsid i isosalipurposid, els quals van demostrar citotoxicitat davant línies cel·lulars cancerígenes, però no en línies cel·lulars de fibroblasts (Tofighi *et al.*, 2014).

D'acord amb Tofighi i col·laboradors (2014, 2017), l'extracció i aïllament dels compostos va ser de la manera següent: les llavors de *S. securidaca* (Leguminosae) polvoritzades i

dessecades es van macerar amb MeOH 80%. L'extracte obtingut es va concentrar per reduir el metanol i es va fraccionar L/L amb CHCl₃.

L'extracte CHCl₃ es va cromatografiar per CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₄/EtOAc/MeOH i allò va donar onze fraccions (C1-11). La fracció C9 va ser purificada per CC en gel de sílice amb un gradient de CHCl₃/MeOH que va donar 10 subfraccions (C9.1-9.10). La subfracció C9.7 va ser fraccionada per CC de filtració en gel (Sephadex®LH-20) eluint amb CHCl₃/MeOH (4:6) i subsegüentment sobre fase invertida C18 amb MeOH 50%, i va donar el compost **1**.

L'extracte hidrometanòlics va cromatografiar sobre fase invertida C18 eluint amb mescles MeOH/H₂O i va donar 23 fraccions (H1-23). La fracció H8 va ser purificada per CC sobre fase invertida C18 eluint amb mescles MeOH/H₂O; va donar 8 subfraccions (H8.1-8.8). La subfracció H8.5 va ser fraccionada per filtració en gel (Sephadex®LH-20) eluint amb MeOH el compost **2**.

L'estructura del compost **1** va ser establerta per anàlisi espectroscòpica d'RMN, mono i bidimensional, i EIMS (Taula 1).

Taula 1. Dades d'¹H-RMN (500 Hz, CD₃OD) i ¹³C (125 MHz, CD₃OD) del compost **1**.

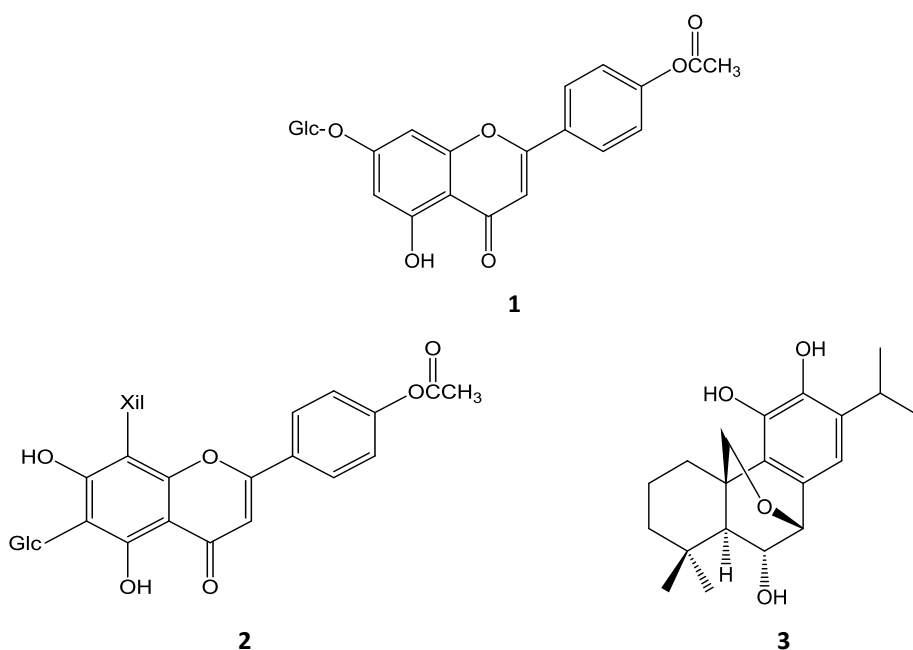
Posició	δ H	δ C	Posició	δ H	δ C
1	1,30 m; 2,38 m	29,7	1'	104,34 d, J = 7,9 Hz	104,1
2	1,34 m; 1,99 m	28,7	2'	3,14 m	74,7
3	4,16 t, J = 7,4 Hz	75,8	3'	3,28 m	78,0
4	5,78 s	127,7	4'	3,63 m	78,5
5	-	140,0	5'	3,26 m; 3,96 dd, J = 11,7, 5,3 Hz	64,5
6	2,28 m; 2,33 m	34,1			
7	1,10 m; 2,15 m	29,3	1''	4,32 d, J = 8,0 Hz	103,4
8	1,84 m	43,9	2''	3,16 m	74,6
9	1,27 m	50,8	3''	3,34 m	77,7
10	-	54,8	4''	3,24 m	71,4
11	1,39 m; 1,65 m	22,7	5''	3,43 t, J = 9,0 Hz	76,0
12	1,36 m; 1,49 m	40,5	6''	3,60 m; 3,83 dd, J = 11,9, 2,0 Hz	62,6
13	-	50,8			
14	-	85,6			
15	1,58 m; 1,99 m	32,7			
16	1,84 m; 2,09 m	27,9			
17	2,78 dd, J = 9,5, 5,6 Hz	51,7			
18	0,85 s	16,2			
19	9,78 s	205,4			
20	-	178,2			
21	4,87 dd, J = 18,4, 1,6 Hz 4,98 dd, J = 18,4, 1,6 Hz	75,3			

22	5,87 s	117,9		
23	-	177,2		

L'estructura del compost **2** va ser establerta per anàlisi espectroscòpica i confirmada amb dades de la bibliografia: UV (MeOH) 258 i 357 nm, (+AlCl₃) 274 i 439 nm, (+AlCl₃+HCl) 269 i 400 nm, (+NaOAc) 272 i 387 nm. ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,90 (1H, s, H-2), 7,71 (1H, d, J = 2 Hz, H-2'), 7,59 (1H, dd, J = 2, 8,5 Hz, H-6'), 6,87 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-5'), 6,39 (1H, d, J = 2 Hz, H-8), 6,20 (1H, d, J = 2 Hz, H-6), 5,24 (1H, d, J = 7,7 Hz, H-1''), 3,71 (1H, dd, J = 2,35, 12 Hz, H-6''a), 3,57 (1H, dd, J = 5,3, 12 Hz, H-6''b), 3,48 (1H, t, J = 8,5 Hz, H-5''), 3,43 (1H, t, J = 9 Hz, H-3''), 3,34 (1H, t, J = 9,2 Hz, H-2''), 3,22 (1H, m, H-4'').

Exercici 12

Dins dels variats tipus de metabòlits secundaris que s'han aïllat del gènere *Premna* (Lamiaceae), s'hi troben els següents compostos **1**, **2** i **3**.



Indiqueu:

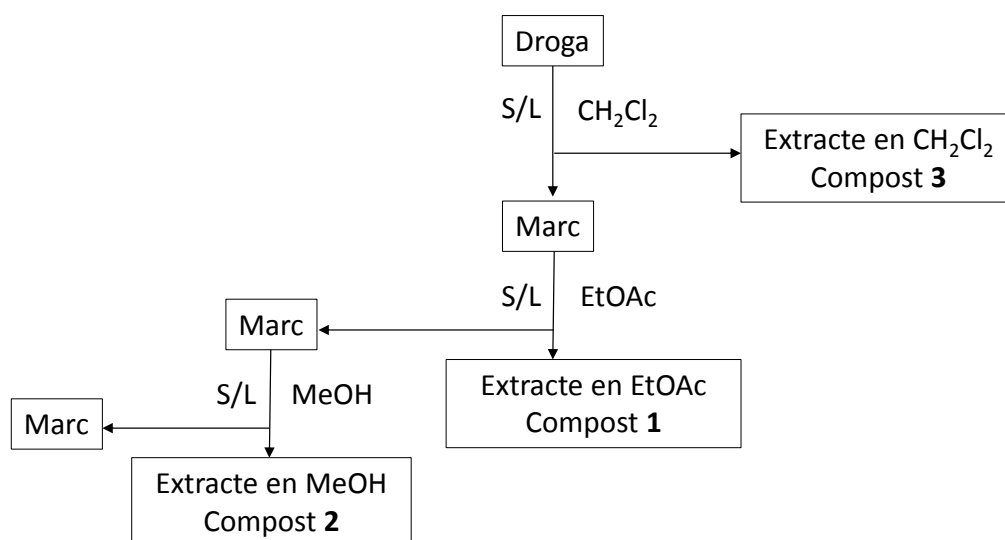
- El grup fitoquímic a què pertanyen aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Un procés d'extracció i separació seqüencial per les tres substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN de la molècula **1**.

12. Resposta

a) Els tres compostos presenten caràcter fenòlic, els dos primers tenen un esquelet flavonoide mentre que el tercer és terpenoide. Els compostos **1** i **2** són flavones glicosilades. El primer compost és un O-heteròsid, ja que té una hexosa unida per enllaç èter a l'hidroxil en el C-7 de la flavona, mentre que el compost **2** és un C-heteròsid, ja que les oses substitueixen els C-6 i C-8 directament sense pont èter. Els dos compostos presenten el mateix patró de substitució en l'anell B, l'hidroxil en el C-4' acetilat. Els compostos **1** i **2** són

metabòlits mixtos, la part cinamoïl de la molècula deriva biogenèticament de la via de l'àcid shikímic, mentre que l'altra part benzoïl deriva de tres restes d'acetat. Els sucres són metabòlits primaris. En el cas del compost **2**, la unió del sucre a la genina mitjançant un enllaç C-C té lloc per la presència d'un carboni aromàtic nucleofílic activat pels grups fenòlics adjacents. El compost **3** és un diterpé (vint carbonis) tetracíclic amb un anell aromàtic *orto*-dihidroxilat, un pont èter i un alcohol. Aquest deriva biogenèticament de l'àcid mevalònic, resultat de la unió "cap-cua" de dues restes de pirofosfat de geranil.

b) En general, els heteròsids de genina flavonoide com els compostos **1** i **2** són polars i hidrosolubles, mentre que els diterpens com el compost **3** són apolars i solubles en dissolvents orgànics de baixa a mitjana polaritat. Una extracció senzilla consisteix a extraure la droga amb diclorometà i en l'extracte diclorometànic se solubilitza **3**. El marc s'extrau amb acetat d'etil per a obtenir un extracte en què es dissol el compost **1** (heteròsid amb un sucre) i en la subsegüent extracció del marc amb metanol s'extrau el compost **2** (heteròsid amb dos sucres).



c) L'espectre d'¹H-RMN del compost **1** mostra cinc senyals de protons aromàtics al voltant de 7 ppm corresponents a: H-6 i H-8 de l'anell A, que apareixen com doblets acoblats en *meta* ($J = 2$ Hz) i que integren per un protó cadascun; H-3 de l'anell C, que apareix com un singlet i que integra per un protó. Finalment, un sistema AA'BB' (H-2' i H-6', i H-3' i H-5') en l'anell B, els senyals del qual apareixen com doblets acoblats en *orto* ($J = 7$ Hz) i que integren per dos protons cadascun. A més, s'hi observa un singlet desapantallat al voltant de 2 ppm corresponent al metil d'èster d'acetat.

Apèndix exercici 12

El gènere *Premna* (Lamiaceae), distribuït al llarg d'àrees subtropicals i tropicals d'Àsia, Àfrica, Austràlia i les Illes del Pacífic, s'utilitza en la medicina popular principalment per tractar la inflamació, malalties relacionades amb el sistema immune, trastorns estomacals, curació de ferides i malalties de la pell.

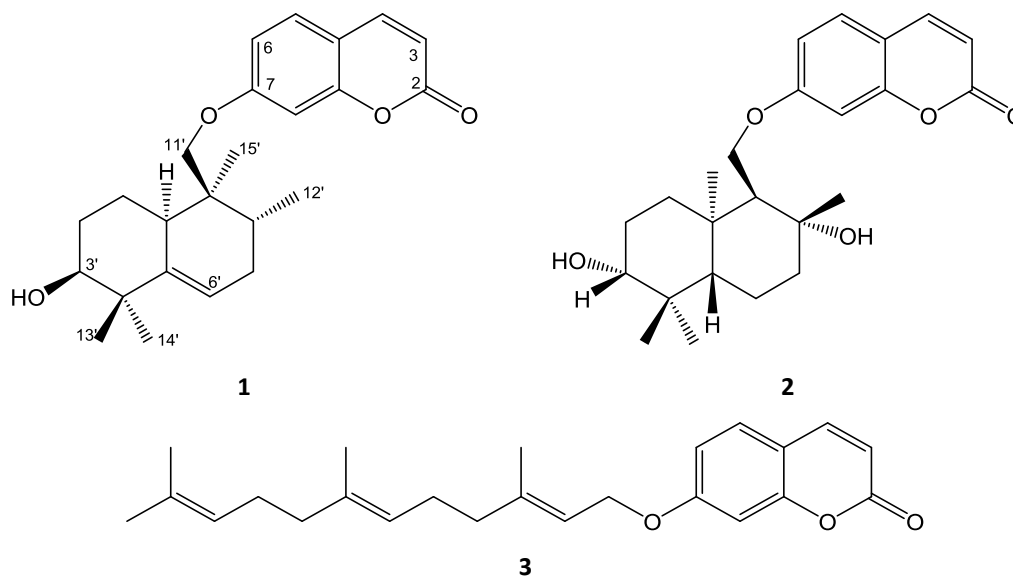
La paraula *Premna* deriva de la grega *premnōn*, que significa soca d'arbre, i es refereix al tronc curt i trenat de *P. serratifolia* L., la primera espècie recollida d'aquest gènere. El gènere

Premna ha estat subdividit en cinc seccions depenent de la forma i el nombre de lòbuls del calze. La majoria d'espècies són arbres o arbusts xicotets.

A partir d'espècies de *Premna* s'han aïllat i identificat més de dos-cents-cinquanta compostos, incloent-hi diterpenoides, glicòsids iridoides i flavonoides, com els metabòlits secundaris més comuns, seguits per sesquiterpens, lignans, feniletanoides, megastigmans, gliceroglicolípid i ceramides. S'han realitzat molts estudis *in vivo* i *in vitro* per avaluar les propietats farmacològiques dels extractes i compostos aïllats de les espècies d'aquest gènere, i aquests estudis han demostrat activitats antimicrobianes, antioxidants, antiinflamatòries, immunomoduladores, antihiperoglucèmians i citotòxiques. Les espècies de *Premna* es categoritzen pels valors potencialment medicinals següents: (i) com a antiinflamatori, ja siga per tractar asma, reumatisme, gota, dolors i febre; (ii) per millorar el sistema immunològic i tractar el refredat i la tos; (iii) per trastorns estomacals com dolor, diarrea, febre, i disenteria; (iv) per curació de ferides i el tractament de malalties de la pell; (v) per tractar infeccions bacterianes i malària; (vi) per al tractament de problemes de neuràlgia i cefalea; i (vii) per al tractament de la hipertensió, diabetis, i problemes cardíacs i de fetge (Dianita i Jantan, 2017).

Exercici 13

A partir de la gomoresina dessecada de l'espècie *Ferula sinkiangensis* K.M. Shen (Apiaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els següents principis **1**, **2** i **3**.



Indiqueu:

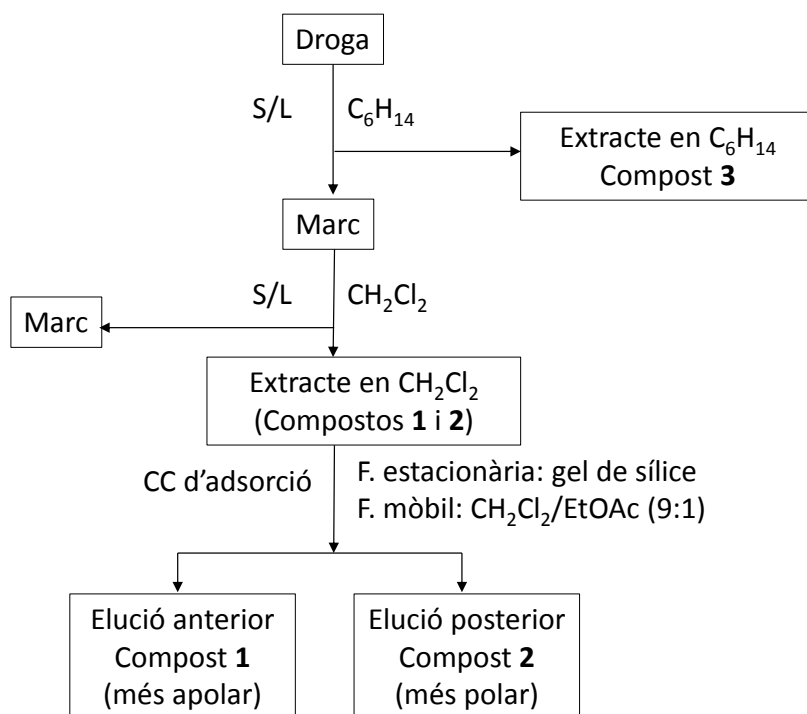
- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament de les tres substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **1**.

13. Resposta

- Els tres compostos són terpenofenòlics. Els tres contenen una cumarina (benzo- α -pirona) amb l'hidroxil en posició 7 substituït amb un sesquiterpè (quinze carbonis, provinents de tres

restes d'isopré) bicíclic hidroxilat en els compostos **1** i **2**, mentre que és lineal en el compost **3**. Biogenèticament, la cumarina és un metabòlit que prové de la via de l'àcid shikímic, mentre que el sesquiterpè deriva de la via de l'àcid mevalònic.

b) El compost **3** és molt apolar i pot ser que se solubilitze en hexà, mentre que els altres dos presenten una polaritat baixa-mitjana i se solubilitzaran en diclorometà, per la qual cosa la droga s'extrau primer amb hexà i el marc amb diclorometà. L'extracte diclorometànic es purifica per CC en gel de sílice, eluint amb mesclures diclorometà-acetat d'etil en primer lloc el compost **1**, més apolar, i després el compost **2**, més polar.



c) L'espectre d'¹H-RMN del compost **1** mostra senyals típiques d'una cumarina 7-hidroxi substituïda a δ 7,63 ppm (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-4), 7,35 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-5), 6,85 (1H, dd, *J* = 8,6 i 2,2 Hz, H-6), 6,81 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-8) i 6,24 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-3). A més, s'hi observen ressonàncies de protó olefínic a 5,50 (1H, t, *J* = 3,3 Hz, H-6'), un grup metilè oxigenat a 3,87 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-11'a), 3,83 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-11'b) i un grup metí oxigenat a 3,47 (1H, s, H-3'). L'espectre de protó també mostra senyals de tres grups metils terciaris a 1,10 (3H, s, Me-13'), 1,10 (3H, s, Me-15'), 1,05 (3H, s, Me-14') i un metil secundari a 0,96 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, Me-12') (Xing *et al.*, 2017).

Apèndix exercici 13

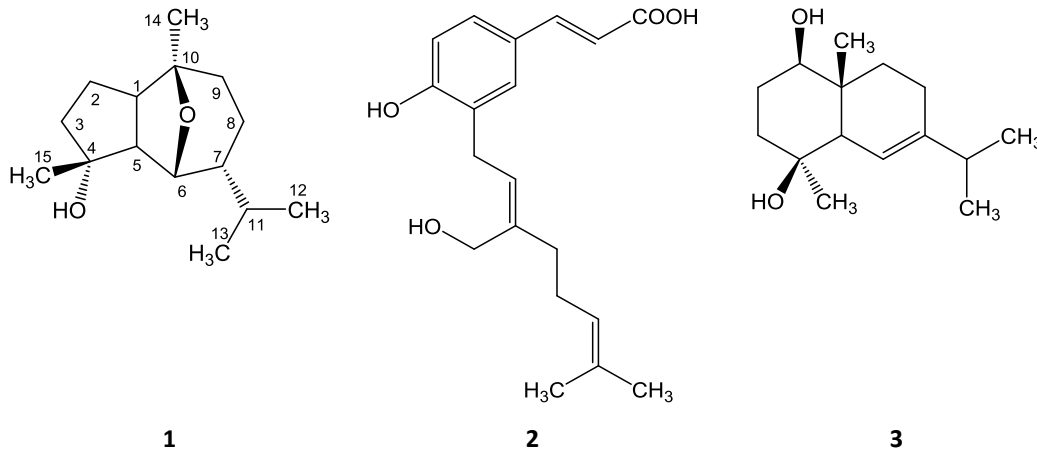
El gènere *Ferula*, pertanyent a la família Apiaceae, es troba àmpliament distribuït a l'Àsia central. Algunes espècies d'aquest gènere s'han utilitzat en medicina tradicional. La gomo-resina produïda per aquestes plantes, coneguda com "Awei" a la Xina, i més concretament, l'obtinguda de *F. sinkiangensis* K.M. Shen i *F. fukanensis* K.M. Shen, és inclosa en la farmacopea xinesa com a medicina tradicional. La investigació fitoquímica d'espècies del gènere *Ferula* ha revelat que cumarines sesquiterpèniques són els principis bioactius responsables de l'activitat antitumoral, antiinflamatòria i antibacteriana, entre d'altres.

Així, en l'aïllament bioguiat de l'extracte clorofòrmic de *F. sinkiangensis* efectiu com a inhibidor neuroinflamatori en cèl·lules de la micròglia estimulades per lipopolisacàrid, Xing i col·laboradors (2017) van identificar-hi setze cumarines sesquiterpèniques. D'aquestes, dues són noves en la natura (3'S,8'R,9'S,10'R)-sinkianol A (**1**) i (3'R,5'R,10'R)-sinkianol, i catorze prèviament descrites, la majoritària (3'S,5'S,8'R,9'S,10'R)-kellerina, (5'S,8'R,9'S,10'R)-ferukrinona, ferukrina (**2**), (3'S,5'S,8'R,9'S,10'R)-desacetilkellerina, farnesiferol A, farnesiferona A, gummosina, poliantinina, farnesiferol B, farnesiferol C, àcid galbànic, galbanat de metil, karatavicinol, i umbel·liprenina (**3**). El compost majoritari va inhibir l'expressió gènica de sintasa d'òxid nítric, ciclooxigenasa-2, i les citocines inflamatòries interleucina (IL)-1 β i IL-6, i el factor necrosis tumoral- α , en les cèl·lules de la micròglia.

D'acord amb Xing i col·laboradors (2017), l'extracció i aïllament es va fer de la manera següent: la gomo-resina dessecada de *F. sinkiangensis* es va extraure amb CHCl₃ a reflux. L'extracte clorofòrmic obtingut va ser concentrat i sotmès a CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₄/Me₂CO que va donar 10 fraccions (C1-10). A partir de la fracció C1 es va aïllar el compost **3** per recristal·lització després de purificar-lo per CC en gel de sílice. La fracció C2 es va fraccionar per CC de fase invertida C18 i es va purificar per CLAR semipreparativa per donar el compost **1**. La fracció C8 es va purificar en fase invertida C18 i donà el compost **2**.

Exercici 14

A partir de la summitat florida de l'espècie *Chrysothamnus viscidiflorus* var. *viscidiflorus* Nutt. (Asteraceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:



Indiqueu:

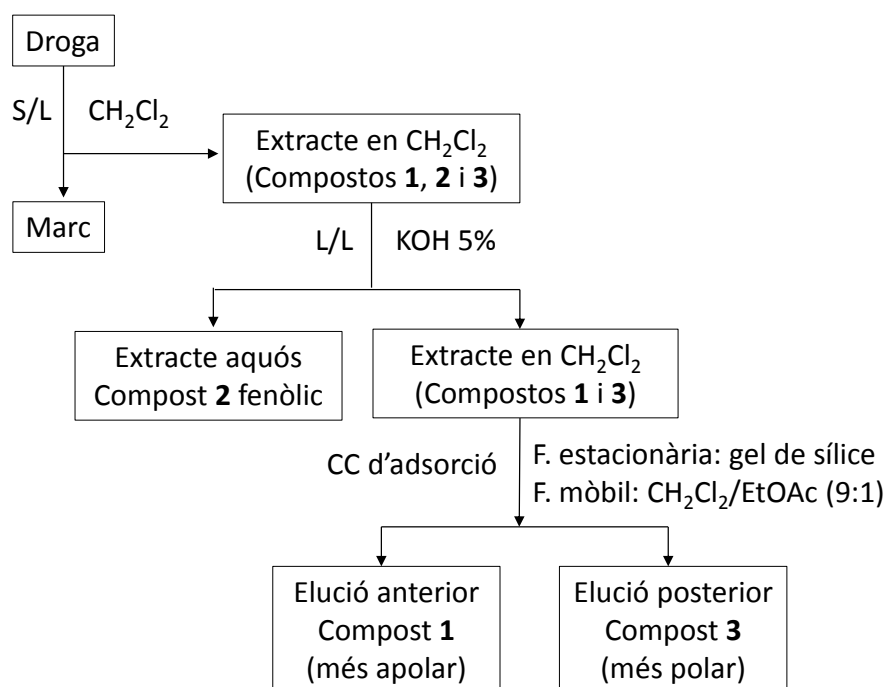
- El grup fitoquímic a què pertanyen aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN de la molècula **1**.

14. Resposta

a) Els tres compostos són terpènics. Els compostos **1** i **3** són sesquiterpens (quinze carbonis, i segueixen el patró isoprè o 2-metil-butadié) tricíclic i bicíclic, respectivament. El compost **2** és un compost terpenofenòlic, un àcid fenilpropanoide, més concretament un àcid hidroxicinàmic amb una cadena monoterpènica (deu carbonis). Biogenèticament, **1** i **3**

deriven de la via de l'àcid mevalònic, mentre que el fenilpropanoide deriva de la via de l'àcid shikímic i de la cadena terpènica de l'àcid mevalònic.

b) Els tres compostos tenen polaritat mitjana- baixa. L'ordre de polaritat és **1**, el compost més apolar; seguidament **3**, bicíclic amb dos hidroxils i lleugerament més polar; finalment, l'àcid hidroxicinàmic, el compost més polar. Els tres compostos s'extrauen amb diclorometà. Per purificació L/L amb KOH aquós, se separa el compost fenòlic. L'extracte diclorometànic es fracciona per CC en gel de sílice eluint amb diclorometà/acetat d'etil (9:1); primer el compost **1**, més apolar, i seguidament el compost **3**, més polar.



c) L'espectre d'¹H-RMN del compost **1** mostra un doblet ampli a δ 4,01 ppm (1H, $J = 4,0$ Hz, H-6), un multiplet a δ 2,32 assignable als dos protons H-1 i H-5, un doble triplet a δ 2,17 (1H, $J = 14,3, 9,5, 9,5$ Hz, H-3a). Addicionalment, un senyal corresponent a dos grups metils secundaris i degut a una unitat isopropil es troba a 0,97 (6H, $J = 7,0$ Hz, H-12 i H-13) i dos senyals de metils terciaris a δ 1,19 i 1,42 assignables a H-14 i H-15 respectivament (Ahmed *et al.*, 2006).

Apèndix exercici 14

Chrysothamnus viscidiflorus (Asteraceae) és un arbust comú i àmpliament distribuït en terrenys àrids interiors de l'oest de Nord-amèrica. Estudis fitoquímics previs han descrit la presència de flavonoides, àcids diterpènics, una acetofenona i derivats cromanona. En l'estudi realitzat per Ahmed i col·laboradors (2006) es va descriure l'aïllament i elucidació estructural d'un nou compost, crisotol, i d'altres ja descrits en la natura, però per primera vegada en aquesta espècie, i l'activitat antineoplàsica davant cèl·lules humanes de càncer de pulmó.

D'acord amb Ahmed i col·laboradors (2006), la summitat florida dessecada de *C. viscidiflorus* var. *viscidiflorus* es va extraure amb CH₂Cl₂/MeOH (1:1) i l'extracte obtingut concentrat es fracciona per CC en gel de sílice eluint amb C₆H₁₄, seguit per un gradient de C₆H₁₄/CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH fins 15% MeOH.

La fracció C₆H₁₄/CH₂Cl₂ (3:1) es va purificar per CC en gel de sílice amb mesclres C₆H₁₄/CH₂Cl₂/MeOH que donaren dues fraccions. La fracció eluïda amb C₆H₁₄/CH₂Cl₂/MeOH (7:4:0,5) es va purificar per CCP preparativa que va donar el compost **1**. Les fraccions eluïdes amb C₆H₁₄/CH₂Cl₂ (1:3) i 100% CH₂Cl₂ es van combinar i purificar per CC en gel de sílice amb C₆H₁₄/CH₂Cl₂/MeOH i van donar dues fraccions. Les fraccions eluïdes amb C₆H₁₄/CH₂Cl₂/MeOH (7:4:0,5) i (7:4:1) es van purificar per CCP preparativa que donà els compostos **2** i **3**, respectivament.

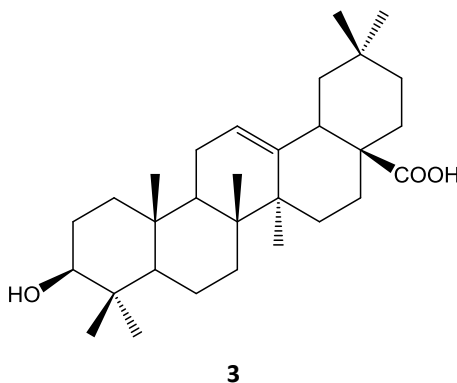
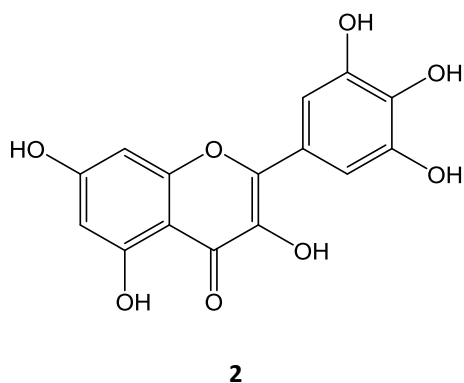
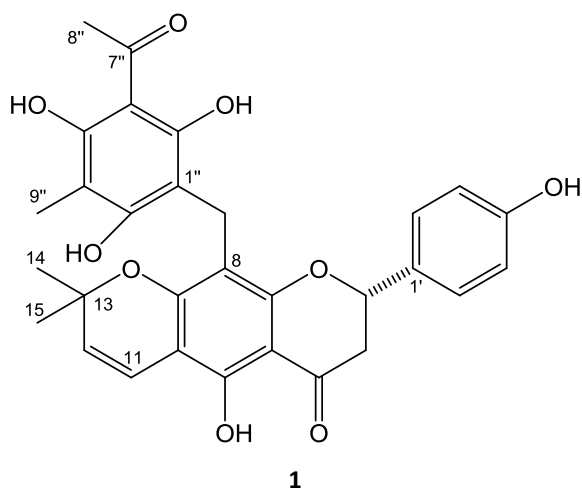
L'estructura del compost **1** va ser elucidada per les dades espectrals d'RMN mono i bidimensional, incloent-hi DEPT, COSY, NOESY, HMQC, HMBC i anàlisi de raigs X. El compost **1** respon a la fórmula molecular C₁₅H₂₆O₂, establerta per HRMS (*m/z* 239, [M+H]⁺). Les dades espectrals d'¹H- i ¹³C-NMR (Taula 1) en CDCl₃ van mostrar senyals d'un esquelet sesquiterpè guaianòlid. A més dels senyals d'¹H-RMN descrits abans, els altres protons van ser determinats per ¹H-¹H COSY (Taula 1). Les dades espectrals de ¹³C-RMN (Taula 2) van revelar quinze senyals de carboni que van ser resolts per DEPT en quatre metils, quatre metilens, cinc metins i dos carbonis quaternaris. S'hi van observar tres carbonis oxigenats a δ 75,9 ppm (d), 74,5 (s) i 74,4 (s) i altres dotze senyals s'assignen a carbonis alifàtics. Els altres protons i carbonis van ser determinats per HMQC i HMBC. El compost **1** es va identificar com a 6β,10β-epoxi-4-α-hidroxi-guaià, anomenat crisotol (Ahmed *et al.*, 2006).

Taula 1. Valors d'¹H- i ¹³C-RMN del compost **1** (500 MHz, δ ppm, en CDCl₃).

Posició	δ H	δ C
1	2,32 m	53,3
2	1,56 m; 1,54 m	23,9
3	2,17 dt (<i>J</i> = 14,3, 9,5, 9,5) 2,80 dd (<i>J</i> = 14,3)	48,2
4	-	74,5
5	2,32 m	68,2
6	4,01 d ample (<i>J</i> = 4,0)	75,9
7	1,39 m	38,5
8	1,80 m; 1,78 m	20,3
9	1,76 m; 1,74 m	37,5
10	-	74,4
11	1,72 m	32,6
12	0,97 d (<i>J</i> = 7,0)	21,1
13	0,97 d (<i>J</i> = 7,0)	21,1
14	1,19 s	21,9
15	1,42 s	25,8

Exercici 15

A partir dels fruits de l'espècie *Mallotus philippinensis* var. *pallidus* Airy Shaw (Lam.) (Euphorbiaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres compostos 4'-hidroxiisorottlerina (**1**), miricetina (**2**) i àcid oleanòlic (**3**):



Indiqueu:

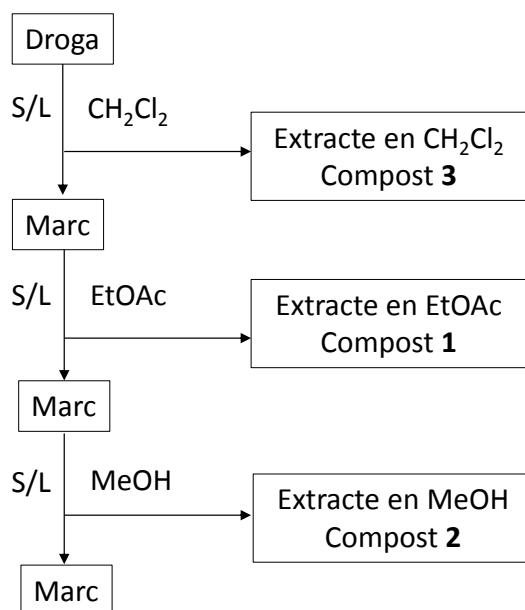
- El grup fitoquímic a què pertanyen aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **2**.

15. Resposta

a) Els compostos **1** i **2** són fenòlics tipus flavonoide. El compost **1** és una flavanona amb un anell pirànic extra degut a la ciclització entre l'hidroxil en C-7 i una cadena prenil al C-6 (cal dir que es tracta d'un esquelet 2-fenil-pirano-cromona). Així mateix, presenta un anell aromàtic amb un patró d'hidroxilació tipus floroglucinol sobre el C-8. El compost **2** és un flavonoide hexahidroxiilat, concretament 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavonol. Els compostos **1** i **2** són metabòlits mixtos derivats biogenèticament de la via de l'àcid shikímic i tres restes acetat. El compost **3** és un terpenoide, un àcid triterpènic pentacíclic (C-28) i oleanà perquè els metils 29 i 30 es troben en el C-20. Aquest metabòlit deriva de la via de l'àcid mevalònic.

b) El compost **3** és apolar i soluble en diclorometà, el compost **1** és un poc més polar i es podria extraure amb acetat d'etil, mentre que el compost **2**, el més polar dels tres, seria soluble en metanol (esquema). Una altra possibilitat seria que els compostos **1** i **2** foren solubles en acetat d'etil. Aleshores, l'extracte acetat d'etil es purificaria per CC en gel de

sílíce amb mesclades acetat d'etil/metanol (95:5), eluint en primer lloc el compost **1**, més apolar, i a continuació el compost **2**. També, a partir de l'extracte acetat d'etil es podrien separar els compostos **1** i **2** per CC de filtració en gel (Sephadex®LH-20), eluint amb metanol primer el compost **1**, més voluminos, i després el compost **2**, més menut.



c) L'espectre d'¹H-RMN del compost **2** mostra tres senyals de protons aromàtics corresponents a H-6 i H-8 de l'anell A que apareixen com dobles acoblats en *meta* a δ 6,18 ppm (1H, d, *J* = 1,83 Hz) i 6,37 (1H, d, *J* = 1,83 Hz), i un singlet a 7,34 que integra per dos protons equivalents, H2' i H6' de l'anell B (Bharadwaj *et al.*, 2015).

Apèndix exercici 15

Mallotus (Euphorbiaceae) és un gènere extens constituït per arbres i arbusts distribuïts majoritàriament per regions tropicals i subtropicals d'Àsia i Àfrica, amb unes vint espècies a l'Índia. En l'estat de Maharashtra (Índia), el gènere *Mallotus* està representat per cinc espècies, una de les quals és *Mallotus philippinensis*. En la superfície dels fruits se secreta un pigment roig anomenat *kamala*, utilitzat en medicina tradicional com a laxant, astringent i antihemorràgic, i per al tractament d'infeccions per paràsits per aplicació tòpica sobre la pell.

En estudis fitoquímics previs s'ha descrit la presència de triterpens, flavonoides i derivats de calcones dímeres. Entre aquestes últimes, hi destaca kamalacalcona E, obtinguda de l'extracte acetònic dels fruits, amb activitat antifúngica davant *Candida albicans*.

Continuant l'estudi de l'extracte metanòlic dels fruits d'aquesta planta, Bharadwaj i col·laboradors (2015) van aïllar tretze compostos i en van avaluar l'activitat antibacteriana davant *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Els compostos es van identificar per comparació amb les dades espectrals bibliogràfics i confirmats per CLAR-EM com 7,11-diceto-lanostan-3-ol (en forma d'acetat), lanost-8-en-3β-ol (en forma d'acetat), pregnenolona (en forma d'acetat), *trans*-calcona, kamalacalcona E, àcid oleanòlic, àcid gàl·lic, kaempferol, miricetina, 1-(5,7-dihidroxi-2,2,6-trimetil-2H-1-benzopirán-8-il)-3-fenil-2-propen-1-ona, 4'-hidroxi-isorottlerina, rottlerina, i àcid shikímic. Els compostos que van mostrar activitat davant *M. tuberculosis* van ser 4'-hidroxi-isorottlerina i rottlerina.

D'acord amb Bharadwaj i col·laboradors (2015), l'extracció i separació va ser de la manera següent: els fruits dessecats i polvoritzats es van macerar amb MeOH i per concentració en evaporador rotatiu s'obtingué un extracte roig marronós. Aquest extracte en MeOH es va separar per repetides CC en gel de sílice amb diferents sistemes d'elució i es va purificar per CCP preparativa. Així, l'extracte MeOH es va separar per CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₄/Me₂CO i se'n van obtenir 10 fraccions (M1-M10).

La fracció M6 es va sotmetre a CC eluint amb un gradient de CHCl₃/MeOH (98:2→80:20) que va donar 17 fraccions (M6a-M6q). Les fraccions M6a-M6c es van combinar i purificar per CC amb gradient de C₆H₁₄/Me₂CO (85:15→70:30) i van donar cinc fraccions (M6ac1-M6ac5). El compost **1** va precipitar en la fracció M6ac3. La fracció M7 es va purificar per CC amb un gradient de CHCl₃/MeOH (98:2→80:20) i va donar 12 fraccions (M7a–M7l). En la fracció M7i va precipitar un sòlid que es va dissoldre en EtOH i va cristal·litzar el compost **2**. Aquesta fracció M7i es va cromatografiar per CC amb gradient de CHCl₃/MeOH (98:2→80:20) i donà 10 fraccions (M7i6e1-M7i6e10). Les fraccions M7i6e3 a M7i6e7 es van combinar i purificar per CCP preparativa amb CHCl₃/MeOH (97:3); s'hi va aïllar el compost **3**.

A continuació es donen les dades de l'anàlisi espectral dels tres compostos aïllats (Bharadwaj *et al.*, 2015).

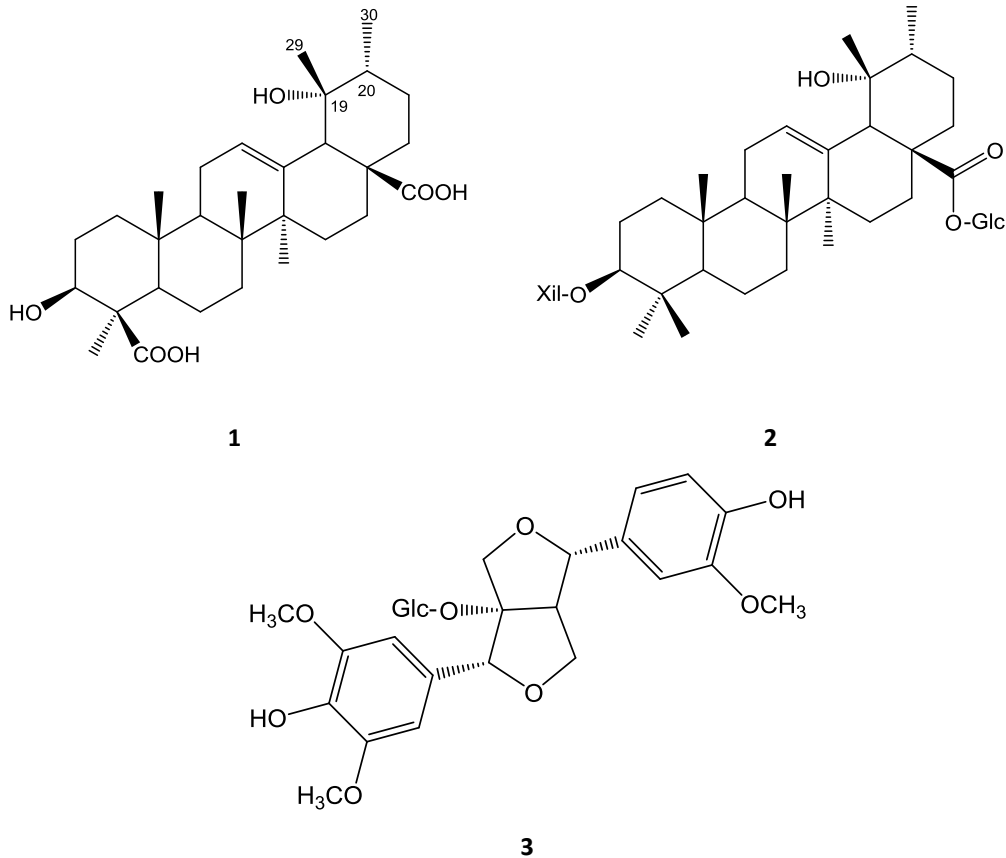
4'-Hidroxiisorotllerina (**1**) ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm) H 1,59 (3H, s, H-14), 1,63 (3H, s, H-15), 2,01 (3H, s, H-9''), 2,55 (3H, s, H-8''), 2,85 (1H, dd, *J* = 17,2 i 2,7 Hz, H-3a), 3,25 – 3,39 (1H, m, H-3b), 3,64 (2H, s, H-16), 5,48 (1H, dd, *J* = 13,0 i 2,3 Hz, H-2), 5,62 (1H, d, *J* = 9,9 Hz, H-12), 6,69 (1H, d, *J* = 10,9 Hz, H-11), 6,97 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3' i H-5'), 7,42 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2' i H-6'), 7,75 (1H, s, OH) 7,88 (1H, s, OH) 12,31 (1H, s, OH), 13,72 (1H, s, 5-OH); ¹³C-RMN (CDCl₃, 125 MHz, δ ppm) C 7,6 (C-9''), 16,6 (C-16), 27,8 (C-14), 27,9 (C-15), 33,1 (C-8''), 42,7 (C-3), 81,3 (C-2), 81,5 (C-13), 103,1 (C-6), 103,2 (C-5''), 104,1 (C-10), 104,6 (C-1'), 105,5 (C-3''), 106,1 (C-8), 115,6 (C-11), 116,0 (C-3', C5'), 126,4 (C-12), 127,9 (C), 129,0 (C-2', C-6'), 156,2 (C-5), 157,4 (C-2''), 157,5 (C-7), 158,0 (C-9), 159,7 (C-6''), 162,4 (C-4''), 196,2 (C-4), 204,0 (C-7''); LC-ESI-MS a *m/z* 533 [M + 1]⁺ (calculat per a C₃₀H₂₈O₉, 532).

Miricetina (**2**) ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) senyals prèviament descrits en la resposta de l'exercici; ¹³C-RMN (CD₃OD, 100 MHz) δC 94,3 (C-6), 99,2 (C-8), 104,5 (C-10), 108,5 (C-2', C-6'), 123,1 (C-1'), 136,9 (C-4'), 137,4 (C-3), 146,7 (C-3', C5'), 148,0 (C-2), 158,2 (C-9), 162,5 (C-5), 165,6 (C-7), 177,3 (C-4); LC-ESI-MS a *m/z* 319 [M + 1]⁺ (calculat per a C₁₅H₁₀O₈, 318).

Àcid oleanòlic (**3**) ¹H-RMN (C₅D₅N, 500 MHz) δH 0,91 (3H, s, H-25), 0,97 (3H, d, 6 Hz, H-30), 1,05 (3H, s, H-26), 1,08 (3H, s, H-24), 1,025 (3H, d, 6 Hz, H-29), 1,24 (3H, s, H-23), 1,27 (3H, s, H-27), 5,51 (1H, m, H-12); ¹³C-RMN (C₅D₅N, 125 MHz) δC 15,7 (C-25), 16,6 (C-24), 17,5 (C-29), 17,6 (C-26), 18,8 (C-6), 21,5 (C-30), 23,7 (C-11), 24,0 (C-27), 25,0 (C-16), 28,2 (C-2), 28,8 (C-15), 28,84 (C-23), 31,1 (C-21), 33,6 (C-7), 37,47 (C-10), 37,48 (C-22), 39,1 (C-1), 39,4 (C-20), 39,5 (C-19), 40,0 (C-8), 42,5 (C-14), 48,1 (C-9), 48,1 (C-17), 53,6 (C-18), 55,8 (C-5), 78,2 (C-3), 125,7 (C-12), 139,3 (C-13), 39,51 (C-4), 179,9 (C-28); LC-ESI-MS a *m/z* 479 [M + Na]⁺, *m/z* 495 [M + K]⁺ (calculat per a C₃₀H₄₈O₃, 456).

Exercici 16

A partir de les arrels de l'espècie *Ilex asprella* (Hook. & Arn.) Champ. ex Benth. (Aquifoliaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres compostos ilexgenina A (**1**), oblonganòsid H (**2**) i (+)-fraxinresinol-1-O- β -D-glucopiranosid (**3**):



Indiqueu:

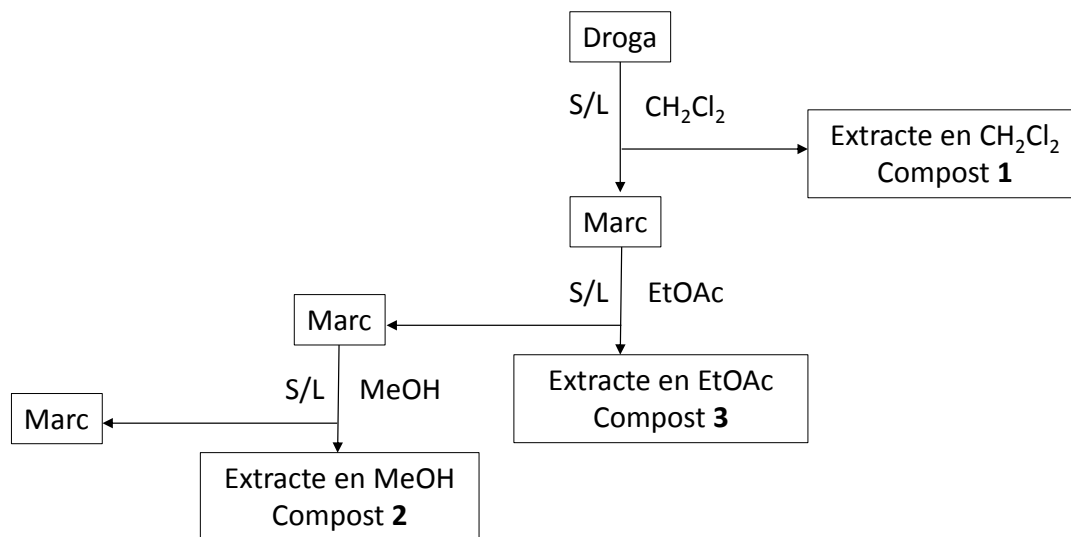
- El grup fitoquímic a què pertanyen aquests compostos i els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Dues reaccions de caracterització del compost **2**.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **2**.

16. Resposta

a) Els compostos **1** i **2** són dos triterpens pentacíclics amb esquelet ursà per la disposició dels metils, concretament els metils 29 i 30 sobre els C-19 i C-20, respectivament. Tanmateix, el compost **2** és una saponina triterpènica, en aquest cas un heteròsid bidesmosídic, atès que la genina està unida per dos posicions a sucres, mitjançant una unió tipus èter en l'hidroxil al C-3 amb una pentosa (xilosa), i una unió tipus èster entre el grup carboxil en posició 28 i una glucosa. Ambdós compostos deriven de la via de l'àcid mevalònic. El compost **3** és fenòlic, un lignà glucosilat, l'hidroxil al C-8 d'una unitat fenilpropanoide s'uneix per enllaç èter a una glucosa. Els lignans resulten de la dimerització d'una unitat fenilpropanoide i la unió, pels carbonis 8-8', dels radicals propílics; per tant, són derivats de la via de l'àcid shikímic.

b) El compost **1** és el més apolar, soluble en diclorometà, mentre que els heteròsids **2** i **3** són més polars. La droga s'extrau amb diclorometà; a continuació, el marc s'extrau amb acetat d'etil i se solubilitza el compost **3**; seguidament, el marc es tracta amb aigua per extraure'n

el compost **2**. Alternativament, després d'extraure la droga amb diclorometà, el marc es pot extraure amb metanol i l'extracte obtingut fraccionar-lo per CC en gel de sílice amb mescles acetat d'etil/metanol (95:5) eluint en primer lloc el compost **3**, més apolar, i a continuació, el compost **2**.



c) El compost **2** és un saponòsid que es caracteritza per ser hidrosoluble i pel seu poder afrogen, és a dir, la propietat de formar escuma persistent per agitació de les seues dissolucions aquoses. L'heteròsid **2** dona positiva la reacció de Molisch (α -naftol + àcid sulfúric) amb l'aparició del color morat degut a la presència de sucres.

d) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **2** mostra sis singlets de metil (δ 0,80, 0,81, 0,82, 1,04, 1,20, i 1,36 ppm corresponents a C-24, C-25, C-26, C-23, C-29 i C-27, respectivament), un doblet de metil a 0,91 (d, $J = 6,4$ Hz, Me-30), un protó olefínic a 5,29 (s ample, H-12), i dos protons anomèrics a 4,42 (d, $J = 7,6$ Hz) i 5,56 (d, $J = 8,4$ Hz) (Zhou *et al.*, 2012).

Apèndix exercici 16

Les arrels i fulles de l'arbust *Ilex asprella* (Aquifoliaceae) s'han utilitzat en medicina tradicional xinesa per al tractament d'infeccions virals i bacterianes com la influença, tonsil·litis, esofagitis, traqueïtis, entre d'altres. S'han descrit diferents triterpenoides en aquestes dues drogues. Continuant la recerca de compostos antivírics, Zhou i col·laboradors (2012) van descriure, a partir de les arrels, l'aïllament i identificació estructural de dues noves saponines triterpenoides que contenen sofre a la natura, anomenades asprellanòsids A i B, a més de deu compostos coneguts com són oblonganòsid I, ilexaponina B2, ziyu glicòsid I, oblonganòsid H, ilexaponina A1, ilexgenina A, ilexid I, (+)-1-hidroxipinoresinol-1-O- β -D-glucopiranòsid, (+)-fraxinresinol-1-O- β -D-glucopiranòsid, i (7S,8R)-dihidrodeshidroconiferil alcohol -9'- β -D-glucopiranòsid.

D'aquests, només asprellanòsid A i oblonganòsid H van mostrar activitat davant el virus de l'herpes simplex-1 *in vitro* sobre cèl·lules Vero (cèl·lules de renjó de mono verd africà) amb una concentració inhibidora total de 0,14 i 0,18 mM, respectivament. Aquests dos constituents es relacionen amb l'activitat de l'espècie.

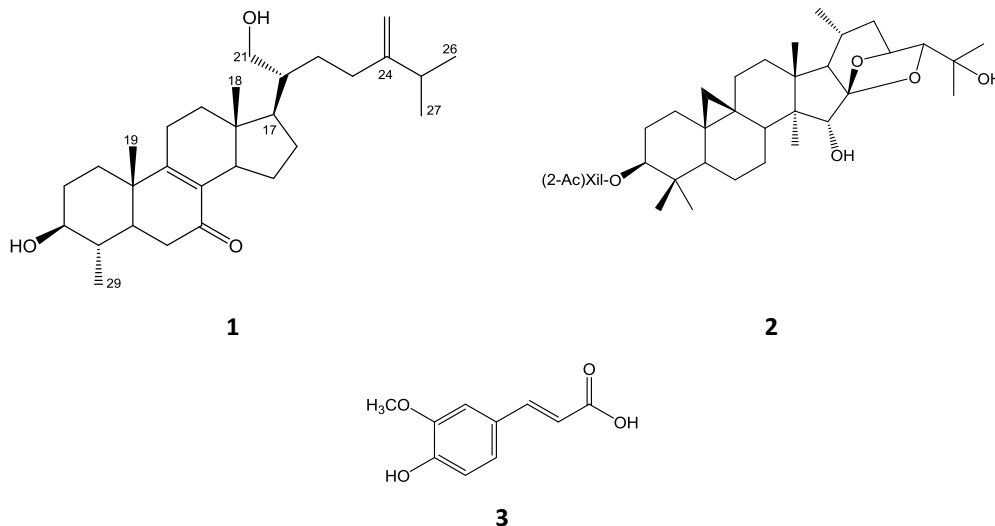
D'acord amb Zhou i col·laboradors (2012), l'extracció i aïllament va ser de la manera següent: les arrels dessecades i polvoritzades d'*I. asprella* van ser extretes amb MeOH a

reflux. L'extracte metanòlic obtingut es va fraccionar per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15:1→60:40:10) i se'n van obtenir cinc fraccions (M1-5). La fracció M1 es va purificar per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:0→80:20:2,5) i després per una resina de gel (MCI-gel CHP20P®) eluint amb un gradient de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:95→20:80) i Sephadex®LH-20 amb $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:95→10:90) que va donar el compost **2**. La fracció M2 es va purificar per CC en gel de sílice eluint amb $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15:1→75:25:5) i en fase invertida C18 eluint amb mescleres $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (55:45 i 60:40) i Sephadex®LH-20 amb $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (15:85 i 20:80) la qual cosa va donar els compostos **1** i **3**, a més d'altres.

A més dels senyals de l'espectre d' ^1H -RMN descrites abans per al compost **2**, els espectres ^{13}C -RMN i DEPT van mostrar quaranta-un senyals de carboni, incloent-hi trenta ressonàncies assignables a un esquelet triterpè i els altres senyals de carboni atribuïbles a una unitat d'hexosa i una de pentosa. Les correlacions HMBC (de l'anglès *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, que dona les correlacions entre carbonis i protons a llarga distància, es a dir, separats per dos, tres, i, de vegades en sistemes conjugats, quatre enllaços) de l'H-1' de xilosa (δ 4,42) amb δ C 90,8 ppm (C-3 de la genina), i H-1'' de glucosa (δ 5,56) amb δ C 178,6 (C-28 de la genina) van confirmar que les unitats de xilosa i glucosa es trobaven sobre C-3 i C-28, respectivament.

Exercici 17

A partir de les parts aèries de *Cimicifuga foetida* L. (Ranunculaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos següents:



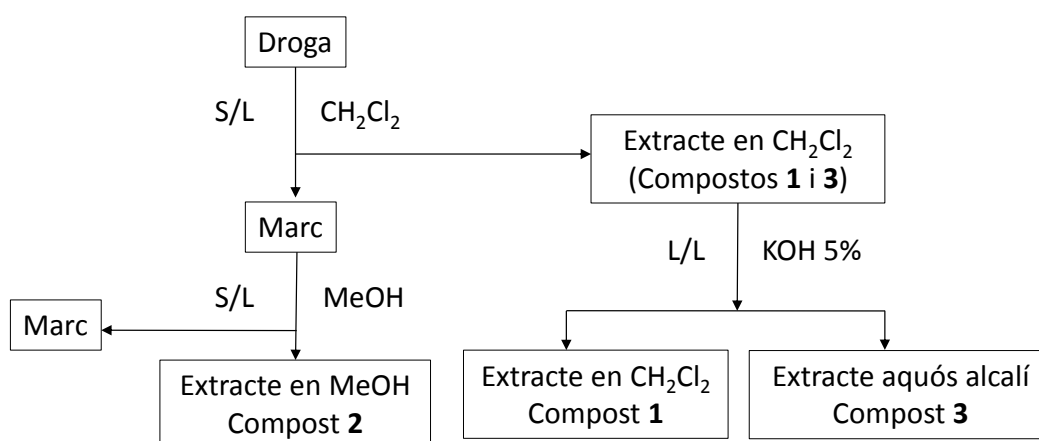
Indiqueu:

- Grup fitoquímic i precursors biogenètics dels tres compostos.
- Mètode d'extracció i separació dels tres metabòlits a partir de la droga.
- Reacció de caracterització del compost **1**.
- Tres senyals que apareixerien en l'espectre de ^1H -RMN de la molècula **3**.

17. Resposta

a) El compost **1** és un 3,21-dihidroxi-7-oxo esteroide. El compost **2** és un heteròsid triterpènic tetracíclic tipus cicloartà, que presenta un ciclopropà entre els C-9 i C-10 i dos anells resultat de la ciclització de la cadena lateral, un pirà i un altre dioxolà que comparteixen dos carbonis. Els dos compostos són terpènics i deriven biogenèticament de la via de l'àcid mevalònic. A diferència d'aquests, el compost **3** és fenòlic, un àcid fenilpropanoide hidroxilat al C-4' i metoxilatal C-3', concretament l'àcid ferúlic, derivat de la via de l'àcid shikímic.

b) L'esteroide i el compost fenòlic són solubles en diclorometà mentre que l'heteròsid triterpènic es pot solubilitzar amb metanol. La droga s'extrau amb diclorometà i després l'extracte diclorometànic es purifica L/L amb una solució aquosa d'un hidròxid alcalí en què se solubilitzarà el compost fenòlic, encara que, com que el compost **3** conté un grup àcid carboxílic, seria suficient alcalinitzaramb carbonat o bicarbonat sòdic. A continuació, el marc s'extrau amb metanol.



c) La reacció de Liebermann, consistent a afegir anhídrid acètic i àcid sulfúric, i permet caracteritzar l'esquelet esteroide per l'aparició d'una coloració verd blavosa.

d) L'espectre d'¹H-RMN de la molècula **3** mostra tres senyals de protons aromàtics corresponents a H-2' (d, J = 2,0 Hz), H-5' (d, J = 7,0 Hz), i H-6' (dd, J = 2,0 i 7,0 Hz), i indica la presència d'un anell fenòlic 1,3,4-trisubstituit. A més, s'hi observa la presència de dos protons *trans*-olefínics a ca. 6'5 ppm (1H, d, J = 16,2 Hz, H-3) i 7'5 (1H, d, J = 16,2 Hz, H-2). Un singlet a ca. 3'8 ppm que integra per 3H s'assigna al grup metoxil unit al C-3'.

Apèndix exercici 17

El gènere *Cimicifuga* (anomenat també *Actaea*) pertanyent a la família Ranunculaceae, comprén vint-i-vuit espècies distribuïdes per l'est d'Àsia, Europa i Nord-amèrica, les arrels de les quals s'han utilitzat en medicina tradicional per tot el món. Entre aquestes espècies, *C. dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. heracleifolia* Kom., i *C. foetida* L. han sigut oficialment llistades en la farmacopea xinesa, i *C. simplex* (DC.) Wormsk. ex Prantl en la farmacopea japonesa com les plantes originals de rizoma de *Cimicifuga* al Japó. El rizoma de *Cimicifuga* ha sigut usat durant molt de temps en els països de l'est asiàtic per a tractar el mal de cap, dentàlgia,

afta, edema i mal de gola, xarampió, i prolapse d'úter. A Europa i als Estats Units, *C. racemosa* (L.) Nutt., comunament anomenada cimicifuga o *black cohosh*, és ben coneguda com a suplement dietètic per a millorar la salut de les dones i alleujar el dolor menstrual i la síndrome menopàusica (Nian *et al.*, 2012).

Els constituents de les espècies de *Cimicifuga* han estat extensament investigats, incloent-hi entre els principals metabòlits secundaris heteròsids triterpènics 9,19-ciclolanostans, derivats fenòlics, esterols, alcaloides i cromones. És interessant que entre aquests tipus de compostos, els heteròsids triterpènics 9,19-ciclolanostans són considerats característics del gènere *Cimicifuga*, que posseeix efectes de tipus estrogènic i activitats immunosupressores (Wu *et al.*, 2015). Més concretament, a partir de l'espècie *C. simplex* s'han aïllat més de cent-vint heteròsids triterpènics cicloartans.

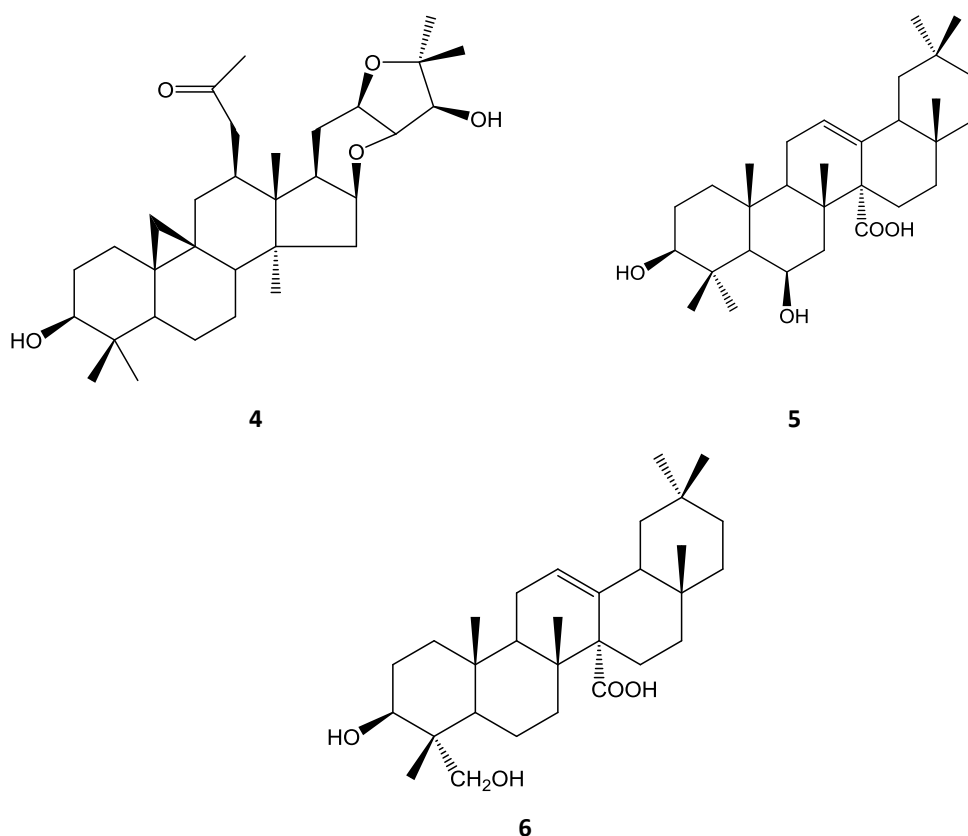
Històricament, el material vegetal (arrels i rizomes) prové de la recol·lecció de la planta sencera, principalment salvatge, fet que preocupa per la possible extinció de la població silvestre d'aquesta planta. Així doncs, l'ús de les parts aèries podria alleujar aquest problema i servir d'alternativa com a font renovable del suplement dietètic perquè les parts aèries poden ser recol·lectades sense el sacrifici de la planta perenne sencera.

S'han realitzat diversos estudis sobre l'equivalència fitoquímica de les parts aèries d'algunes espècies de *Cimicifuga*, per exemple de *C. racemosa*, relativa a les arrels i als rizomes. S'ha descrit que els principals constituents, els triterpens cicloartans, també es troben en les parts aèries, encara que en concentracions més baixes que en les arrels i rizomes (10,5% i 23,5% en els extractes hidrometanòlics al 70%, respectivament) (Imai *et al.*, 2016).

A partir de les parts aèries de *C. foetida*, es va aïllar per primera vegada un inusual 4 α -metil esterol, cimisterol A (**1**), però prèviament aïllat en altres espècies del gènere *Cimicifuga*. També es van aïllar cinc altres compostos coneguts, cimicifoetisid A (**2**), àcid ferulic (**3**), 12 β -*O*-acetilcimiciracemonol (**4**), àcid 3 β ,6 β -dihidroxiolean-12-en-27-oic (**5**) i acerifillic A (**6**), dels quals **5** i **6** van ser aïllats d'aquesta espècie també per primera vegada. A continuació es descriuen detalladament l'aïllament, elucidació estructural i activitats biològiques d'aquests compostos.

D'acord amb Nian i col·laboradors (2012), les parts aèries polvoritzades i dessecades de *C. foetida* van ser extretes en MeOH a temperatura ambient i el residu obtingut després d'evaporació a buit va ser suspès en aigua i extret successivament amb C₆H₁₄, EtOAc i *n*-BuOH. L'extracte EtOAc es va cromatografiar sobre gel de sílice (CHCl₃/MeOH, 1:0→0:1) i va donar quatre fraccions. La fracció E2 va ser sotmesa a repètedes CC (SiO₂; CHCl₃/Me₂CO, 20:1→10:1; seguit de fase invertida C18, MeOH/H₂O, 60:40→100:0) que va donar cinc fraccions (E2.1-2.5). La fracció E2.3 va ser sotmesa a CC (SiO₂; CHCl₃/Me₂CO, 20:1) i va donar els compostos **1**, **3** i **4**, que van ser purificats per filtració en gel (Sephadex®LH-20; MeOH). Els compostos **2**, **5**, i **6** van ser obtinguts de la fracció E2.2 per CC en gel de sílice eluint amb CHCl₃/Me₂CO (10:1), seguida per Sephadex®LH-20 amb MeOH.

Figura 1. Estructures químiques de la resta dels compostos aïllats de les parts aèries de *C. foetida*.



La fórmula molecular deduïda per acimisterol A (**1**) va ser $C_{29}H_{46}O_3$. L'assignació de les dades espectroscòpiques d' 1H - i ^{13}C -RMN (Taula 1) es basen en els espectres HSQC, HMBC, i 1H - 1H COSY. En l'espectre d' 1H -RMN es van observar els senyals deguts a dos grups metil terciaris a δ 0,72 i 1,12 ppm; un grup metil secundari a 1,13 (doblet ample, $J = 5,5$ Hz); protons d'un metilè olefínic terminal a 4,88 (1H, singlet ample) i 4,85 (1H, singlet ample), i un grup isopropil a 1,02 i 1,04 (3H cadascun, doblets amples, $J = 4,5$ Hz), i a 2,28 (1H, m). Els espectres de ^{13}C -RMN i DEPT van indicar vint-i-nou àtoms de carboni, dos grups metil terciaris, tres metil secundaris i sis metins. S'hi van observar senyals assignables a un grup hidroximetil a δ 74,6 ppm (C-3), un grup hidroximetilè a 62,1 (C-21), un grup metilè terminal a 106,6 (C-28), i 156,9 (C-24), i una cetona α,β -insaturada a 132,9 (C-8), 165,4 (C-9), i 198,4 (C-7). Tots aquests senyals van evidenciar que **1** és un esteroide tipus ergostà. En l'espectre HMBC es van observar correlacions entre el senyal de protó a 2,37 i el carboni quaternari a 42,7 (C-13), el grup metilè a 25,6 (C-15), i el carboni olefínic a 132,9 (C-8). En l'espectre 1H - 1H COSY es van confirmar les correlacions entre el senyal H-14 a 2,37 i el senyal H-15 a 1,68 i 2,88. El grup hidroxil es va assignar a la posició C-21 basant-se en les correlacions HMBC i 1H - 1H COSY dels senyals de l'hidroximetilè a 4,08 doblet ample ($J = 11,5$ Hz) i 3,95 doble doblet ($J = 5,0$ i 12,3 Hz) amb C-20 i H-20 a 43,7 i 1,48 (m), respectivament. En l'espectre ROESY, H-3 i Me-29 es van correlacionar amb H-5 (biogenèticament orientat en α), mentre que H-14 mostrà correlació amb H-5 i H-17. Basant-se en aquestes observacions, H-3, H-14, H-17 i Me-29 es van assignar amb orientació en α . El compost **1** es va identificar com 3 β ,21-dihidroxi-4 α -metil-5 α ,14 α -ergosta-8,24(28)-dien-7-ona.

Taula 1. Dades espectroscòpiques de ^1H - i ^{13}C -RMN de cimisterol A en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

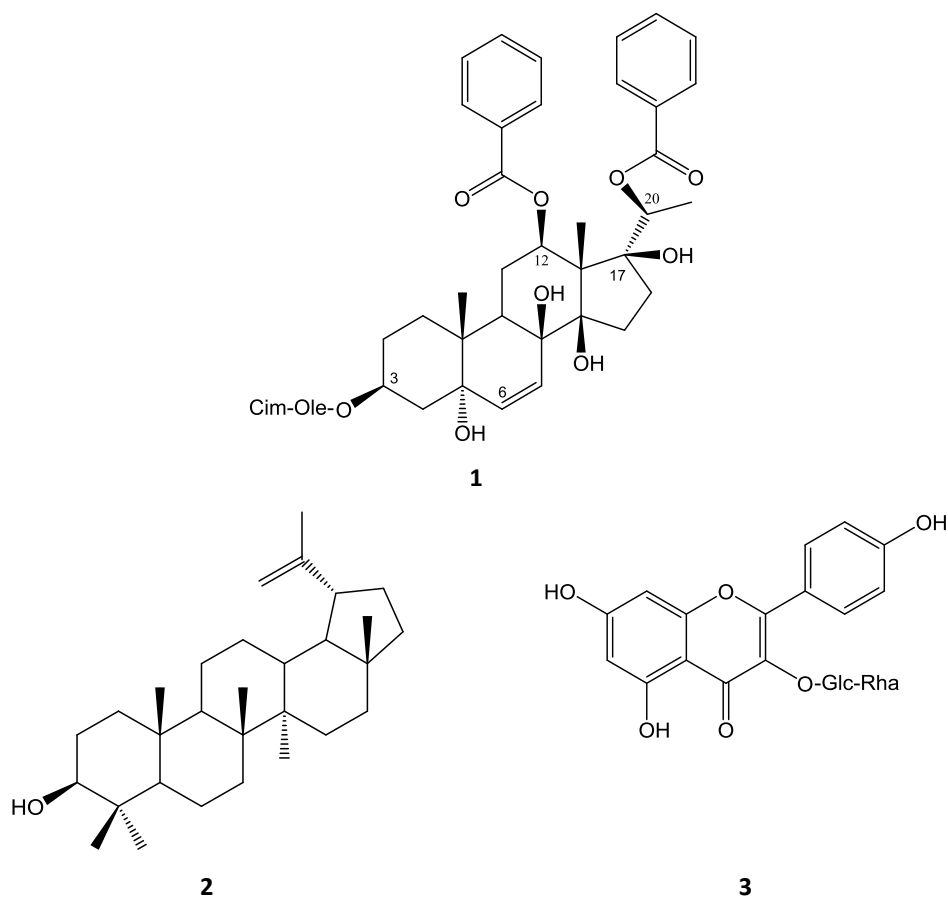
Posició	δH mult.	δC mult.	Posició	δH mult.	δC mult.
1	1,70 m 1,26 m	34,7 t	16	1,88 m 1,80a	28,9 t
2	2,05 m 1,50 m	29,1 t	17	1,79 d ample (11,5)	48,7 d
3	3,25 m	74,6 d	18	0,72 s	11,9 q
4	1,62 m	39,9 d	19	1,12 s	18,2 q
5	1,48 m	47,2 d	20	1,48 m	43,7 d
6	2,64 dd (4,5 i 15,5) 2,30 m	39,6 t	21	4,08 d ample (11,5) 3,95 dd (5,0 i 12,3)	62,1 t
7		198,4 s	22	2,05 m 1,76 ^a	31,7 t
8		132,9 s	23	2,22 d ample (12,0) 1,62 m	35,7 t
9		165,4 s	24		156,9 s
10		39,0 s	25	2,28 m	34,1 d
11	2,35 m	25,6 t	26	1,02 d ample (4,5) 2,24 m	22,0 q
12	2,35 m	31,8 t	27	1,04 d ample (4,5) 2,18 m	22,1 q
13		42,7 s	28	4,88 s ample 4,85 s ample	106,6 t
14	2,37 m	48,9 d	29	1,13 d ample (5,5)	15,0 q
15	2,88 m 1,68 m	25,6 t			

Desplaçaments químics en δ amb valors de J en parèntesis. ^aSenyals superposades.

El compost **1** va exhibir l'activitat citotòxica més potent, inclús més que el control positiu cisplatí, davant les línies cel·lulars humanes Jurkat, K562, U937, HepG-2, i SGC-7091, amb valors de concentració inhibidora 50 de 2,89, 6,88, 3,38, 4,21, i 4,89 μM , respectivament.

Exercici 18

A partir de l'espècie *Cynanchum marnierianum* Rauh (Apocynaceae) s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:



Indiqueu:

- El grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels metabòlits.
- Dues reaccions de caracterització del compost **1**.
- Alguns senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **1**.

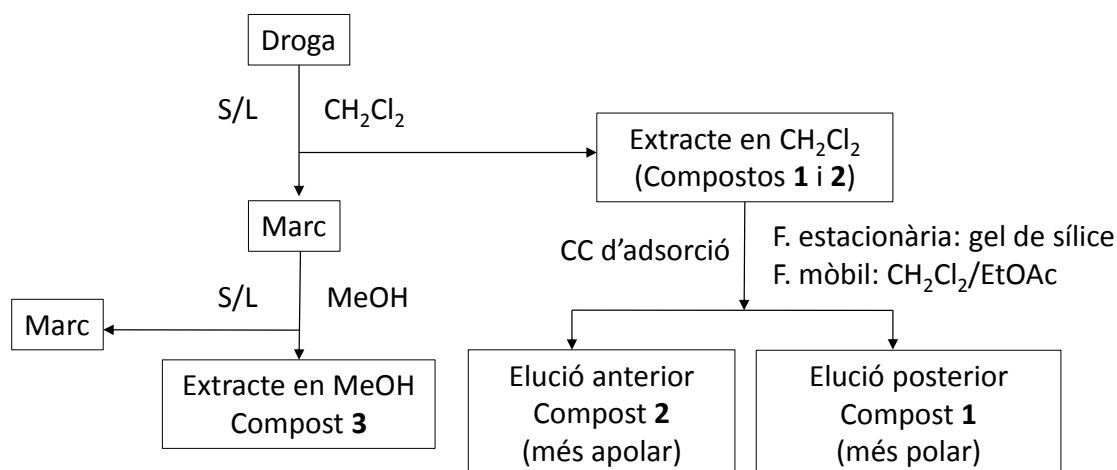
18. Resposta

a) Els compostos **1** i **2** son terpenoides, amb un origen biogenètic inicial comú. El compost **1** presenta un esquelet bàsic esteroide tipus pregnà, amb una insaturació al C-6 i heptahidroxilat als C-3, C-5, C-8, C-12, C-14, C-17 i C-20, tres de les quals (C-3, C-12 i C-20) es troben substituïdes. Concretament, els hidroxils als C-12 i C-20 estan esterificats amb un benzoïl cadascun, mentre que l'hidroxil al C-3 està esterificat amb una cadena de dos 2,6-didesoxihexoses metoxilades en posició 3. El compost **2** és un triterpè pentacíclic tipus lupà. Biogenèticament, els compostos **1** i **2** provenen del 2,3-epoxi-esqualè, a partir del qual es formen els diferents esquelets esteroide i triterpènic, respectivament. A més, el compost **1** presenta dos anells benzènics que deriven de la via de l'àcid shikímic.

El compost **3** és un flavonoide glicosilat. Presenta una insaturació al C-2 i un hidroxil al C-3 substituït per un disacàrid, per la qual cosa es tracta d'un *O*-heteròsid de flavonol. El

compost **3** és un metabòlit mixt, una part de la molècula deriva biogenèticament de la via de l'àcid shikímic mentre que l'altra part deriva de la ciclització de tres restes d'acetat.

b) En general, els esteroides i triterpens són compostos solubles en dissolvents orgànics de baixa a mitjana polaritat, com ocorre per al compost **2**. El compost **1** es troba glicosilat, cosa que li confereix polaritat a la molècula, però el fet de presentar dos grups hidroxil esterificats amb benzoil potser que siga soluble en diclorometà. El compost **3** és també un heteròsid, però de genina flavonoide, polar. Un possible mètode d'extracció consisteix a extraure'n la droga amb diclorometà i en l'extracte obtingut se solubilitzen **1** i **2**. El marc s'extrau amb metanol per a solubilitzar el compost **3**.



c) La genina esteroide del compost **2** donarà positiva en la reacció de Liebermann (anhídrid acètic i àcid sulfúric) amb l'aparició del color verd blavós, a més de diferenciar-ho de la triterpènica (color roig rosaci). El disacàrid es caracteritza mitjançant la reacció de Keller-Killiani, específica de 2-desoxisucres, consistent en l'addició d'àcid sulfúric a una solució acètica de l'heteròsid en presència d'una sal fèrrica que dona un anell marró rogenc en la solució acètica, que s'acolorix de blau verdós.

d) L'espectre d'¹H-RMN de la molècula **1** mostra senyals de protons aromàtics corresponents als anells monosubstituïts dels benzoïls, a més de dos senyals de protons *cis*-olefínics que s'atribueixen als metins a δ 5'55 ppm (1H, d, J = 10,3 Hz, H-6) i 5'83 (1H, d, J = 10,3 Hz, H-7). També s'hi observa la presència de dos metils terciaris, singlets cadascun a 1,68 (3H, H-18) i 0,99 (3H, H-19), un metil secundari a 1,29 (3H, doblet, J = 6 Hz, H-21), tots tres corresponents a la genina. A més, dos metils secundaris a 1,27 (3H, doblet, J = 6 Hz, H-6') i 1,31 (3H, doblet, J = 6 Hz, H-6'') atribuïbles als 2,6-didesoxisucres. Addicionalment, hi apareixen dos singlets a 3'41 i 3,43 que integren per 3H cadascun i s'assignen als grups metoxil units als C-3 dels sucres (Tsoukalas *et al.*, 2016).

Apèndix exercici 18

Cynanchum marnierianum és una espècie endèmica de Madagascar pertanyent a la família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae. Aquesta planta es troba filogenèticament relacionada amb *Hoodia gordonii* (Masson) Sweet ex Decne., una apocinàcia espinosa crassa del sud d'Àfrica, consumida popularment per a llevar les ganes de menjar i els seus efectes

hipoglucèmics, i per tant extensament profitosa en el desenvolupament de suplementes dietètics antiobesitat.

Recentment, s'han descrit extractes de plantes amb principis hipoglucèmics donat el fet que estimulen la secreció del pèptid semblant al glucagó tipus 1 (GPL-1), una hormona alliberada ràpidament a l'intestí en resposta a la ingestió d'aliments, per a induir la secreció d'insulina i inhibir la producció de glucagó. A més d'un efecte hipoglucèmic, GPL-1 incrementa la sensació de sacietat en el cervell i retarda el buidament gàstric, ajudant així a reduir la glucèmia postpandrial. S'ha descrit que la secreció de GPL-1 es troba reduïda en pacients de diabetis tipus 2. GPL-1 s'ha convertit gradualment en una diana terapèutica per al desenvolupament de nous fàrmacs per a tractar la diabetis tipus 2. Així, dos estratègies terapèutiques per al tractament d'aquesta malaltia, relacionades amb la via GPL-1 són la injecció d'agonistes del receptor de GPL-1 o augmentar la semivida de GPL-1 per inhibició de l'enzim dipeptidil peptidasa-4 (DDP-4), responsable de la seua inactivació. Una altra estratègia prometedora podria ser l'ús de secretagogs selectius que puguen restaurar la producció de GPL-1 i així regular la glicèmia postpandrial. En aquest sentit, cal indicar que alguns extractes de plantes podrien proporcionar productes naturals potencialment útils en aquest nou abordatge terapèutic.

Continuant la recerca de secretagogs GPL-1 d'origen vegetal, Tsoukalas i col·laboradors (2016) van avaluar diferents espècies de la subfamília Asclepiadoideae i van demostrar que l'extracte etanòlic de les parts aèries de *C. marnierianum* estimulava significativament la secreció de GLP-1 de forma dosi-dependent en la línia de cèl·lules tumorals de secretosoma (STC-1). El fraccionament bioguiat de l'extracte va resultar en l'aïllament i identificació de dos pregnans glicosilats nous en la natura, anomenats marnieranòsids A (**1**) i B, i dos compostos coneguts, lupeol (**2**) i kaempferol-3-O-neohesperidòsid (**3**), la qual cosa suggeria que l'espècie *C. marnierianum* podria ser interessant per al tractament de diabetis tipus 2 i que els derivats pregnans serien responsables en part de l'estimulació de la secreció de GPL-1.

D'acord amb Tsoukalas i col·laboradors (2016), l'extracció i aïllament dels compostos es va realitzar de la manera següent: les parts aèries trossejades i dessecades de *C. marnierianum* van ser macerades amb EtOH i l'extracte obtingut es va fraccionar L/L amb C₆H₁₂-H₂O (1:1), que donà una fase orgànica, una aquosa i un precipitat. La fase orgànica va ser fraccionada per extracció en fase sòlida amb cartutxos de gel de sílice eluint amb dissolvents de polaritat creixent, començant amb C₆H₁₂ i finalitzant amb MeOH. La fracció eluïda amb C₆H₁₂-Et₂O (92:8) va ser sotmesa a cromatografia de partició centrífuga (CPC) utilitzant el sistema bifàsic ternari C₇H₁₆-MeCN-MeOH (5:5:3). Les quaranta-tres fraccions recol·lectades van ser analitzades per CLAR amb detector UV, i de la fracció eluïda a 90 min s'aïllà el compost **2**. Seguint el mateix procediment, de la fracció eluïda amb EtOAc, fraccionada per CPC amb C₆H₁₂-EtOAc-MeOH-H₂O (6:5:6:5) i analitzada per CLAR, es va aïllar en la fracció eluïda a 70 min el compost **1**. El precipitat inicial es va dissoldre amb MeOH i fraccionat per filtració en gel (Sephadex® LH-20), de manera que es va aïllar en la última fracció el compost **3**.

Les estructures dels nous compostos van ser elucidades en base a les dades espectroscòpiques i van ser establertes com: 12β,20S-O-dibenzoil-pregn-6-en-5α,8β,14β,17β-tetraol-3-O-β-D-oleandropiranosil-(1→4)-β-D-cimaropiranòsid (**1**, marnieranòsid A) i 12β,20R-O-dibenzoil-pregn-6-en-5α,8β,14β-triol-3-O-β-D-oleandropiranosil-(1→4)-β-D-canaropiranosil-(1→4)-β-D-cimaropiranòsid (marnieranòsid B). Aquests compostos presenten analogies estructurals amb compostos aïllats d'espècies

d'Asclepiadoideae descrits com a supressors de l'apetit i antihiperoglucèmics. Les estructures del compost **2** (lupeol) i el compost **3** (kaempferol-3-*O*-neohesperidòsid) van ser confirmades per comparació de les dades espectrals amb estàndards prèviament publicats. Aquests dos últims compostos han estat descrits com potencials antidiabètics. Lupeol és un inhibidor de DDP-4 i incrementa la semivida de GLP-1 en plasma (Saleem *et al.*, 2014), mentre que el flavonoide va mostrar efectes semblants a la insulina *in vitro* (Yamasaki *et al.*, 2010).

Respecte a la complexa elucidació estructural del compost **1**, després de l'anàlisi de les dades se li va assignar la fórmula molecular C₄₉H₆₆O₁₅. Els espectres de ¹³C-RMN i DEPT van indicar quaranta-nou senyals de carboni, que inclouen deu carbonis quaternaris, vuit metilens, vint-i-quatre metins, i set metils (Taula 1). Les ressonàncies de vint-i-un d'aquests carbonis van ser atribuïdes a l'esquelet pregnà en base a les correlacions observades en els espectres COSY, HSQC, i HMBC, així com per comparació amb les dades d'RMN de compostos relacionats prèviament publicats. Els dos protons *cis*-olefínics a 5,55 (d, *J* = 10,3 Hz) i 5,83 (d, *J* = 10,3 Hz) van ser atribuïts als metins en posicions 6 i 7, per les correlacions d'HMBC als carbonis oxigenats a C-8 (δ 74,8) i C-5 (δ 76,1), respectivament. L'esquelet pregnà del compost **1** consisteix en un 5α,8β,12β,14β,17β,20β-hexahidroxipregn-6-en, prèviament descrit en els gèneres *Araujia*, *Caralluma*, *Gymnema*, *Stephanotis* de la subfamília Asclepiadoideae. Senyals addicionals observades en l'espectre ¹H-RMN van indicar la presència de dos agrupaments aromàtics, per les ressonàncies atribuïdes a un sistema (AB)2X amb deu protons aromàtics, indicant-hi l'existència de dos anells aromàtics monosubstituïts. A més, els dos protons anomèrics podien observar-se en l'espectre d'¹H-RMN ressonant a 4,65 (dd, *J* = 9,6 i 1,9 Hz) i 4,70 (dd, *J* = 9,6 i 1,7 Hz). L'espectre ¹H-¹H COSY, ROESY i les correlacions HMBC van permetre la identificació de la cadena de sucres composta per dos 2,6-didesoxihexoses, cadascuna amb un grup metoxi en la posició 3. Per a les assignacions de la resta dels senyals es pot consultar Tsoukalas i col·laboradors (2016).

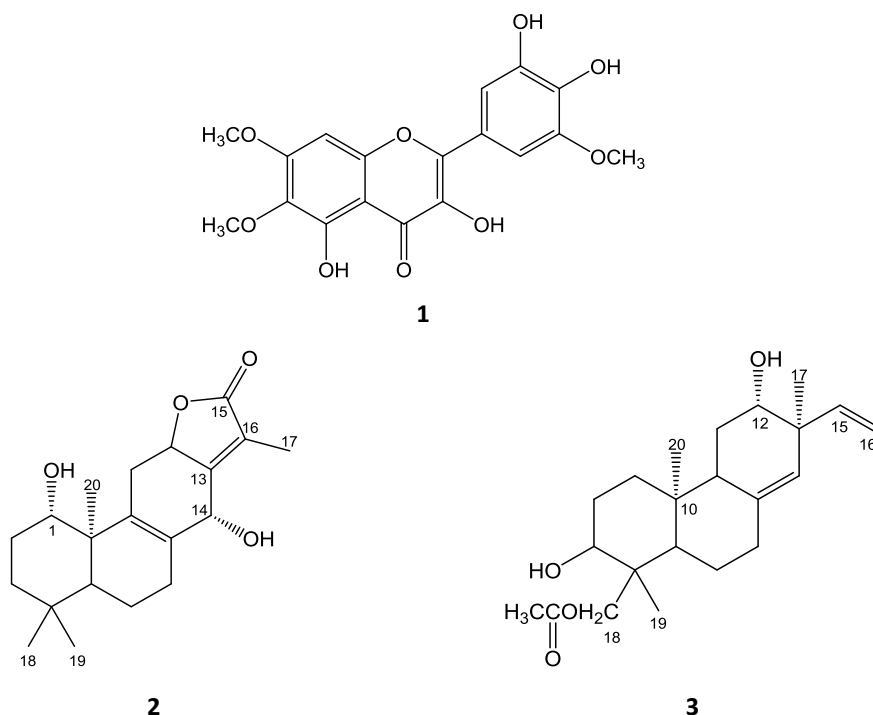
Taula 1. Dades d'¹H-RMN (500 MHz) i ¹³C-RMN (125 MHz) del marnieranòsid A en CD₃OD.

Marnieranòsid A (1)		
Posició	δH (<i>J</i> in Hz)	δC
1	1,78 m / 1,42 m	28,0
2	1,85 m / 1,67 m	27,0
3	4,11 m	75,9
4	1,99 m / 1,76 m	39,4
5	-	76,1
6	5,55 d (10,3)	136,5
7	5,83 d (10,3)	127,6
8	-	74,8
9	1,98 m	37,1
10	-	40,1
11	2,00 m / 1,71 m	24,1
12	5,01 dd (10,2 i 4,3)	76,8
13	-	59,1
14	-	88,9

15	1,93 m / 1,85 m	33,5
16	2,10 m / 1,98 m	35,0
17	-	88,8
18	1,68 s	12,4
19	0,99 s	21,3
20	4,84 q (6,0)	75,7
21	1,29 d (6,0)	15,6
12-O-benzoil		
1*	-	166,7
2*	-	131,7
3*/7*	7,60, dd (7,8 i 1,5)	130,9
4*/6*	7,32 senyals superposades	129,3
5*	7,53 senyals superposades	134,1
20-O-benzoil		
1**	-	167,9
2**	-	132,3
3**/7**	7,65 dd (7,8 i 1,5)	130,6
4**/6**	7,10 senyals superposades	129,3
5**	7,42 senyals superposades	133,9
Cimaropiranosil		
1'	4,65 dd (9,6 i 1,9)	100,0
2'	2,29 dd ample (12,5 i 5,5) 1,41 dt (11,5 i 9,0)	37,8
3'	3,34 dt (12,7 i 6,3)	80,3
4'	3,19 dt (12,9 i 6,0)	84,2
5'	3,35 dq (11,0 i 5,4)	72,5
6'	1,27 d (6,2)	18,8
OMe'	3,43 s	57,6
Oleandropiranosil		
1''	4,70 dd (9,6 i 1,7)	101,5
2''	2,30 dd ample (12,3 i 5,1) 1,44 dt (12,3 i 9,6)	37,9
3''	3,20 ddd (11,6, 8,7 i 4,9)	81,9
4''	2,98 t ample (9,1)	77,2
5''	3,24 dq (9,5 i 6,2)	73,5
6''	1,31 d (6,0)	18,5
OMe''	3,41 s	57,8

Exercici 19

A partir de l'espècie botànica *Euphorbia neriifolia* L. (Euphorbiaceae) s'han aïllat diferents metabòlits entre els quals, a més del compost **1**, destaquen els compostos **2** i **3** descrits per primera vegada en la natura, l'estructura dels quals es representa a continuació:



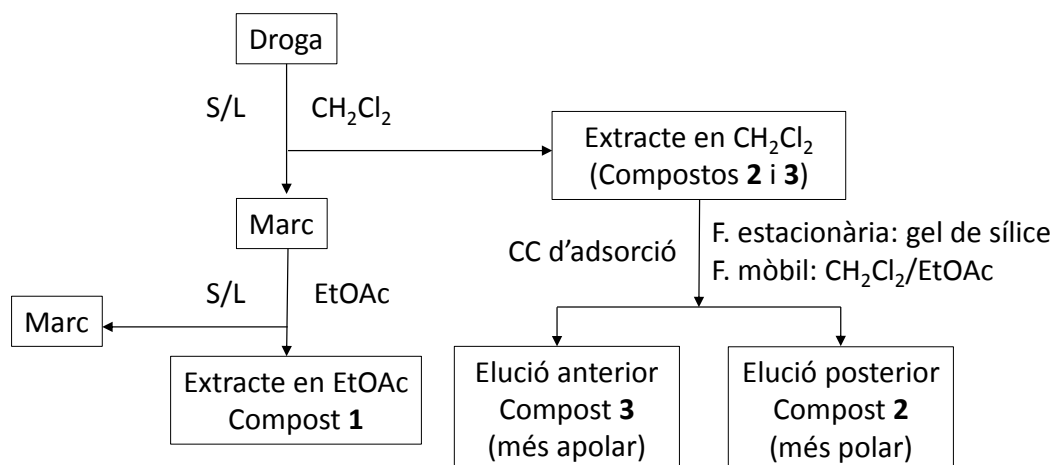
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels tres compostos.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN de la molècula **1**.

19. Resposta

a) El metabòlit **1** és un compost fenòlic, més concretament un flavonol pel fet que presenta una insaturació al C-2 i un hidroxil al C-3. Es tracta d'un metabòlit mixt, derivat de la via de l'àcid shikímic i de tres restes d'acetat. Els compostos **2** i **3** són terpènics, diterpens (vint àtoms de carboni), el primer tetracíclic amb una γ -lactona α , β -insaturada, per la qual cosa es tracta d'una lactona diterpènica, mentre que el segon és tricíclic acetilat. Ambdós deriven de la via de l'àcid mevalònic.

b) Els dos diterpens són de polaritat baixa a mitjana i solubles en diclorometà, mentre que el flavonoide, lleugerament més polar per la presència de quatre hidroxils fenòlics que li confereixen acidesa feble, és soluble en acetat d'etil. La droga s'extrau amb diclorometà i l'extracte obtingut es purifica per CC en gel de sílice eluint, amb mesclures diclorometà-acetat d'etil, primer el compost **3**, més apolar, i seguidament el compost **2**, més polar. A continuació, el marc s'extrau amb acetat d'etil, en el qual es dissoldrà el compost **1**. En el cas que tots els compostos es dissolgueren inicialment en diclorometà, caldria separar-los per CC per polaritat, pel fet que el possible fraccionament L/L amb KOH aquós en què se solubilitzaria el flavonoide i els diterpens, romandria en la fase orgànica i podria trencar la lactona.



c) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **1** mostra tres senyals de protons aromàtics corresponents a l'H-8 de l'anell A que apareix com un singlet, i H-2' i H-6' de l'anell B, que apareixen com doblets acoblats en *meta*. A més, s'hi observen tres singlets a δ ca. 3,8 ppm que integren per tres protons cadascun assignables als tres metoxils.

Apèndix exercici 19

Euphorbia neriifolia (Euphorbiaceae) és una planta que creix principalment en regions tropicals i subtropicals d'Àsia. El seu làtex és utilitzat com a expectorant i laxant en la medicina tradicional de l'Índia. Els extractes de la planta han demostrat posseir propietats protectores hepàtiques i citotòxiques.

Sharma i col·laboradors (2013) van extraure les fulles dessecades d'*E. neriifolia* amb EtOH 70% i en van obtenir l'extracte hidroetanòlic. Per altra banda, les fulles van ser extretes successivament amb dissolvents de polaritat creixent, començant amb C_6H_{14} , continuant amb C_6H_6 , CH_2Cl_2 , EtOAc i EtOH, i finalment macerades amb H_2O , fins a obtenir els respectius extractes. L'anàlisi per CCP de l'extracte etanòlic en gel de sílice, eluint amb *n*-BuOH/AcOH/ H_2O (2:2:6), va resoldre tres taques amb un revelador específic de flavonoides, amb valors d' R_f de 0,60, 0,79 i 0,90, respectivament. La taca intermèdia va ser caracteritzada i identificada per cromatografia en capa prima d'alta resolució (CCPAR), ^1H -RMN i MS com 2-(3,4-dihidroxi-5-metoxi-fenil)-3,5-dihidroxi-6,7-dimetoxicromen-4-ona. Aquesta substància correspon al compost **1** seleccionat per a l'exercici.

Sharma i col·laboradors (2013) van validar l'evidència científica de l'ús terapèutic etnomedicinal d'aquesta planta per al tractament del càncer. Van avaluar l'efecte preventiu de l'extracte hidroetanòlic i del flavonoide aïllat davant el carcinoma renal induït per l'administració oral d'*N*-nitrosodietilamina (DENA) en ratolins. L'administració oral de 400 mg/kg de l'extracte, i de 50 mg/kg del flavonoide durant vint-i-un dies, abans d'intoxicar els animals amb una dosi única de DENA de 50 mg/kg, va protegir els animals sacrificats el dia trenta-u, en l'observar en l'anàlisi histopatològica característiques histològiques normals a diferència de la necrosis i la vacuolització de les cèl·lules renals en el grup control. Aquests resultats van demostrar l'efecte antioxidant d'*E. neriifolia*, fonamentalment pel seu contingut en flavonoides, que són captadors de radicals lliures, a més d'evitar el dany de l'ADN i millorar el sistema de defensa de l'organisme.

A més, diferents estudis fitoquímics van permetre l'aïllament i elucidació estructural d'altres compostos bioactius d'aquesta planta, entre els quals destaquen divuit nous diterpenoides, anomenats eurifoloides A–R que inclouen diterpenoides amb estructura ingenà (1 i 2, eurifoloides A i B, respectivament), abietà (3–7), isopimarà (8–12), i ent-atisà (13–18) (Figura 2). Eurifoloide M (13) representa una classe rara de norditerpenoide tipus ent-atisà. Els eurifoloides E (5) i F (6) van demostrar activitat anti-HIV, amb valors de concentració efectiva (CE)₅₀ de 3,58 i 7,40 μM, respectivament (Zhao *et al*, 2014).

A continuació es descriu detalladament l'extracció i aïllament dels eurifoloides A-R. Per a l'extracció i aïllament d'aquests diterpenoides, les fulles i branques joves trossejades i dessecades d'*E. neriifolia* van ser macerades amb 95% EtOH a temperatura ambient. L'extracte obtingut va ser extret L/L amb EtOAc i H₂O i la fracció soluble en EtOAc va ser sotmesa a purificació per CC de resina d'absorció macroporosa eluint amb EtOH 30%, 80%, i 100% per obtenir una fracció majoritària que va ser analitzada per CCP. Aquesta fracció va ser sotmesa a filtració en gel (MeOH 50% a 100%) que va donar sis fraccions (FrA–F). La fracció FrB va ser purificada per CC en gel de sílice eluint amb mescles CH₂Cl₂/MeOH (200:1→10:1), i se'n van obtenir set fraccions (B1-B7). La fracció B3 va ser recromatografiada sobre fase invertida C18 (MeOH 50% a 100%) ; va donar sis subfraccions (B3a–B3f). La fracció B3b va ser purificada per CLAR semipreparativa amb fase mòbil MeCN 45% que va donar els compostos 3 i 4, i similarment, la fracció B3d va donar el compost 11. La fracció B3c va ser sotmesa a CC en gel de sílice eluint amb CHCl₃/MeOH (180:1→100:1); va donar el compost ent-16α,17-dihidrox-i-atisan-3-ona. La fracció B1 va ser purificada en CC de fase invertida C18 (MeOH 50% a 60%) i va donar com a resultat tres subfraccions (B1a-B1c). La fracció B1b va ser recromatografiada sobre gel de sílice eluint amb C₆H₁₄/EtOAc (8:1→6:1) que va donar el compost antiquorina i 13. La fracció B4 va ser cromatografiada sobre gel de sílice (CHCl₃/MeOH, 150:1→100:1) i va donar una fracció que va ser resolta per CLAR semipreparativa i això va donar com a resultat el compost 9. La fracció C va ser separada per CC en gel de sílice (C₆H₁₄/Me₂CO, 20:1→1:1); això va donar dos fraccions, C1 i C2. La fracció C1 va ser cromatografiada en CC en fase invertida C18 (MeOH 40% a 100%) va donar els compostos 2, 5, 6, 8, 14 i 18, cadascun purificat per CLAR semipreparativa amb MeCN 50%. La fracció C2 va ser purificada per CLAR semipreparativa (MeCN 50%) i va donar antiquorina A i 3α,12α-dihidrox-i-ent-8(14),15-isopimaradien-18-al. Seguint un procés semblant, la fracció D va donar els compostos 1, 7, 10, 12, 15, i 16, i la fracció A, més polar, donà el compost 17. Els diterpenoides 3 i 8 corresponen als compostos **2** i **3**, respectivament, seleccionats en l'enunciat d'aquest exercici.

Respecte a l'elucidació estructural d'aquests compostos, a **2** se li va assignar la fórmula molecular C₂₀H₂₈O₄ en base a les dades espectroscòpiques. Els espectres d'¹H- i ¹³C-RMN (Taula 1) van mostrar senyals típiques de tres metins oxigenats a 3,46, 4,68 i 4,96 ppm corresponents a H-1, H-14 i H-12, respectivament, dos dobles enllaços tetrasubstituïts (δC 121,4, 128,3, 140,9 i 159,6), i un grup carbonil (δC 175,1). El desplaçament químic del carbonil i les bandes d'absorció del'IR a 1739 i 1647 cm⁻¹ van suggerir la presència d'un agrupament γ-lactona α,β-insaturat (Yuan *et al.*, 2005) i que el compost **2** fora un diterpenoide tipus abietà amb una γ-lactona α,β-insaturada. L'assignació completa dels senyals de l'estructura del compost **2** va ser descrita per Zhao i col·laboradors (2014) i es va anomenar eurifoloide C.

Al compost **3** se li va assignar la fórmula C₂₂H₃₄O₄. Les dades d'¹H-RMN van mostrar l'existència d'un grup vinil a 5,10 ppm (dd, J= 17,5 i 1,2 Hz, H-16a), i 5,12 (dd, J= 10,8 i 1,2 Hz,

H-16b) i 5,75 (dd, $J = 17,5$ i $10,8$ Hz, H-15), un doble enllaç trisubstituït a 5,14 (singlet ample, H-14) (δ_C 136,3 i 128,1). A més, es van observar un metilè oxigenat, dos oximetins i tres metils que apareixen com a singlets a 0,81, 0,85, i 1,05 cadascun integrant per 3H, corresponents a H-19, H-20 i H-17, respectivament, i un grup acetil a 2,09 (s, Ac-18). L'estructura de **3** està estretament relacionada amb 3 α ,12 α -dihidroxi-ent-8(14),15-isopimaradien-18-al (Su *et al.*, 2002), amb l'excepció d'un grup acetoximetilè a C-4 en lloc de formil en aquest últim. L'assignació dels senyals va ser confirmada per RMN de doble dimensió (Zhao *et al.*, 2014). La configuració relativa d'aquest compost va ser considerada idèntica al 3 α ,12 α -dihidroxi-ent-8(14),15-isopimaradien-18-al per comparació de les dades d'RMN (Su *et al.*, 2001) i va ser corroborada per l'espectre de ROESY. El compost **3** es va anomenar eurifoloide H.

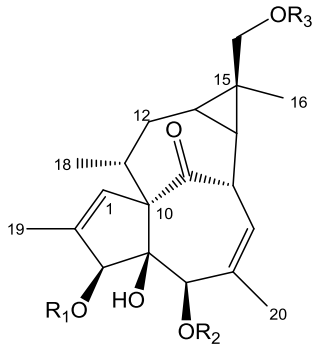
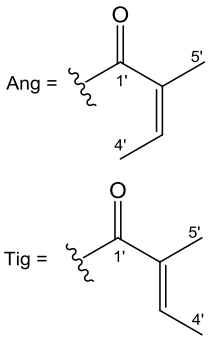
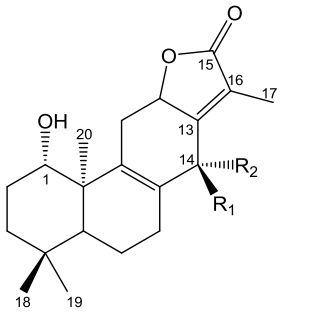
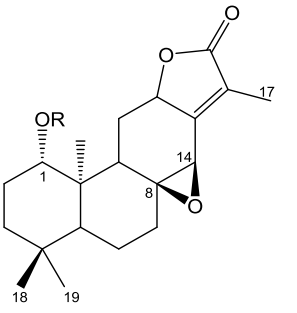
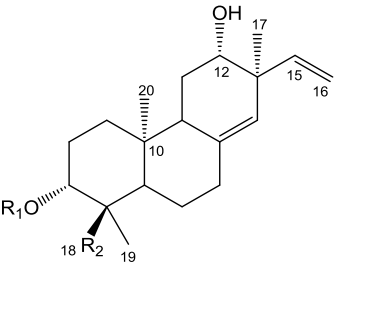
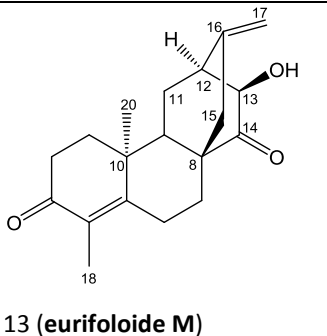
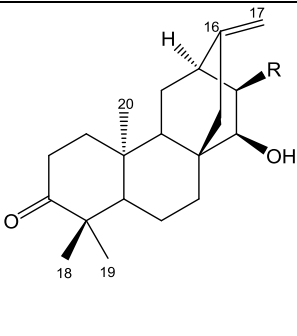
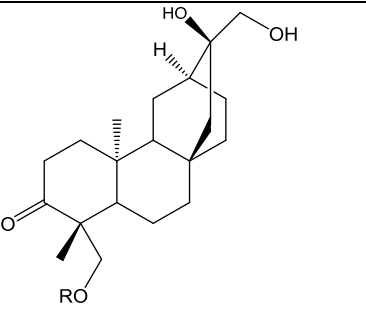
Taula 1. Assignacions dels protons i carbonis dels compostos **2** (eurifoloide C) i **3** (eurifoloide H) en $CDCl_3$.

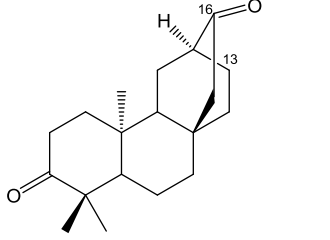
Posició	¹ H-RMN		¹³ C-RMN	
	δ (ppm). Multiplicitat (J en Hz)		δ (ppm)	
	2	3	2	3
1	3,46, m	α 1,69, m β 1,17, m	75,9	36,8
2	1,66, m (2H)	1,61, m 1,71, m	30,7	26,3
3	α 1,42, dt (13,5 i 3,6) β 1,27, m	3,44, dd (11,5, 4,3)	39,4	72,5
4			33,3	42,3
5	1,04, dd (12,4, 1,9)	1,32, m	50,2	46,3
6	α 1,60, m β 1,80, m	α 1,38, m β 1,54, m	18,5	21,7
7	α 1,93, m β 2,66, m	α 2,29, m β 2,01, m	28,7	34,4
8			128,3	136,3
9		1,97, m	140,9	51,5
10			44,2	37,7
11	α 3,69, m β 1,96, m	α 1,51, m β 1,76, m	35,6	26,2
12	4,96, m	3,55, dd (12,2, 4,1)	76,3	73,3
13			159,6	43,1
14	4,68, d (5,4)	5,14, br s	64,9	128,1
15		5,75, dd (17,5, 10,8)	121,4	146,1
16		5,10, dd (17,5, 1,2) 5,12, dd (10,8, 1,2)	175,1	113,7
17	1,90, d (1,9)	1,05, s	8,7	17,5
18	0,90, s	3,78, d (11,6) 4,19, d (11,6)	32,9	66,9
19	0,86, s	0,81, s	21,4	12,1
20	1,08, s	0,85, s	14,6	15,2
Ac-18		2,09, s		171,6 21,0

En la figura 2, es representen les estructures químiques dels eurifoloides identificats: eurifoloide A (1, $C_{30}H_{40}O_7$), eurifoloide B (2, $C_{27}H_{36}O_7$), eurifoloide C (3, $C_{20}H_{28}O_4$, seleccionat

per a l'exercici com compost **2**), eurifoloide D (4, C₂₀H₂₈O₄), eurifoloide E (5, C₂₂H₃₀O₅), eurifoloide F (6, C₂₀H₂₈O₄), eurifoloide G (7, C₂₂H₃₀O₅), eurifoloide H (8, C₂₂H₃₄O₄, seleccionat per a l'exercici com compost **3**), eurifoloide I (9, C₂₀H₃₂O₃), eurifoloide J (10, C₂₂H₃₂O₄), eurifoloide K (11, C₂₂H₃₂O₅), eurifoloide L (12, C₂₂H₃₄O₃), eurifoloide M (13, C₁₉H₂₄O₃), eurifoloide N (14, C₂₀H₃₀O₃), eurifoloide O (15, C₂₀H₃₀O₂), eurifoloide P (16, C₁₉H₂₈O₂), eurifoloide Q (17, C₂₀H₃₂O₄) i eurifoloide R (18, C₂₅H₃₈O₅).

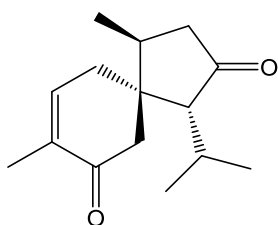
Figura 2. Estructures químiques dels compostos 1-18 (eurifoloïds A-R).

	 <p>Ang =</p> <p>Tig =</p>	<p>R₁ R₂ R₃</p> <p>1 (eurifoloide A) H Ang Tig</p> <p>2 (eurifoloide B) Ac Ang H</p>
		
<p>R₁ R₂</p> <p>3 (eurifoloide C) H OH</p> <p>4 (eurifoloide D) OH H</p> <p>5 (eurifoloide E) OAc H</p>	<p>R</p> <p>6 (eurifoloide F) H</p> <p>7 (eurifoloide G) Ac</p>	<p>R₁ R₂</p> <p>8 (eurifoloide H) H CH₂OAc</p> <p>9 (eurifoloide I) H CH₂OH</p> <p>10 (eurifoloide J) Ac CHO</p> <p>11 (eurifoloide K) Ac COOH</p> <p>12 (eurifoloide L) Ac CH₃</p>
 <p>13 (eurifoloide M)</p>		

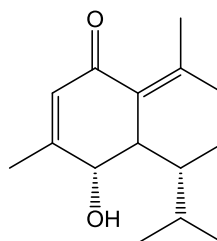
 <p>18 (eurifolide R)</p>	R	R
	14 (eurifolide N) OH	16 (eurifolide P) H
	15 (eurifolide O) H	17 (eurifolide Q) Tig

Exercici 20

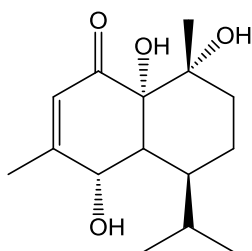
A partir del rizoma de l'espècie *Acorus tatarinowii* Schott (Acoraceae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos **1**, **2**, **3** i **4**.



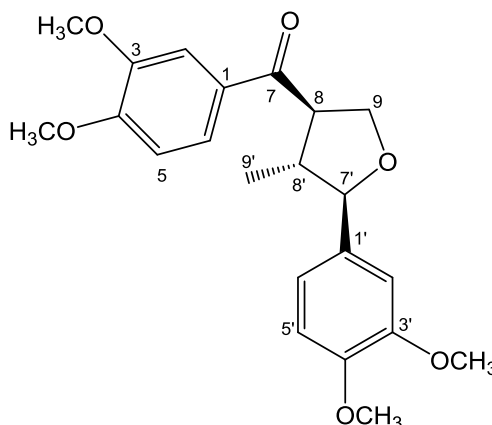
1



2



3



4

Indiqueu:

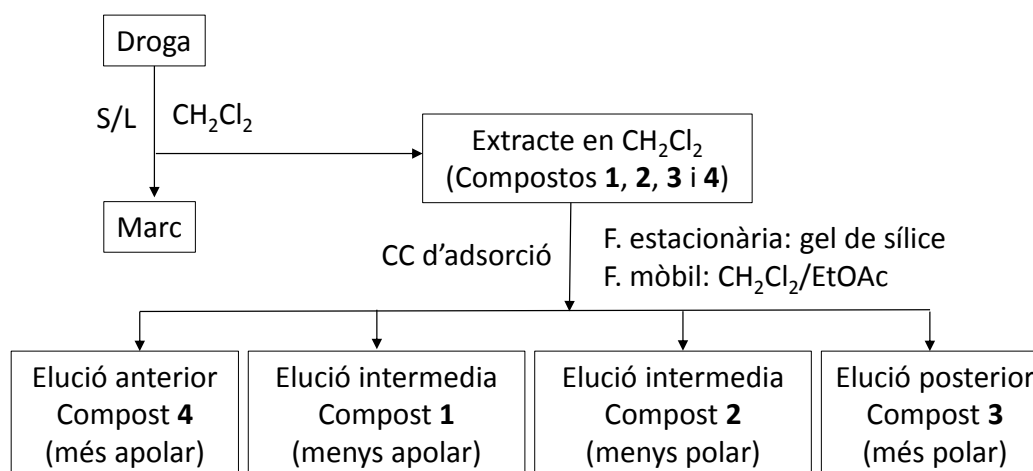
- Grup fitoquímic a què pertanyen aquestes substàncies i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels quatre compostos.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN del compost **4**.

20. Resposta

a) Els tres primers compostos presenten una estructura terpènica amb quinze carbonis que segueixen el patró d'isoprè; per tant, es tracta de sesquiterpens. Biogenèticament, els tres deriven de la via de l'àcid mevalònic. El compost **4** és fenòlic, un lignà que resulta de la unió

de dos restes de fenilpropanoide pels C-8 i C-8', i on les cadenes laterals han format un anell furà. Biogenèticament, el lignà deriva de la via de l'àcid shikímic.

b) Els quatre compostos són solubles en diclorometà. Després de l'extracció, l'extracte diclorometànic es purifica per CC engel de sílice amb un gradient de diclorometà-acetat d'etil (100:0→70:30), eluint per ordre de polaritat en primer lloc el compost **4**, més apolar, seguidament el compost **1** amb dos grups ceto, menys apolar, després el compost **2** amb un grup ceto i un hidroxil, lleugerament més polar, i finalment el compost **3** amb un grup ceto i tres hidroxils, el més polar.



c) L'espectre d'¹H-RMN del compost **4** mostra dos sistemes d'acoblament ABX a δ 7,71 ppm (1H, dd, *J* = 8,5 i 2,0 Hz, H-6), 7,58 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2), 7,08 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-5), 7,04 (1H, singlet ample, H-2'), 6,93 (2H, superposat, H-5'/H-6'). En la regió a camp alt apareixen tres senyals de protons de metins a 4,41 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-7'), 4,03 (1H, m, H-8), 2,46 (1H, m, H-8'), un parell de senyals de protons metilens oxigenats a 4,28 (1H, t, *J* = 8,7 Hz, H-9a), 4,11 (1H, dd, *J* = 8,4 i 6,8 Hz, H-9b) i un senyal de protó de metil a 1,03 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-9'). A més, mostra quatre singlets que integren per 3H cadascun a 3,93, 3,90, 3,86 i 3,83, corresponents a 3-OCH₃, 4-OCH₃, 3'-OCH₃, i 4'-OCH₃, respectivament, que van ser assignats mitjançant l'anàlisi HMBC (Zang *et al.*, 2018).

Apèndix exercici 20

Acorus tatarinowii (Acoraceae) és una espècie que viu en regions pantanoses del Sud de la Xina, l'Índia i Tailàndia. Durant segles ha sigut reputada per al tractament de malalties neurològiques. El rizoma d'aquesta espècie sembla que té el potencial d'alleujar el declivi cognitiu, epilèpsia i demència. La investigació fitoquímica ha revelat que els principals constituents són sesquiterpenoides, fenilpropanoides, lignans i alcaloides. La decocció en aigua i oli essencial d'*A. tatarinowii* va mostrar efectes antiepilèptics en rates amb convulsions. Un terpenoide aïllat d'aquesta planta, anomenat β-asarona, sembla que pot invertir el deteriorament cognitiu perquè inhibeix l'apoptosi neuronal en l'hipocamp en rates injectades amb β-amieloide.

Del seu rizoma, Feng i col·laboradors (2014) van aïllar-ne dotze terpenoides, i més recentment Zang i col·laboradors (2018) van aïllar-ne vuit lignans, dels quals en aquest exercici es presenten les estructures de tres sesquiterpens i un lignà. Les propietats potencials davant la malaltia d'Alzheimer del lignà **4** van ser avaluades en el model

de la mosca *Drosophila* transgènica que sobreexpressa l'oligòmer A β 42. La mosca de la fruita *D. melanogaster* és un dels organismes més accessibles genèticament i experimentalment, i s'adapta bé a l'estudi de la funció d'aprenentatge-memòria en malalties neurodegeneratives. En aquest model, el compost **4** va mostrar capacitat per millorar la memòria a curt termini de les mosques tractades, amb una potència semblant a la memantina utilitzada com a control positiu.

D'acord amb Feng i col·laboradors (2014), l'extracció i aïllament dels compostos a partir d'*A. tatarinowii* va ser de la manera següent: el rizoma polvoritzat i dessecat es va extraure amb EtOH 60%. L'extracte obtingut es va suspendre en H₂O i es va fraccionar L/L amb EtOAc i *n*-BuOH.

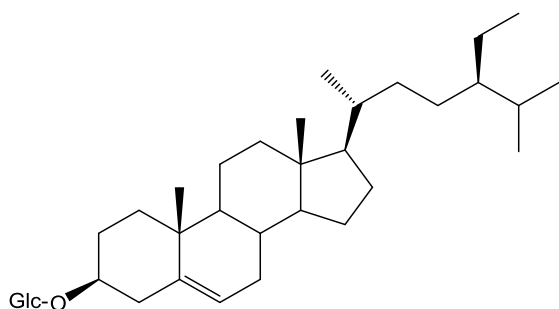
L'extracte EtOAc es va purificar mitjançant CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₂/EtOAc i va donar set fraccions (E1-7). La fracció E4 va ser purificada per cromatografia líquida de mitjana pressió (CLMP) de fase invertida C18 eluint amb un gradient de MeOH/H₂O (30:70→100:0) que donà 14 subfraccions (E4.1-4.14). La subfracció E4.3 va ser fraccionada per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₂/Me₂CO i que va donar 16 fraccions (E4.3.1-4.3.16). La fracció E4.3.5 va ser purificada per CLAR preparativa (C18) amb MeOH/H₂O (63:37) seguida de columna quiral semipreparativa amb MeCN/H₂O (50:50) que va donar el compost **1**. La fracció E5 va ser purificada de la mateixa manera que E4.3 i donà 11 subfraccions (E5.1-5.11). La fracció E5.4 va ser separada per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₂/Me₂CO i a continuació per CLAR semipreparativa (C18) amb MeOH/H₂O (55:45); el resultat fou el compost **2**.

Seguint el mateix procediment d'extracció, Zhang i col·laboradors (2018) cromatografiaren l'extracte EtOAc per CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₂/EtOAc (100:0→0:100) que va donar set fraccions (EA1-7). La fracció EA5 va ser cromatografiada per CC de fase invertida C18 eluint amb un gradient de MeOH/H₂O (10:90→40:60), i la subfracció eluïda amb MeOH 60% (EA5.6) es va purificar per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₂/Me₂CO (95:5→70:30) que va donar 13 fraccions (EA5.6.1–5.6.13). La fracció EA5.6.10 va ser fraccionada per CC de filtració en gel (Sephadex[®]LH-20) amb MeOH i CLAR preparativa (C18) amb MeOH 60%; va donar el lignà **4**.

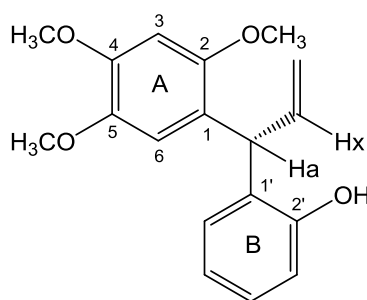
Les estructures dels compostos van ser establertes per RMN mono- i bidimensional, espectrometria de masses, dades d'espectroscòpia òptica i anàlisi cristal·logràfica per rajos X. Els tres sesquiterpenoides van ser anomenats acoronè (**1**), tatarinowina A (**2**) i tatarinowina C (**3**). Al lignà **4** se li va assignar el nom trivial de (\pm)-tatarinoide D, identificat com (3*R*,4*R*,5*R*)-5-(3,4-dimetoxifenil) tetrahidro-4-(metil)-3-furanil-(3,4-dimetoxifenil) metanona.

Exercici 21

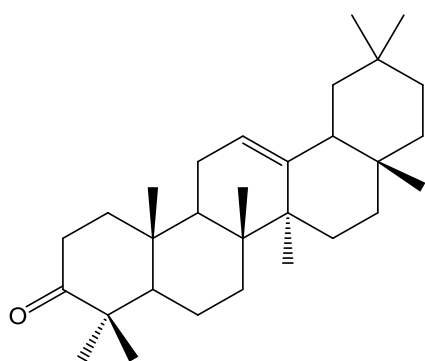
A partir de l'escorça de la tija de *Ficus drupacea* Thunb. (Moraceae) s'han aïllat i identificat, entre d'altres, els compostos següents:



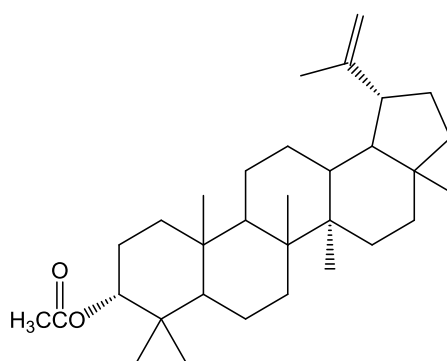
1



2



3



4

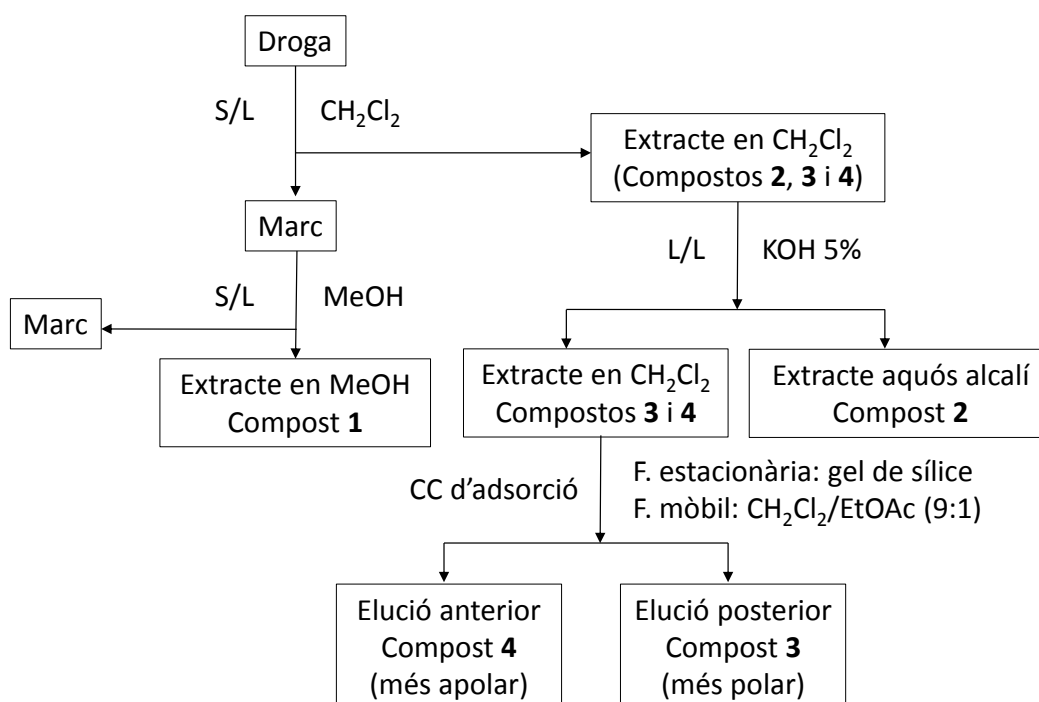
Indiqueu:

- Tipus d'estructura de cada compost i quin són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels quatre compostos.
- Reacció de caracterització del compost **1**.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN de la molècula **2**.

21. Resposta

a) Els compostos **1**, **3** i **4** són terpènics. El primer és un esteroide glucosilat mentre que els altres dos són genines triterpèniques pentacíclics, **3** amb esquelet tipus oleanà i **4** amb esquelet tipus lupà. Biogenèticament, els tres deriven de la via de l'àcid mevalònic. El compost **2** és fenòlic, concretament és un *seco*-neoflavonoide, un subgrup de flavonoides que presenten un esquelet 4-fenilcromà, però en aquest cas amb l'anell C obert; biogenèticament és un metabòlit mixt derivat de la via de l'àcid shikímic i tres restes d'acetat.

b) Els compostos **2**, **3** i **4** són apolars, solubles en diclorometà, mentre que l'heteròsid **1** és polar i soluble en metanol o aigua. A més, la presència d'un hidroxil fenòlic lliure en el compost **2** li confereix caràcter àcid dèbil i se solubilitza en formar fenats amb un medi alcalí fort. Després d'extraure la droga amb diclorometà, l'extracte es pot purificar L/L amb KOH 5%; en la fase aquosa bàsica se solubilitza **2**, mentre que la fase orgànica en què es troben **3** i **4**, es fracciona per CC sobre gel de sílice eluint, amb diclorometà/acetat d'etil (9:1), en primer lloc el compost **4**, més apolar, i a continuació, el compost **3**, lleugerament més polar. El marc s'extrau amb metanol, en què se solubilitza el compost **1**.



c) L'anell esteroide del compost **1** es pot caracteritzar per la coloració verd blavosa amb el reactiu de Liebermann (anhídrid acètic i àcid sulfúric), mentre que en la part glucídica dona positiva la reacció de Molisch (α -naftol + àcid sulfúric) per l'aparició d'un color morat.

d) L'espectre d' ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , ppm) del compost **2** mostra tres singlets a δ 3,74 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,84 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,85 (3H, s, $-\text{OCH}_3$) corresponents als tres grups metoxi. Un triple doblet a 5,01 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ trans, $J = 17,33, 1,68$ i $1,68$ Hz), un doblet ample a 5,20 (1H, ample d, Ha, $J = 5,68$ Hz), 5,27 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ cis, $J = 10,38, 1,65$ i $1,65$ Hz), un triple doblet a 6,32 (1H, ddd, Hx, $J = 17,21, 10,04$ i $5,17$ Hz). A més, s'hi observen dos singlets a 6,53 (1H, s, H-3) i 6,67 (1H, s, H-6) corresponents als protons aromàtics de l'anell A i un multiplet entre 6,80-7,15 (4H, m) corresponent als quatre protons aromàtics de l'anell B (Sekine *et al.*, 2009).

Apèndix exercici 21

L'espècie *Ficus drupacea* (Moraceae) és un arbre medicinal ornamental distribuït en àrees temperades i utilitzat no només en la medicina popular per al tractament de paragonimiasis, malària i sinusitis, sinó també en la indústria farmacèutica com a font d'inhibidors de α -glucosidasa (Kiem *et al.*, 2013). Yessoufou i col·laboradors (2015) van avaluar les activitats antimicrobianes i antiproliferatives de l'extracte metanòlic i dels compostos aïllats a partir de l'escorça de la tija davant bacteris, fongs i cèl·lules canceroses humanes. Van aïllar i identificar set compostos incloent-hi: β -amirina, β -sitosterol-3- O - β -D-glucopiranosid, 5- O -metil-latifolina, àcid oleanòlic, epifriedelanol, friedelina i acetat de epilupeol. D'aquests, 5- O -metil-latifolina i acetat de epilupeol van mostrar les millors activitats antimicòtica i antibacteriana, mentre que l'àcid oleanòlic, friedelina i acetat d'epilupeol van exhibir les

activitats antiproliferatives més potents davant les línies cel·lulars canceroses Hela, MCF-7, Jurkat, HT-29 y T24.

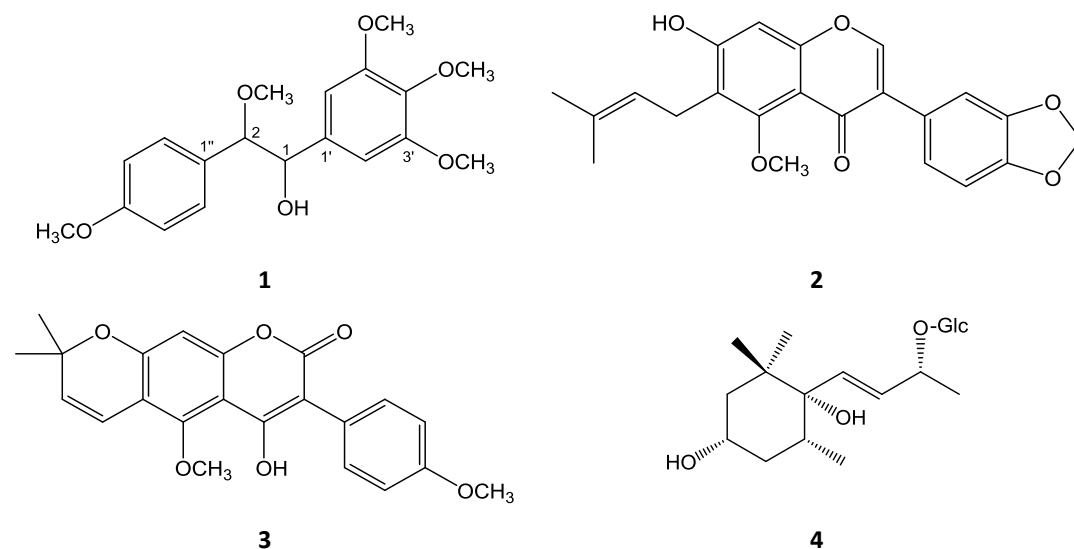
D'acord amb Yessoufou i col·laboradors (2015), l'escorça de la tija de *F. drupacea* dessecada i polvoritzada va ser macerada amb MeOH a temperatura ambient; l'extracte obtingut va ser fraccionat per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₄ i mescles C₆H₁₄/EtOAc i C₆H₁₄/Me₂CO. Se'n van obtenir diferents fraccions. La fracció eluïda amb C₆H₁₄/EtOAc (3:1) va ser sotmesa a CC en gel de sílice eluint amb mescles de C₆H₁₄/EtOAc, EtOAc i mescles EtOAc/MeOH, que va donar el compost **1**. La fracció eluïda amb C₆H₁₄/Me₂CO (17:1) va ser cromatografiada sobre gel de sílice eluint amb mescles CHCl₃/MeOH (15:1) i va donar dues subfraccions Fr1 i Fr2. La Fr1 va ser recromatografiada en CC en gel de sílice amb CHCl₃/Me₂CO (4:1) eluint el compost **2**. La Fr2 va ser recromatografiada en C18 amb mescles MeOH/H₂O (8:1) eluint els compostos **3** i **4**. Els compostos aïllats van ser identificats per anàlisi espectroscòpica, incloent-hi ¹H- i ¹³C-RMN, i EM.

5-*O*-Metil-latifolina (**2**). EM, *m/z* (intensitat relativa): 300 [M]⁺, (27), 285 (1), 269 (11), 253 (2), 241 (2), 225 (3), 210 (2), 194 (5), 181 (12), 168 (100), 153 (32), 131 (14), 115 (8), 107 (13), 91 (9), 77 (15), 69 (19), 51 (8).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, ppm) δ: 41,68 (C-Ha), 57,56 (-OCH₃), 58,00 (-OCH₃), 58,42 (-OCH₃), 99,37 (C-3), 114,64 (C-6), 117,78 (C-1), 118,19 (=CH₂), 122,00 (C-3'), 122,74 (C-1'), 129,17 (C-5'), 129,80 (C-4'), 130,71 (C-6'), 140,51 (C-Hx), 145,14 (C-5), 149,92 (C-2), 151,61 (C-4), 155,27 (C-2').

Exercici 22

A partir de l'espècie *Derris eriocarpa* F.C. How (Leguminosae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos **1**, **2**, **3** i **4**.



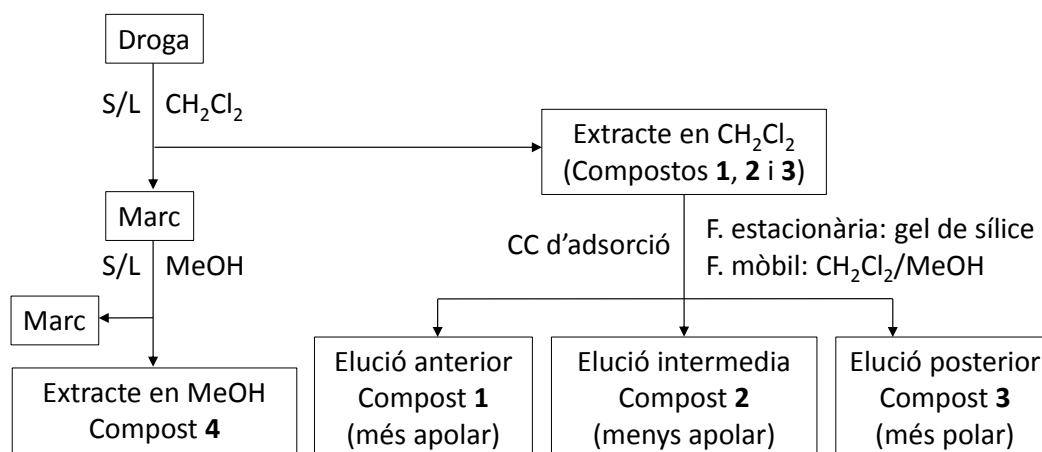
Indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament de les quatre substàncies.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN del compost **1**.

22. Resposta

a) Els tres primers compostos són fenòlics. El compost **1** és un estilbenoide, caracteritzat per posseir dos anells aromàtics units per un parell de carbonis, en aquest cas tetrametoxilat. Els estilbens, també referits com a bisbenzils, estan relacionats amb els flavonoides (metabòlits mixtos resultants de la condensació de tres restes d'acetat i l'àcid cinàmic), i tenen l'esquelet bàsic C6-C2-C6 provinent de la pèrdua d'un carboni de la unitat tricetona inicial. El compost **2** és una 5,7-dimetoxi-isoflavona prenilada al C-6. Biogenèticament, les isoflavones són metabòlits mixtos, una subclasse de flavonoides en què l'anell aromàtic derivat del shikimat (anell C) d'una flavanona (sense insaturació al C-2) ha migrat al carboni adjacent de l'heterocicle (C-3 en l'anell B). El substituent prenil (cinc carbonis) al C-6 deriva de l'àcid mevalònic. El compost **3** és una pirancumarina substituïda al C-3 amb un 4'-prenil-benzé. Biogenèticament, les cumarines són derivats de l'àcid shikímic i l'anell pirà prové d'una ciclització intramolecular entre l'hidroxil al C-7 i un substituent prenil al C-6, derivat de l'àcid mevalònic. El compost **4** és un derivat de la ionona, més concretament és un glucòsid del 3,6-dihidroxi-5,6-dihidro- β -ionol. Les ionones resulten de la degradació dels carotenoides, els quals deriven biogenèticament del mevalonat.

b) Els tres compostos fenòlics són solubles en diclorometà i una vegada extrets es poden purificar per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de diclorometà-metanol per ordre de polaritat, possiblement en primer lloc el compost **1** més apolar, a continuació el compost **2**, lleugerament menys apolar, i finalment el compost **3**, més polar. La possible partició L/L de l'extracte diclorometànic amb una base forta per a solubilitzar els compostos **2** i **3** amb hidroxils fenòlics lliures i separar-los del compost **1** soluble en la fase orgànica no seria recomanable perquè la lactona de la cumarina és molt làbil i es podria trencar. El compost **4** és un heteròsid, més polar, i s'extrau amb metanol.



c) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **1** mostra cinc singlets que integren per 3 H cadascun a δ 3,25, 3,62, 3,73, 3,62 i 3,71 ppm corresponents a 2-OCH₃, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃, 5'-OCH₃, i 4''-OCH₃, respectivament, que van ser assignats per correlacions heteronuclears de múltiple enllaç (HMBC). Dos doblets a 5,54 ($J = 8,4$ Hz) i 3,97 ($J = 8,4$ Hz) corresponents a H-1 i H-2, respectivament. També s'hi observa la presència d'un sistema AA'BB' a 6,75 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'' i H-5'') i 6,92 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'' i H-6''). A més, dos doblets a δ 6,17 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) assignables a H-2' i H-6' (Zhang *et al.*, 2014).

Apèndix exercici 22

Les tiges dessecades de l'espècie *Derris eriocarpa* (Leguminosae) s'utilitzen per alleujar la tos i reduir l'esput, i en el tractament de nefritis, cistitis, uretritis, i edemes per beri-beri. Els extractes hidroetanòlic i butanòlic van demostrar propietats antiinflamatòries i analgèsiques a més de reduir la tos i l'esput en ratolins, sense mostrar cap toxicitat aguda a la màxima dosis de tolerància de 62 i 96 g/kg respectivament (Zhang *et al.*, 2014).

A partir de les tiges d'aquesta espècie, Zhang i col·laboradors (2014) van aïllar i identificar per tècniques espectroscòpiques mono i bidimensionals tres compostos nous en la natura, un anàleg nou del resveratrol, 1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-2-metoxi-2-(4''-metoxifenil)-etan-1-ol (1), i dues noves prenilisoflavones, 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi-6-(3-metil-2-butenil)-isoflavona (2), i derrubona-5-metil èter (3), a més de disset compostos coneguts. Els compostos aïllats coneguts identificats per comparació amb dades espectroscòpiques bibliogràfiques ven ser: 5,7-dihidroxi-3-[4'-O-(3-metil-2-butenil)-fenil]-isoflavona (4), 3,4,4',5-tetrametoxi-estilbè (5), àcid robústic (6), 4-hidroxi-3-[4'-O-(3,3-dimetilal·lil)fenil]-5-metoxi-2'',2''-dimetilpiran-(5'',6'':6,7)-cumarina (7), derrusnina (8), medicagol (9), maackiaina (10), derrubona (11), 6-metoxi-7-hidroxi-3',4'-metil-ene-dioxiisoflavona (12), formononetina (13), daidzeïna (14), (3S)-vestitol (15), coniferaldehid (16), β -adenosina (17), alangiòsid A (18), ampelopsionòsid (19), i (3S,5R,6S,7E,9R)-3,6-dihidroxi-5,6-di-hidro- β -ionol (20). Tots aquests compostos s'han descrit per primera vegada en aquesta espècie.

D'acord amb Zhang i col·laboradors (2014), l'extracció i aïllament dels compostos va ser de la manera següent: les tiges de *D. eriocarpa* dessecades i polvoritzats van ser extretes amb MeOH 80% a temperatura ambient i el residu aquós obtingut després d'eliminar-ne l'alcohol es va fraccionar L/L amb C₆H₁₄, CHCl₃, EtOAc, i *n*-BuOH.

L'extracte CHCl₃ es va separar per CC en gel de sílice amb un gradient de C₆H₁₄/Me₂CO (1:0→1:1) i vadonar deu fraccions (C1-10). A partir de la fracció C4, cristal·litzà el compost 5. La fracció C6 va ser cromatografiada per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₄/EtOAc (15:1→3:1) que vadonar deu subfraccions (C6a-j); C6e va ser repetidament fraccionada per CC sobre gel de sílice i va donar els compostos 4, 7, 10, 11; de C6g s'aïllaren els compostos 2, 3, 6, 8 i 16; i de C6i els compostos 1, 9, i 13. La fracció C8 va ser sotmesa a CC sobre gel de sílice eluint amb un gradient de CHCl₃/Me₂CO (1:0→0:1) que va donar set subfraccions (C8a-g); C8c va ser repetidament cromatografiada per CC sobre gel de sílice i en va resultar el compost 12, i C8f el compost 14.

L'extracte EtOAc es va fraccionar per CC en gel de sílice amb un gradient de CHCl₃/Me₂CO (1:0→0:1); va donar deu fraccions (E1-10). E6 donà el compost 15 i E9 el compost 20 després de repetides purificacions per CC en gel de sílice.

L'extracte *n*-BuOH va ser sotmès a CC sobre Diaion D101 (resina macroporosa) eluint amb EtOH al 30%, 50%, 70%, i 100%. La fracció eluïda amb EtOH 30% va ser purificada per CC en gel de sílice amb un gradient de CHCl₃/MeOH (15:1→0:1) que va donar set subfraccions (B1a-g). Per purificacions repetides sobre gel de sílice, B1c va donar el compost 19, B1d el compost 17, i B1e el compost 18.

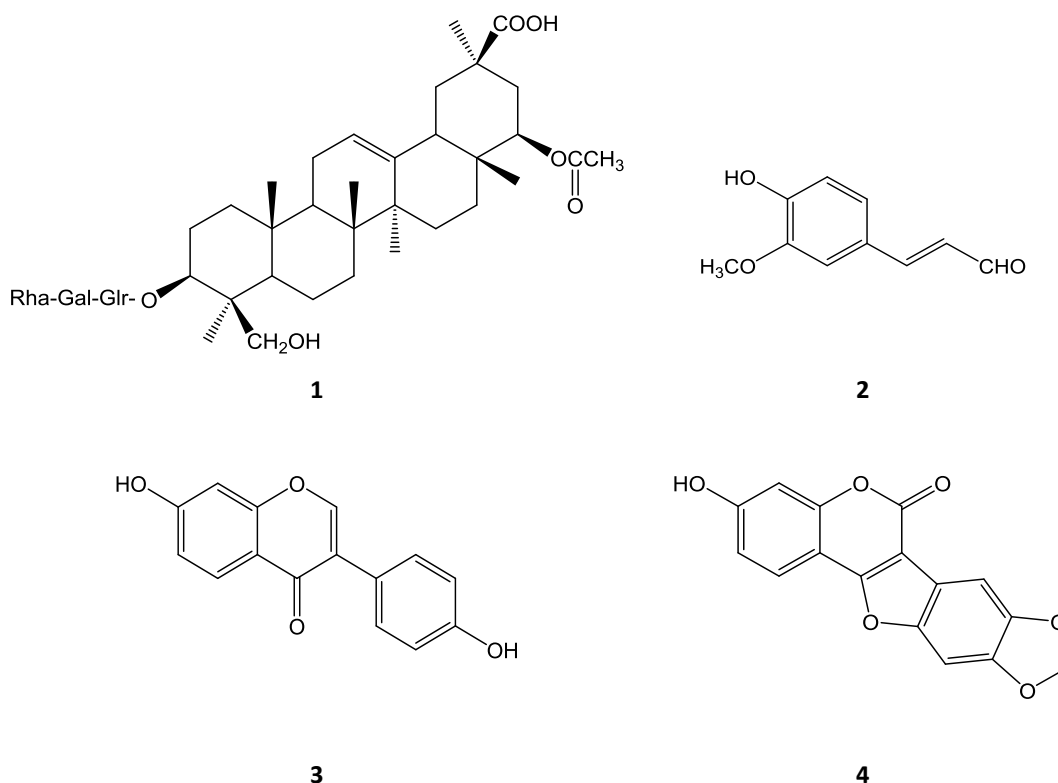
Els compostos **1-4** seleccionats per al present exercici són l'estilbè 1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-2-metoxi-2-(4''-metoxifenil)-etan-1-ol (**1**), 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi-6-(3-metil-2-butenil)-isoflavona (**2**), 4-hidroxi-3-[4'-O-(3,3-dimetilal·lil)fenil]-5-metoxi-2'',2''-dimetilpiran-

(5'',6'':6,7)-cumarina (**3**); cadascun es correspon amb els compostos 1, 2 i 7, respectivament, aïllats de l'extracte clorofòrmic; i ampelopsionòsid (**4**) es correspon amb el compost 19, aïllat de l'extracte *n*-BuOH.

Zhang i col·laboradors (2014) van avaluar les activitats antimicrobianes dels tres nous compostos identificats en la natura. 4'-Hidroxi-5,7-dimetoxi-6-(3-metil-2-butenil)-isoflavona fou el que va manifestar millor activitat inhibidora davant *Candida guilliermondii*, *C. albicans* i *Microsporium gypseum*, amb valors de concentració mínima inhibidora de 12,5 µg/ml.

Exercici 23

A partir de l'espècie *Derris eriocarpa* F.C. How (Leguminosae) s'han aïllat, entre d'altres, els compostos **1**, **2**, **3** i **4**.



Indiqueu:

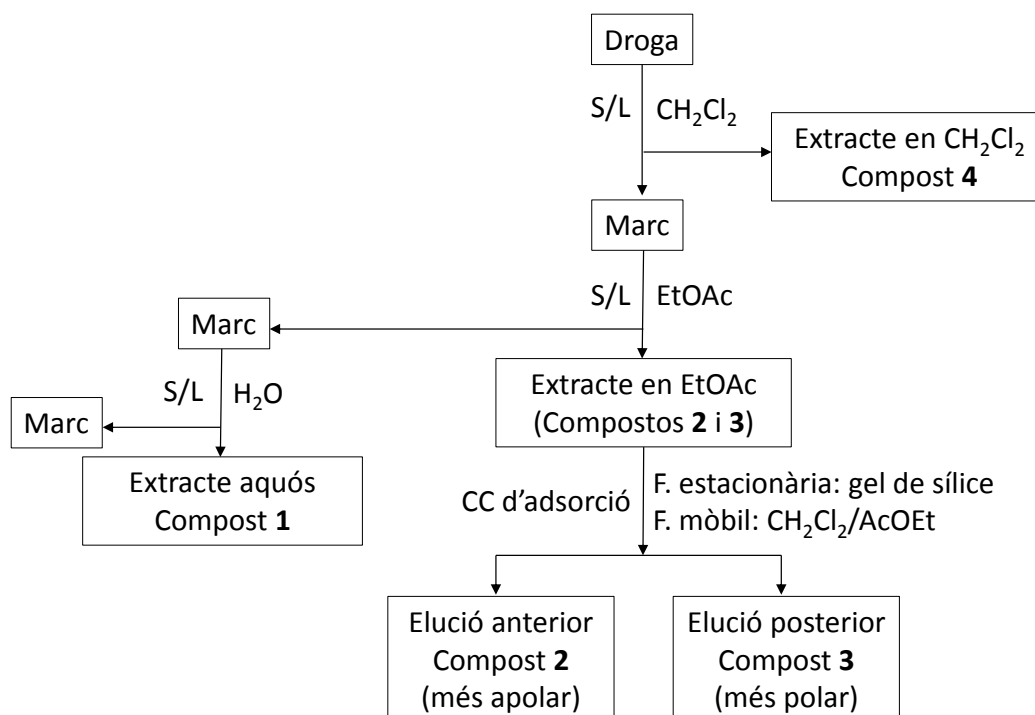
- Grup fitoquímic a què pertanyen els compostos i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels quatre compostos.
- Dues reaccions de caracterització del compost **1**.
- Possible activitat farmacològica d'un principi amb l'esquelet del compost **3**.
- Tres senyals observables en l'espectre d'¹H-RMN del compost **1**.

23. Resposta

a) El compost **1** és un saponòsid o triterpè glicosilat amb genina tipus oleanà, amb una insaturació al C-12, un grup acetil al C-22, un hidroximetil al C-24 i un carboxil al C-30. La cadena glucídica unida per enllaç èter a l'hidroxil al C-3 està constituïda per tres oses. Biogenèticament deriva de l'àcid mevalònic. Els altres tres compostos són fenòlics. El

compost **2** és un aldehyd fenilpropanoide, concretament el coniferaldehyd, derivat de la via de l'àcid shikimic. El compost **3** és una 7,4'-dihidroxi-isoflavona, concretament la daidzeïna. Biogenèticament, les isoflavones són metabòlits mixtos resultat de la condensació de l'àcid cinàmic i de tres restes d'acetat. Les isoflavones són una subclasse de flavonoides en què l'anell aromàtic derivat del shikimat (anell C) d'una flavanona (sense insaturació al C-2) ha migrat al carboni adjacent de l'heterocicle (C-3 en l'anell B). El compost **4** és un cumestà, un derivat d'isoflavonoides que resulta de l'acoblament de l'hidroxil de l'anell B al C-4 de l'anell C. Més concretament, és un producte d'oxidació d'un pterocarpà (una estructura benzo-piran-furan-benzè) que és semblant a una cumarina, derivada biogenèticament del shikimat.

b) Els tres compostos fenòlics són solubles en diclorometà, aleshores la droga s'extrau amb aquest dissolvent i l'extracte obtingut es purifica per CC en gel de sílice eluint amb un gradient de diclorometà-acetat d'etil per ordre de polaritat: en primer lloc el compost **4**, més apolar, després el compost **2**, menys apolar, i finalment el compost **3**, el més polar. La possible partició L/L de l'extracte diclorometànic amb una base forta per a solubilitzar els compostos **2** i **3** amb hidroxils fenòlics lliures i separar-los del compost **1** soluble en la fase orgànica no seria recomanable perquè la lactona de la cumarina és làbil i es podria trencar. Alternativament, pot ocórrer que només el compost **4** fora soluble en diclorometà i que els compostos **2** i **3** s'extragueren amb acetat d'etil. Després aquests dos se separen per CC en gel de sílice eluint, amb un gradient de diclorometà-acetat d'etil en primer lloc el compost **2**, més apolar, i seguidament el compost **3**, més polar. El compost **4** és un heteròsid, més polar, i s'extrau en aigua.



c) El compost **1** és un saponòsid triterpènic hidrosoluble que es pot caracteritzar per la seua propietat de formar escuma persistent en agitar la seua dissolució aquosa (poder afrogen). Com que és un heteròsid (genina unida a una part glucídica), el sucre dona positiva la reacció

de Molisch i hi apareix una coloració roja en afegir α -naftol i àcid sulfúric a la dissolució aquosa.

d) Les isoflavones (com per exemple genisteïna, daidzeïna o formononetina, entre d'altres) i els cumestans (com cumestrol o medicagol) són fitoestrògens o substàncies estrogèniques que es troben en llegums (soia, *Glycine max* (L.) Merr., Leguminosae) o fulles (trèvol roig, *Trifolium pratense* L., Leguminosae), llinosa i llúpol, i tenen efectes beneficiosos en la salut com a estrògens suaus, però en algunes circumstàncies poden actuar com a antiestrògens. Evidències epidemiològiques suggereixen que una dieta rica en soia pot reduir els símptomes de la menopausa o l'augment de la pròstata. Redueixen la severitat de les sufocacions i suors nocturns en dones peri- o post-menopàusiques, així com els factors de risc d'osteoporosi. Un assaig aleatoritzat, doble cec, controlat amb placebo, va indicar que l'extracte de fulles de trèvol roig (80 mg/dia, durant dotze setmanes) redueix la freqüència i intensitat de les sufocacions en dones postmenopàusiques (Shakeri *et al.*, 2015).

e) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **1** mostra set singlets que integren per 3 H cadascun, corresponents a set metils terciaris a δ 0,64 ppm (C-25), 0,87 (C-26), 0,96 (C-28), 1,30 (C-27), 1,31 (C-29), 1,39 (C-23), i 2,07 (CO-CH₃), un hidroximetil al C-24 a 4,22 i 3,23 (un doblet cadascun amb $J = 11,5$ Hz), un protó de doble enllaç olefínic al C-12 a 5,52 (singlet ample), i tres protons anòmèrics a 4,97 (d, $J = 8,0$ Hz), 5,70 (d, $J = 7,5$ Hz), i 6,17 (s) (Zhang *et al.*, 2017).

Apèndix exercici 23

Amb l'objectiu d'identificar els compostos de sabor dolç i determinar per què es pot utilitzar l'espècie *Derris eriocarpa* (Leguminosae) per substituir la regalíssia des del punt de dolçor, s'ha dut a terme un fraccionament i purificació guiats sensorialment pel gust dolç de l'extracte cru d'aquesta planta. Zhang i col·laboradors (2017) hi van aïllar dos saponines triterpèniques de sabor dolç, millettiasaponina (1) i una nova saponina anomenada derrisaponina A (2).

D'acord amb Zhang i col·laboradors (2017) l'extracció i l'aïllament, guiat sensorialment, dels compostos va ser de la manera següent: les tiges de *D. eriocarpa* dessecades i polvoritzades van ser extretes amb MeOH 80% a temperatura ambient i el residu aquós obtingut després d'eliminar l'alcohol es va fraccionar L/L amb CHCl₃, EtOAc, i *n*-BuOH. La fracció *n*-BuOH i l'aquosa mostraren un sabor dolç en els tests d'avaluació sensorial.

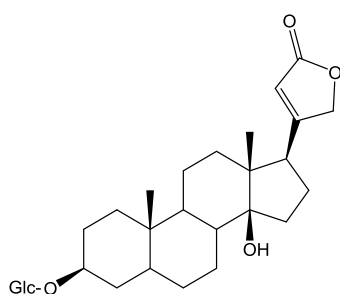
La fracció *n*-BuOH va ser purificada per CC sobre una resina macroporosa D101 eluint amb H₂O, EtOH 30%, 50%, i 70%, i EtOH successivament. Després de concentrar a buit i liofilitzar, es van obtenir les fraccions B1 (eluïda amb EtOH 30%), B2 (eluïda amb EtOH 50% i 70%), i B3 (eluïda amb EtOH). La fracció B2 va ser identificada com la fracció dolça d'acord amb els resultats d'avaluació sensorial. La fracció B2 es va fraccionar per CC en gel de sílice amb un gradient de CHCl₃/MeOH/H₂O (7:3:0, 7:3:0,5, i 6:4:1) i va donar quatre subfraccions (B2a-d), de les quals només les dues últimes van mostrar un sabor dolç. La fracció B2c es va cromatografiar per CC en gel de sílice eluint amb CHCl₃/MeOH/H₂O (7:3:0,5) i va donar quatre subfraccions (B2c1-3), de les quals B2c-2 era dolça. Aquesta fracció es va recromatografiar en les mateixes condicions i va donar el compost **1**. La fracció B2d també es va cromatografiar en les mateixes condicions i va donar quatre subfraccions, B2d-4 dolça, i successivament es va recromatografiar i va donar el compost **2**.

L'estructura dels compostos va ser elucidada per anàlisi espectroscòpica d'RMN, mono- i bidimensionals. El compost 1 es va identificar com a millettiasaponina A, aïllat per primera vegada en el gènere *Derris* i prèviament aïllada en l'espècie *Millettia speciosa* Champ. (Leguminosae). Millettiasaponina A es correspon amb el compost 1 de l'exercici proposat. L'estructura del compost 2, una nova saponina, va ser establerta com l'àcid 22 β -acetiloxi-3 β ,24-dihidroxiolean-12-en-30-oic3-O- β -D-glucopirànasil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopiranosid i anomenada derrisaponina A.

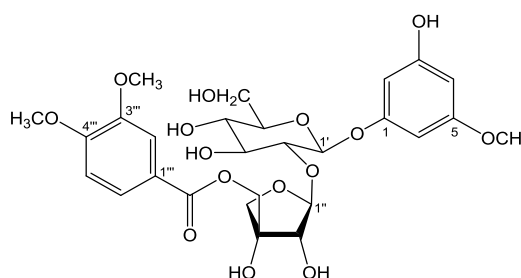
La potència de dolçor va ser avaluada en un test amb un panell sensorial humà. Les intensitats de dolçor dels compostos 1 i 2 van ser 150 i 80 vegades superiors a la sacarosa a l'1%, respectivament. Aquests compostos no van mostrar toxicitat aguda en ratolins a dosis de 250 i 400 mg/kg pes corporal. L'anàlisi quantitativa per CLAR-EM/EM d'aquests compostos dolços en les tiges de *D. eriocarpa* va donar 352,80 mg/kg i 1887,60 mg/kg per al compost 1 i 2 respectivament.

Exercici 24

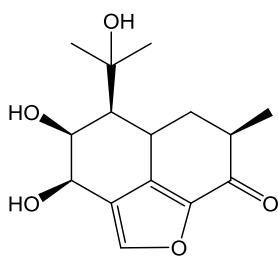
A partir dels fruits de l'espècie *Reevesia formosana* Sprague (Malvaceae) s'han aïllat i identificat, entre d'altres, els compostos següents: reevesiòsid J (1), reevesianina A (2), reevesiterpenol D (3), i reevesiterpenol E (4) :



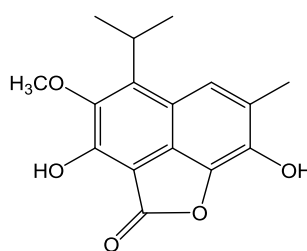
1



2



3



4

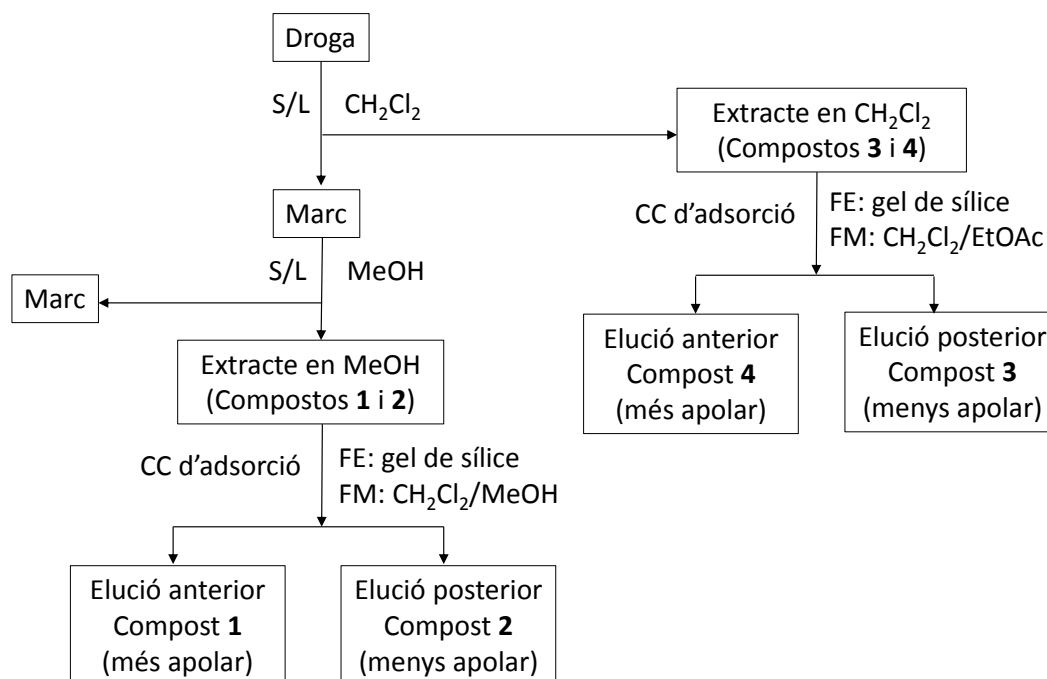
Indiqueu:

- Tipus d'estructura de cada compost i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament d'aquestes substàncies.
- Una reacció de caracterització del compost 1.
- Tres senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN del compost 2.

24. Resposta

a) Els compostos **1**, **3** i **4** són terpènics. El primer és un heteròsid cardenòlid mentre que els altres dos, amb quinze carbonis cadascun, són sesquiterpenoides. El compost **1** presenta un esquelet esteroide amb dos hidroxils en β al C-3 i C-14, el primer unit per enllaç èter a una glucosa (3β -*O*-glucopiranosid, 14β -hidroxi), i una γ -lactona α -monoinsaturada en β al C-17. Biogenèticament, els tres deriven de la via de l'àcid mevalònic. A més, per al compost **1**, la progesterona, formada com a metabòlit intermediari, reduïda i hidroxilada, condensa amb una unitat de dos carbonis en forma de malonil-coenzim A per originar una cadena lateral de quatre carbonis que posteriorment s'oxida i deshidrata formant l'anell lactònic α - β insaturat. El **2** és un compost fenòlic glicosilat, amb un àcid fenol i un fenol simple units per un disacàrid format per una hexosa i una pentosa. L'àcid fenol deriva de la via de l'àcid shikímic però el fenol simple amb patró floroglucinol resulta de la ciclització de tres restes d'acetat.

b) Els compostos **3** i **4** són apolars, solubles en diclorometà, mentre que els heteròsids **1** i **2** són més polars i solubles en metanol. L'extracte diclorometànic es pot fraccionar per CC en gel de sílice eluint amb diclorometà/acetat d'etil (9:1) en primer lloc el compost **4**, més apolar, i a continuació, el compost **3**, més polar. De manera semblant, l'extracte metanòlic es fracciona per CC en gel de sílice amb diclorometà/metanol (95:5) eluint primer el compost **1**, més apolar, seguit del compost **2**, més polar. Una altra alternativa és extraure el marc amb EtOH 50% per solubilitzar els compostos **1** i **2**, i després per partició L/L amb diclorometà separar el compost **1** en la fase orgànica, mentre que el **2** roman en la fase hidroetànica.



c) El compost **1** presenta un anell γ -lactònic α -insaturat que es pot caracteritzar amb un derivat aromàtic nitrat com és l'àcid 3,5-dinitrobenzoic en medi alcalí en què s'observa una coloració roig-violeta (Reacció de Kedde).

d) L'espectre d' ^1H -RMN del compost **2** mostra tres protons acoblats en *meta* a δ 6,02 ppm (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H-4), 6,15 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H-6), i 6,19 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H-2), i a més, un sistema ABX d'un anell benzènic a 6,89 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'''), 7,48 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-

2'''), 7,55 (1H, dd, $J = 8,4, 1,8$ Hz, H-6'''). També presenta tres grups metoxi a 3,65, 3,84, i 3,87 corresponents a OCH₃-5, OCH₃-3''', i OCH₃-4'''' respectivament, assignats per correlacions $3J$ heteronuclears d'enllaç múltiple de l'anàlisi HMBC. A més, dos protons anomèrics a 4,94 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1') i 5,54 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-1''') suggereixen la presència de dues restes de sucre (Hsiao *et al.*, 2016).

Apèndix exercici 24

A partir dels fruits de l'espècie *Reevesia formosana* (Malvaceae), Hsiao i col·laboradors (2016) van obtenir un extracte metanòlic amb una potent activitat citotòxica davant les tres línies de cèl·lules cancerígenes MCF-7, NCI-H460, i HepG2. El fraccionament bioguiat de l'extracte en acetat d'etil actiu va conduir a l'aïllament de cinquanta-quatre compostos, incloent-hi tres nous cardenòlids anomenats reevesiòsid J (**1**), reevesiòsid K, i epi-reevesiòsid K, tres nous sesquiterpenoides anomenats reevesiterpenol C, reevesiterpenol D, i reevesiterpenol E (**4**), i dos nous heteròsids reevesianina A (**2**) i reevesianina B, les estructures dels quals van ser elucidades per anàlisi espectroscòpica.

Reevesiòsid J (**1**) va mostrar una moderada citotoxicitat davant les línies MCF-7, NCI-H460, i HepG2, amb valors de CI₅₀ 0,39 mM, 0,12 mM, i 1,09 mM, respectivament. Reevesiterpenol E també mostrà la millor citotoxicitat selectiva davant la línia NCI-H460, amb valor de CI₅₀ 3,15 mM.

D'acord amb Hsiao i col·laboradors (2016), els fruits dessecats de *R. formosana* es van extraure amb MeOH per maceració i l'extracte es va fraccionar amb EtOAc i H₂O, amb l'obtenció de la fracció soluble en EtOAc, i la soluble en H₂O i una part insoluble. La fracció soluble en EtOAc va ser fraccionada per CC engel de sílice eluint amb un gradient de C₆H₁₄/Me₂CO i va donar quinze fraccions (E1-15).

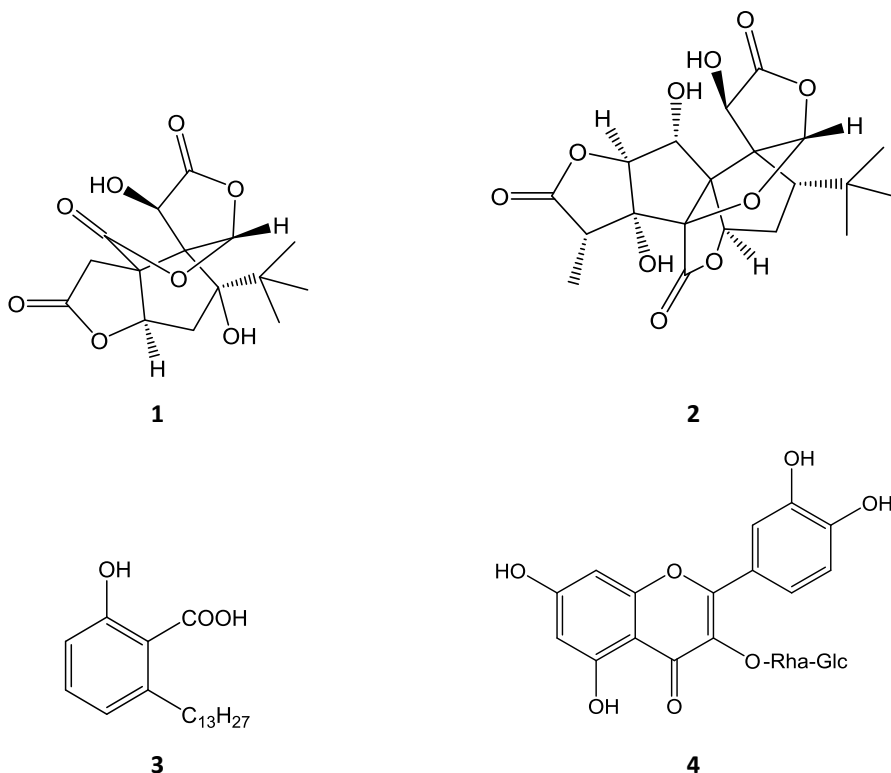
D'aquestes, les fraccions E-12 a E-15 van mostrar activitat citotòxica davant les cèl·lules assajades. Així doncs, l'aïllament bioguiat va començar amb la fracció E-12 que es va purificar per CLMP (CH₂Cl₂/MeOH, 30:1) amb l'obtenció d'onze subfraccions (E12.1-12.11). La fracció E12.4 es va fraccionar per CLMP (C18, Me₂CO/H₂O, 1:2) i va donar vuit fraccions (E12.4.1-12.4.8), i d'E12.4.5, per CLAR preparativa (C18), se'n va aïllar el compost **4**. La fracció E13 es va purificar per CC de filtració en gel (Sephadex® LH-20) eluint amb MeOH que va donar disset subfraccions (E13.1-13.17). La fracció E13.9 es va recromatografiar per CLMP (C18, Me₂CO/H₂O, 2:3) i va donar onze subfraccions (E13.9.1-13.9.11). La fracció E13.9.8 es va purificar per CCP preparativa de fase invertida C18 (MeOH/H₂O, 2:1) i va donar el compost **1**. La fracció E14 es va purificar per CC de filtració en gel (Sephadex® LH-20, MeOH) i van eluir vint subfraccions (E14.1-14.20). La fracció E14.9 es va recromatografiar per CLMP (C18) amb MeOH/H₂O (1:1) i va donar tretze subfraccions (E14.9.1-14.9.13). L'E14.9.4 per CLMP de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1) es va purificar i va donar catorze subfraccions (E14.9.4.1-14.9.4.14). E14.9.4.5 per CCP preparativa de C18 (MeOH/H₂O, 2:3) va donar el compost **5**. E14.9.4.9 es va purificar per CLMP de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) i CCP preparativa de C18 (Me₂CO/H₂O, 1:2) i s'hi va aïllar un derivat del compost **2**. Posteriorment, mitjançant CLAR preparativa sobre C18 (MeCN/H₂O, 1:3) es va aïllar el compost **2**.

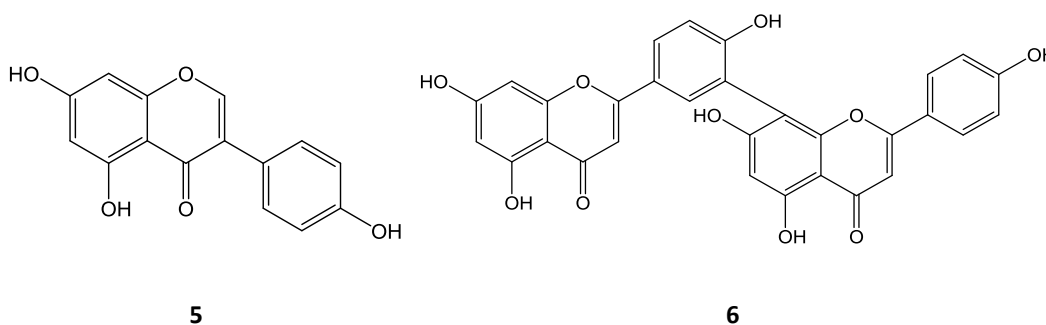
La fórmula molecular del compost **2** és C₂₇H₃₄O₁₅, determinada per ESIMS i HRESIMS (m/z 621 [M+Na]⁺). L'espectre d'¹H-RMN va mostrar senyals de dos anells aromàtics, tres protons acoblats en *meta* a δ 6,02 ppm (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H-4), 6,15 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H-6), 6,19 (1H, t,

$J = 2,1$ Hz, H-2), i un sistema ABX d'un anell benzènic a 6,89 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'''), 7,48 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-2'''), i 7,55 (1H, dd, $J = 8,4$ i $1,8$ Hz, H-6'''). Els tres grups metoxi a 3,65, 3,84, i 3,87 unitats als anells aromàtics en OCH₃-5, OCH₃-3''', i OCH₃-4''', respectivament, van ser assignats per correlacions 3J de l'anàlisi HMBC. A més, dos protons anomèrics a 4,94 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-10), i 5,54 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-1''') van suggerir la presència de dues restes de sucre. Tenint en compte el valors de J i les dades de ¹³C-RMN, i d'acord amb estudis previs (Tian *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006), les dues restes van ser identificades com a β-glucopiranosil i β-apiofuranosil respectivament. La unió 1''→2'-O va ser determinada pel fet que H-1'' es va correlacionar amb C-2' (δ 79,2) en l'espectre HMBC. A més, les correlacions d'H-2''' i H-6''' amb l'èster del grup carbonil (δ 167,0, C=O) van suggerir la presència d'un grup veratroil connectat en forma d'èster. La unió dels dos grups fenòlics i els dos sucres va ser determinada per les correlacions 3J d'H-1' amb C-1 (δ 163,2) i d'H-5''' (δ 4,32, 5''b/δ 4,34, 5''a) amb δ 167,0 (C=O) observades. El compost **2**, un heteròsid fenòlic, va ser identificat com a 3-hidroxi-5-metoxifenil-1-O-β-(5''-O-veratroil)-apiofuranosil-(1''→2')-β-glucopiranosid, i anomenat reevesianina A.

Exercici 25

De les fulles de l'espècie *Ginkgo biloba*L. (Ginkgoaceae) s'han aïllat i identificat, entre d'altres, els compostos bilobàlid (**1**), ginkgòlid B (**2**), àcid ginkgòlic (**3**), quercetina-3-O-rutinòsid (**4**), genisteïna (**5**), i amentoflavona (**6**):





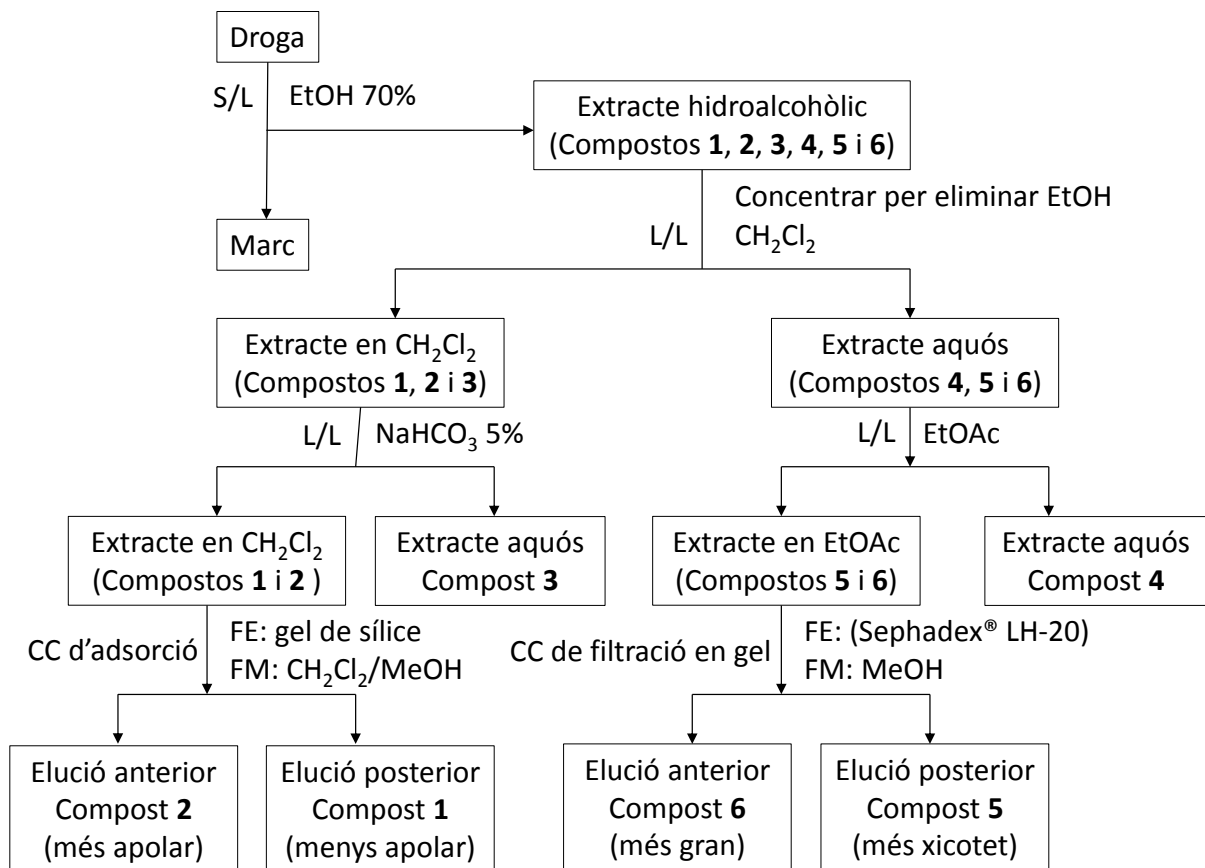
Indiqueu:

- Tipus d'estructura de cada compost i quins són els seus precursors biogenètics.
- Esquema d'extracció, purificació i aïllament dels compostos **1-6**.
- Activitat farmacològica del compost **2**.

25. Resposta

a) Els compostos **1** i **2** són terpenoides. L'**1** és un sesquiterpè (quinze carbonis) mentre que **2** és un diterpè (vint carbonis), ambdós amb tres lactones. L'origen biogenètic d'aquests compostos és la via de l'àcid mevalònic. El compost **3** (àcid ginkgòlic) és un àcid fenòlic o derivat alquil-salicílic amb una llarga cadena carbonada que deriva biogenèticament de la via de l'àcid shikímic, encara que la via dels poliacetats també podria estar implicada. En algunes espècies s'ha descrit que l'ocurrència del resorcinol (benzé-1,3-diol) i el floroglucinol (benzé-1,3,5-triol) podria ocórrer, bé a través de la condensació Knoevenagel (crotònic) que donaria l'estructura orselínica (àcid 2,4-dihidroxí-6-metilbenzoic), bé de la ciclització intramolecular tipus Claisen, que dona lloc a una floroacetofenona. La presència de l'àcid orselínic (àcid 4-hidroxí-6-metilsalicílic) en les llavors de *Ginkgo* recolza l'origen del sesquiterpè bisabolol a través de la descarboxilació. També s'hi ha descrit la formació del salicílic en sèries de quinze carbonis semblant als de l'àcid 2-hidroxí-6-metilbenzoic (àcid 6-metilsalicílic) en *Penicillium griseofulvum*. La resta de compostos **4-6** són fenòlics amb diferent esquelet. Així, el compost **4** és un *O*-heteròsid de flavonol amb dues oses unides mitjançant enllaç èter a l'hidroxil al C-3; **5** és una isoflavona, ja que l'anell B es troba al C-3, i **6** és un biflavonoide, ja que presenta dues flavones unides pels carbonis 4'-8. Aquests tres compostos fenòlics són metabòlits mixtos derivats de la via de l'àcid shikímic i de tres restes d'acetat.

b) D'acord amb els estudis publicats sobre *G. biloba*, el plantejament de l'extracció d'aquests compostos a partir de les fulles es pot fer per maceració amb etanol 70% i posterior fraccionament L/L amb diclorometà per purificar en la fase orgànica els terpens i l'àcid ginkgòlic, i deixar en la fase aquosa la resta de compostos fenòlics. L'extracte diclorometànic es fracciona L/L amb una base dèbil per solubilitzar l'àcid ginkgòlic, mentre que la fase orgànica es purifica per CC en gel de sílice amb mesclures diclorometà-acetat d'etil, eluint primer el diterpè, més apolar, i en segon lloc el sesquiterpè, més polar. Els compostos fenòlics de la fase aquosa es fraccionen L/L amb acetat d'etil per separar en la fase orgànica les genines i deixar en la fase aquosa l'heteròsid de flavonol. Les dues genines es poden purificar per CC de filtració en gel amb metanol, eluint primer el biflavonoide més gran i després l'isoflavona, més menuda.



c) El ginkgòlid B té nombrosos efectes beneficiosos per a la salut com a antiinflamatori, antial·lèrgic, antioxidant, i neuroprotector, principalment pel seu potent efecte com a antagonista del factor activador de plaquetes (PAF).

Apèndix exercici 25

Ginkgo biloba (Ginkgoaceae) és l'única espècie supervivent de la gran divisió Ginkgophyta, i es considera un fòssil vivent. Hi ha moltíssima literatura sobre l'anàlisi fitoquímica i control de qualitat de les fulles, extractes, preparats fitoteràpics i suplementes d'herbes de *Ginkgo*. La prescripció dels extractes de fulles per a millorar la circulació sanguínia, tant perifèrica com central, va començar en la dècada dels seixanta a Alemanya. Actualment, les indicacions mèdiques són claudicació intermitent, disminució de la vitalitat mental en persones majors (falta de memòria, demència primerenca, problemes de concentració), i tinnitus.

Els extractes de *Ginkgo* com a EGb761 s'han proposat també com a eventual alternativa terapèutica davant la malaltia d'Alzheimer. Però un assaig clínic (3.069 persones), doble cec de llarga duració (6,1 anys) del 2008 va demostrar que l'extracte estandarditzat EGb761 no tenia ningun efecte a l'hora de previndre la demència de qualsevol tipus. Tot i així, *G. biloba* és actualment una de les plantes medicinals més estudiada i més venuda.

Els seus principals constituents inclouen trilactones terpèniques (ginkgòlid A, B, C, J i bilobàlid), heteròsids de flavonol, biflavones, proantocianidines, alquilfenols, àcids fenòlics simples, àcid 6-hidroxikinurènic, 4-O-metilpiridoxina i poliprenols. Hi ha dos tipus d'extractes de les fulles: l'extracte complet i l'extracte estandarditzat. El primer es prepara generalment

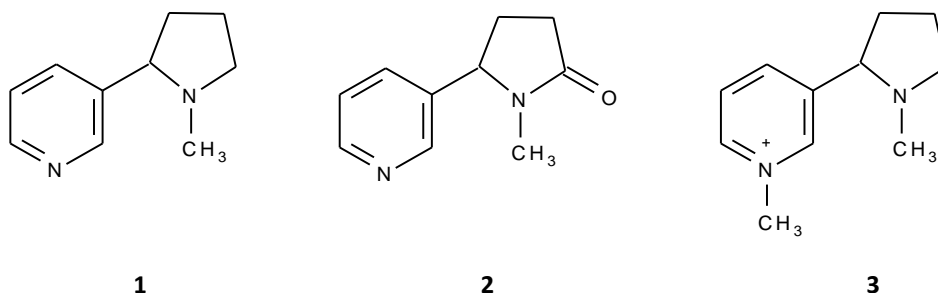
amb alcohol i conté tots els compostos solubles en aquest dissolvent. El segon, el trobat més freqüentment, conté 6% de trilactones terpèniques, 24% d'heteròsids de flavonol i menys de 5 ppm d'àcids ginkgòlics. Hi ha un gran contrast entre l'excés d'estudis sobre les trilactones terpèniques, heteròsids de flavonol, i els àcids ginkgòlics en comparació amb el reduït nombre d'investigacions sobre biflavones, proantocianidines, compostos fenòlics simples, àcids simples i altres constituents que representen l'altre 70% dels extractes estandarditzats de *Ginkgo*.

El principal mètode d'extracció dels flavonoides és per maceració amb mescles EtOH/H₂O i Me₂CO/H₂O en diferents percentatges o MeOH pur. Els ginkgòlids i bilobàlid són solubles en dissolvents orgànics polars i de polaritat intermèdia com alcohols, Me₂CO i EtOAc. Són moderadament solubles en Et₂CO i H₂O, i insolubles en dissolvents apolars com CHCl₃, toluè i C₆H₁₄. La seua solubilitat en H₂O s'incrementa significativament en augmentar la temperatura. El reflux amb H₂O o H₂O/MeOH és el procediment més utilitzat per a la seua extracció.

Nash i Shah (2015) van revisar els efectes beneficiosos dels constituents del *Ginkgo* en malalties neurològiques i cerebrovasculars. Ginkgòlid B (GB, BN52021) és el principal constituent de l'extracte EGb 761 amb una activitat més potent com a antagonista del PAF i va ser assajat clínicament per la seua eficàcia en sèpsies, esclerosi múltiple, migranya i dany per isquèmia/reperfusió seguit de transplantament. En fase III, un assaig clínic doble cec, 120 mg GB va mostrar seguretat i efectivitat per al tractament de pacients amb sèpsis severa davant el gram-negatiu, la qual cosa va ser atribuïda a les seues propietats antagonistes del PAF. Pacients tractats amb antimicrobians i GB van mostrar un descens significatiu de la mortalitat en comparació amb els pacients tractats amb antimicrobians i placebo. En un assaig aleatoritzat, l'administració de 2-10 mg/kg de GB a pacients que van ser sotmesos a transplantament de pulmó optimitzaren la funció pulmonar, atribuïda a baixes concentracions postoperatòries de PAF. La isquèmia necessària i subsegüent reperfusió de teixits trasplantats causa un dany que és amplificat pel PAF, el qual pot produir activació de neutròfils i alliberació de citocines. En aquest sentit, GB també va reduir el dany cerebral per isquèmia/reperfusió en un model animal, que va ser atribuït a una disminució de l'expressió de cathepsines B i L, i proteases lisosomals implicades en la mort cel·lular per isquèmia. Com a principal component de l'especialitat Migrasoll® (60 mg GB, coenzim Q10, riboflavina, i magnesi), GB va ser clínicament efectiu per al tractament de la migranya amb aura. L'administració de Migrasoll® a l'inici de la migranya posterior va reduir tant el temps de l'aura com la severitat de la migranya respecte al malats amb episodis inicials de migranya. Es va suggerir que la causa subjacent de la migranya és deguda en part a la hiperexcitabilitat de les neurones, possiblement per mecanismes dependents de K⁺ o glutamat. Aquesta hipòtesi es va recolzar en la milloria dels símptomes després de l'administració de lamotrigina, un blocant dels canals de Na⁺ i Ca²⁺ voltatge dependent que inhibeix l'alliberació de glutamat. L'activació presinàptica del receptor de PAF va mostrar un increment de l'alliberació de glutamat per un mecanisme encara desconegut. L'habilitat de GB per inhibir PAF i la seua influència en l'alliberació de glutamat podria explicar el mecanisme darrere de la reducció de la severitat de migranya amb GB i Migrasoll®.

Exercici 26

Les fulles d'una herba solanàcia contenen els tres alcaloides **1**, **2** i **3**



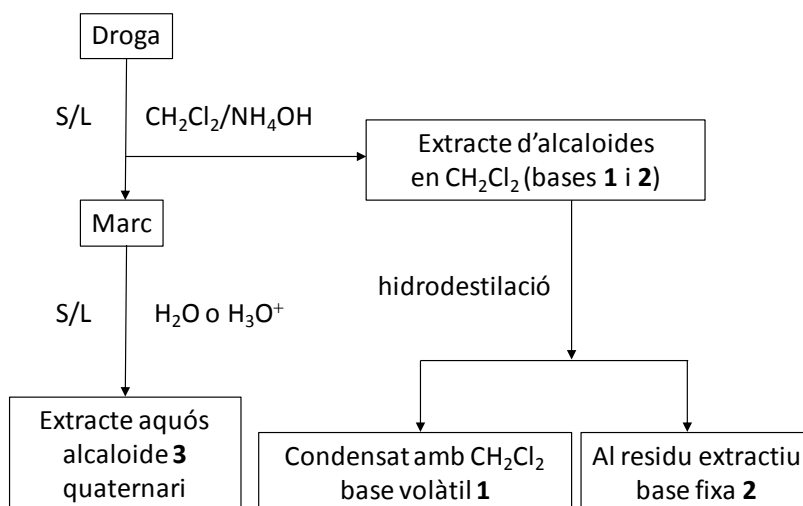
Sobre aquestes molècules, indiqueu:

- Grup fitoquímic a què pertanyen i el seu origen biosintètic.
- Un esquema d'extracció i aïllament de les tres. Assenyalau quina reacció química permet detectar la presència dels alcaloides en els extractes.
- Tres característiques espectrals d'¹H-RMN que es podrien esperar del compost **1**.

26. Resposta

a) Els tres compostos són alcaloides pirrolidínics per l'estructura de l'anell heterocíclic pentagonal *N*-metilat. A més, tenen el caràcter d'alcaloide piridínic, degut a la presència de l'anell nitrogenat aromàtic de sis membres. Considerant que la classificació biosintètica dels alcaloides es basa en els aminoàcids d'origen de metabòlits secundaris, es poden considerar els tres de l'exercici com a pirrolidínics (derivats d'ornitina), ja que la biosíntesi de l'anell piridínic forma part de rutes del metabolisme primari.

b) El procediment que teòricament podria valdre s'exposa a continuació.



La separació dels alcaloides es basa en la seua volatilitat i possible ionització. El compost **1** és nicotina, certament volàtil. L'amida **2** serà bastant menys bàsica i probablement no volàtil (*fixa*) perquè conté oxigen. A més de l'esquema anterior, i per tal de simplificar el sempre

aventurat procés de la hidrodestil·lació, se'n podrien extraure tots els alcaloides amb àcid aquós, i alcalinitzar les sals per obtenir-ne les bases, les quals s'aïllarien juntes amb CH_2Cl_2 , mentre que l'alcaloide romandria **3** en fase aquosa. Aquestes dues (**1** i **2**) se separarien per precipitació de la forma menys alcalina (**2**), la qual seria insoluble en augmentar adequadament el pH.

Les reaccions més habituals per detectar la presència d'alcaloides són les de precipitació amb sals o complexos que contenen mercuri, bismut o iode. Són reaccions de precipitació en medi àcid, entre les quals destaquen les de Dragendorff, Bouchardat, Wagner o Mayer.

La composició dels reactius és la següent:

1. Reactiu de Dragendorff: $\text{Bi}_5\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_{22}$ (nitrat bàsic de bismut o *subnitrat de bismut*) en HNO_3 barrejat amb dissolució aquosa de KI, filtrat i diluït.
2. Reactiu de Bouchardat: dissolució aquosa d' I_2 i KI, al 2 % de cadascun.
3. Reactiu de Wagner: dissolució aquosa d' I_2 al 2 %, i KI al 6%.
4. Reactiu de Mayer: dissolució aquosa de HgCl_2 (1,35 %) i KI (5 %) (Cabo i Pardo, 1974).

c) Quatre protons aromàtics entre 7,0 i 9,0 ppm; els adjacents al nitrogen piridínic estan més desplaçats a freqüències majors. Set protons de carbonis saturats (sp^3), entre 1,0 i 3,5 ppm; els adjacents al nitrogen pirrolidínic estan més desplaçats a freqüències majors; els altres sp^3 (1,0-2,0 ppm) com a multiplets, degut a l'existència de dos metilens ($-\text{CH}_2-$) adjacents. L'*N*-metil dona un singlet (3H) prop de 2,1 ppm. Aquests desplaçaments provenen de l'espectre registrat amb una dissolució en CDCl_3 .

Apèndix exercici 26

Els alcaloides volàtils

Les substàncies volàtils de les plantes tenen una distribució taxonòmica ampla, malgrat que hi ha acumulació en algunes famílies botàniques amb espècies riques en olis volàtils, coneguts també com a olis essencials. Dins aquelles famílies es troben Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, i d'altres. La volatilitat està implícita en la facilitat de vaporització, o sublimació si pertoca: una substància és volàtil quan té una alta pressió de vapor a temperatura ambient. La temperatura a la qual aquesta pressió equival a l'atmosfèrica s'anomena punt d'ebullició. Com en l'àmbit físic, l'aigua sembla ser un estàndard general; el seu punt d'ebullició podria considerar-se un llindar de volatilitat. En el camp dels alcaloides, la volatilitat és una excepció, ja que sols alguns no oxigenats i de baixa massa molecular presenten aquesta propietat i, no cal dir-ho, són líquids. L'extracció selectiva dels alcaloides volàtils es pot dur a terme per hidrodestil·lació d'una mostra o extracte alcalinitzats. Si no es treballara a pH alcalí hi hauria una gran proporció en forma d'alcaloide-sal que, per la seua ionització, no seria volàtil. El problema de la hidrodestil·lació és que l'elevada temperatura podria degradar l'alcaloide. Una altra consideració que cal tenir en compte és que quan evaporem el dissolvent orgànic usat en l'aïllament de bases, l'alcaloide volàtil podria perdre's en acompanyar el dissolvent.

Els alcaloides volàtils més coneguts són nicotina, esparteïna i cicutina. El primer d'ells té una potència farmacològica molt elevada i es troba a les fulles i altres parts de la summitat del tabac (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae). L'activitat de la nicotina és agonista colinèrgica,

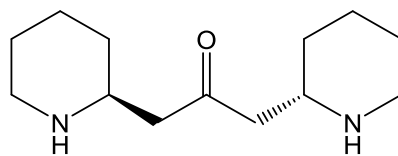
mitjançant els receptors que s'anomenen precisament *nicotínics*, i té un caràcter addictiu molt notable. La facilitat que té en vaporitzar-se està patent en l'ús que se'n fa en cigarrets. Altres alcaloides volàtils estructuralment relacionats i presents en el tabac són anabasina i anatabina, i els seus derivats desmetilats.

L'esparteïna es troba, junt amb altres alcaloides molt minoritaris, a la summitat de ginesta borda (*Cytisus scoparius* (L.) Link = *Sarothamnus scoparius* (L.) W.D.J. Koch, Leguminosae). És molt bàsica i tòxica per al sistema cardiovascular, degut al bloqueig de canals de sodi. També és agonista colinèrgica, de receptors muscarínics. La cicutina o coniiïna es troba al fruit de la cicuta (*Conium maculatum* L., Apiaceae) i va ser el primer alcaloide de la història en ser sintetitzat, en concret per Ladenburg el 1886. Com en casos anteriors, es troba a la planta acompanyat d'altres molècules semblants, també líquides. La coniiïna, des d'un punt de vista farmacològic, es pot caracteritzar com a antagonista del receptor nicotínic, cosa que li atorga poder de bloqueig neuromuscular i asfíxia (Hotti i Rischer, 2017).

Un altre alcaloide líquid no massa volàtil (punt d'ebullició 209 °C) però arrossegable per hidrodestil·lació és l'arecolina, el més important dels principis de la nou d'areca, la llavor de la palmera *Areca catechu* L., Arecaceae. Aquesta llavor, una *nou* segons la clàssica nomenclatura farmacognòstica, crea problemes de toxicitat neoplàstica en amples capes de la població de l'est d'Àsia (Holdsworth *et al.*, 1998). Per finalitzar, cabria esmentar un tipus poc freqüent d'alcaloides: els anomenats de tipus lolina, que són derivats 1-amino-pirrolizidínics amb un cicle èter addicional. Posseeixen activitat dissuasiva dels insectes i són produïts per fongs paràsits de plantes forratgeres (Schardl *et al.*, 2007).

Exercici 27

Withania somnifera (L.) Dunal (Solanaceae) és una espècie anomenada popularment ginseng de l'Índia o *Ashwagandha*. Un dels alcaloides que es troba en aquesta planta és anaferina (**1**):



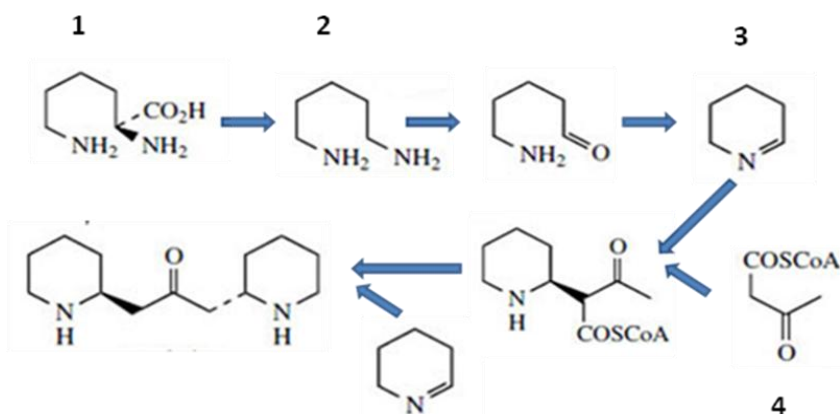
1

Amb relació a aquesta molècula:

- Proposeu un possible esquema biosintètic.
- Proposeu alguna idea sobre les seues característiques fisicoquímiques.
- Assenyaleu com podríeu identificar-la.

27. Resposta

a) Els alcaloides piperidínics, com l'anaferina, deriven de la lisina (**1**), un aminoàcid lineal dibàsic. El primer pas és la descarboxilació a cadaverina (**2**); després la desaminació oxidativa per donar 5-aminopentanal, el qual se cicla a piperideïna (**3**). Per incorporació d'acetacetil CoA (reacció tipus Männich) i una nova piperideïna, s'hi forma anaferina (Dewick, 2002).



b) Pel que fa les seues propietats fisicoquímiques es tracta d'un alcaloide bastant bàsic, ja que presenta dos grups amino secundaris fàcilment protonables, en principi. Tot i que s'assembla a alguns alcaloides volàtils, no presenta gaire volatilitat, potser degut al fet que és un compost oxigenat. El punt d'ebullició es 316 °C.

c) Dona les reaccions generals d'alcaloides, però la seua identificació no seria gens fàcil, llevat que es disposara d'una mostra comercial que permetera una immediata comparació per CCP o CLAR. L'anàlisi per ¹H-RMN indicarà 6 protons adjacents a nitrogen ($\text{RR}'\text{CH-NH-CH}_2$ -, δ 2,7-3,2 ppm), 4 adjacents a carbonil ($-\text{CH}_2\text{-CO-CH}_2$ -, δ prop de 2,5 ppm) i 12 protons més de metilens ordinaris, δ 1,4-1,9 ppm.

Apèndix exercici 27

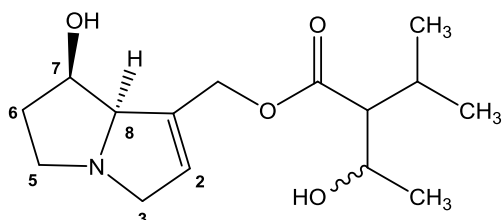
Aproximació a l'estudi d'estructures alicíclics d'alcaloides per ¹H-RMN

En el món dels alcaloides coexisteixen molècules de molt distint caire; algunes d'elles, com les derivades d'estructures fenetilamíniques o indòliques, presenten característiques químiques, analítiques i espectroscòpiques comunes amb els productes fenòlics, d'amplíssima distribució en plantes. Tanmateix, n'hi ha d'altres amb una estructura no aromàtica –derivats d'ornitina i lisina– en què el protagonisme de cara a una anàlisi d'¹H-RMN recau en els hidrògens alicíclics. Habitualment, aquest tipus de nuclis dona lloc a espectres de major complexitat degut a distints factors. Per una part, hi ha major abundància d'hidrògens, ja que hi ha més carbonis sp³; a més, hi ha major nombre d'acoblaments spin-spin, siga geminals, siga vicinals; i la rigidesa d'algunes conformacions anulars fa que existeixen hidrògens axials i equatorials amb distint desplaçament. Finalment, com que la majoria dels senyals apareixen en un estret marge de desplaçaments, hi ha una gran superposició, llevat que es disposi d'aparells amb elevats camps magnètics.

Per a marcar un punt de partença ens interessa parlar de desplaçament químic, amb el ciclohexà com la molècula de referència, el qual presenta un únic senyal sobre 1,43 ppm. El ciclopentà, una estructura també possible conceptualment en alcaloides, presenta un senyal aproximadament a 1,51 ppm, un valor molt semblant al del cicloheptà. La introducció d'un doble enllaç per a formar la molècula del ciclohexé desplaça els protons que hi intervenen en la zona olefínica, i apareixen a 5,66 ppm, mentre que els protons adjacents (α) apareixen desapantallats a 1,99 ppm, i els β a 1,61 ppm. Si un dels metilens és formalment substituït per nitrogen perquè done la piperidina, els protons adjacents apareixen, també desapantallats, a 2,81 ppm, mentre que els β se situen a 1,38 i ; els γ a 1,42, és a dir,

semblant a la situació estàndard dels cicloalcanes. Aquests últims tipus de senyals poden manifestar-se solapats pels acoblaments abans esmentats.

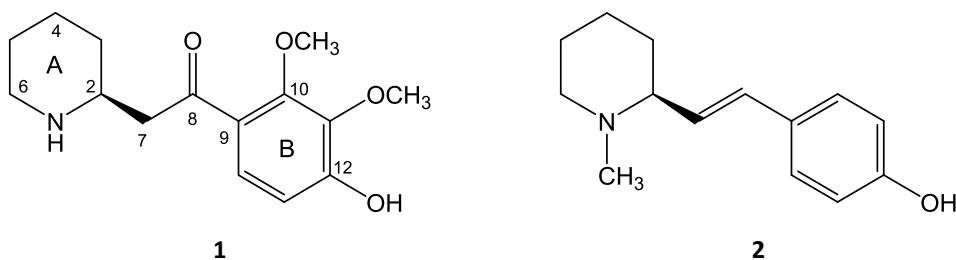
Potser és convenient continuar l'exposició d'aquests conceptes amb un exemple, el de la isohemijunceïna A, aïllada juntament amb altres alcaloides pirrolizidínics, de *Crotalaria juncea* (Fabaceae). Aquesta substància és útil per a observar la influència d'alguns trets, com l'oxigenació o la insaturació, que modifiquen la pura estructura teòrica de l'anell (Colegate *et al.*, 2012).



Començant pels senyals de menor desplaçament, els dos protons del metilè de C-6 ressonen entre 1,86 i 2,01 ppm com a multiplet representatiu dels acoblaments entre ambdós i amb els protons de C-5 i C-7. A continuació es troben els senyals de C-3 i C-5 adjacents a nitrogen: els dos de C-5 a 2,73 i 3,26 ppm; i els dos de C-3 a 3,40 i 3,92 ppm, ja que els últims són adjacents també a doble enllaç. El protó de C-8, l'únic flanquejat per nitrogen i alcohol, s'observa a 4,16 ppm. El protó del metí alcohòlic (C-7) apareix a 4,29 ppm, mentre que el protó olefínic (C-2) ho fa a 5,85 ppm. Els acoblaments de major magnitud que s'observen per als protons geminals a C-5 ($J=11,6$ Hz) i C-3 ($J=15,4$ Hz), seguits pels acoblaments vicinals 5u-6 (dd $J=9,1$ i $6,0$ Hz) i 3u-2 ($J=7,4$ Hz). Les lletres u/d són les inicials de les paraules *upfield* i *downfield*, que signifiquen a freqüències (desplaçaments) menors o majors, respectivament.

Exercici 28

Ali i Khan (2008), de la Universitat de Mississipi, van descriure el 2007 dos nous alcaloides piperidínics (**1** i **2**), obtinguts de les arrels de *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. (Berberidaceae).



L'espectre d' ^1H -RMN d'un d'ells mostrava els senyals següents: 7,20 d; 6,45 d; 3,79 s (3H); 3,78 s (3H); 3,18 m; 3,16 m; 2,95 d; 2,78 ddd; i sis multiplets entre 1,0 i 2,0. Les xifres expressen δ en ppm (tetrametilsilà = 0).

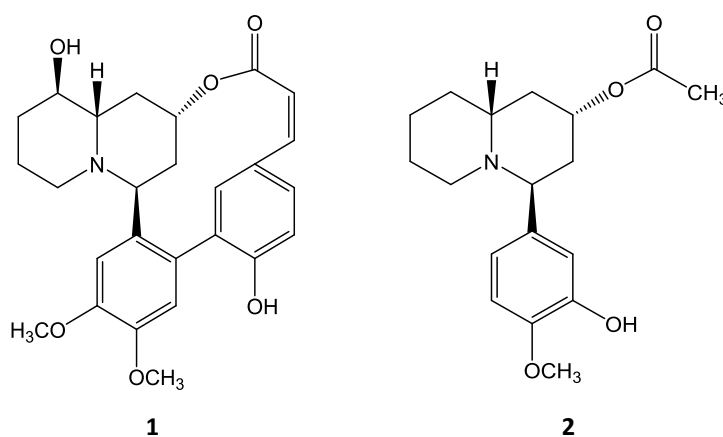
Justifiqueu a quina molècula correspon i quines modificacions espereu de l'espectre de l'altre compost.

28. Resposta

Sense fer una anàlisi massa exhaustiva, es pot observar que la presència de dos singlets (3H), entre 3,70 i 4,00 ppm, indica que hi ha dos grups metoxi aromàtics. Per tant, les dades són de la substància **1**. A més, hi ha dos doblets en la zona d'aromàtics, 7,20 i 6,45 ppm, de l'anell B. El compost **2** hauria de mostrar un senyal del *N*-metil (singlet a 2,31 ppm, efectivament) i dos doblets iguals corresponents a les posicions aromàtiques 10/14 (7,17 ppm) i 11/13 (6,78 ppm) de l'anell B (Ali i Khan, 2008).

Exercici 29

Els alcaloides **1** i **2** han estat identificats a les fulles de l'espècie *Heimia salicifolia* (Kunth) Link (Lythraceae), un arbust amb propietats psicoactives que creix des de Texas fins a Uruguai (Rumalla *et al.*, 2008).



En relació amb aquestes molècules es demana que indiqueu:

- Els esquelets químics que potser integren els principis formulats.
- L'origen biosintètic de la part nitrogenada.
- Les diferències espectroscòpiques que s'hi podrien observar en ^1H -RMN.

29. Resposta

a) Dins el compost **1** es poden distingir tres esquelets. Primer, l'estructura bicíclica en què es comparteix un nitrogen (quinolizidina). Segon, quan se substitueixun hidroxil en la posició 2, hi ha un ester d'un àcid cinàmic, en concret de l'àcid *para*-hidroxicinàmic. A més, s'observa un grup benzènic que es troba unit, tant a la part quinolizidínica, com a la cinàmica. Aquest últim tret li atorga el caràcter d'ester d'àcid bifenílic. El compost **2** conté l'estructura fenil-quinolizidínica, amb un éster acètic, simplement.

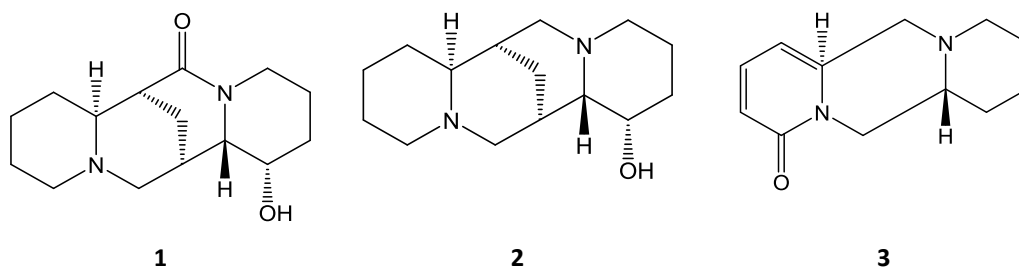
b) Les quinolizidines deriven de la Δ^1 -tetrahidropiridina (Δ^1 -piperideïna), la qual prové de la descarboxilació de la lisina, que dona la diamina lineal cadaverina, la qual s'oxida i es cicla (Frick *et al.*, 2017).

c) La molècula **1** té cinc protons aromàtics i dos metoxils aromàtics; la **2** en té tres i un, respectivament. També presenta un metí alcohol·lic (-CH₂OH-) a 3,52 ppm, i dos protons olefínics a 5,76 ppm i 6,74 ppm del grup etenil adjacent al grup carboxílic. La molècula **2**,

bastant més simple, es podria diferenciar clarament pel metil de l'acetil ($-\text{COCH}_3$) a 2,03 ppm (Rumalla *et al.*, 2008).

Exercici 30

De les parts aèries de *Genista ephedroides* (DC.) (Leguminosae) recol·lectades al Capo Testa (Sardenya), Pistelli i col·laboradors (2001) van poder aïllar, entre d'altres, els compostos 17-oxoretamina (**1**), retamina (**2**) i anagirina (**3**):



El procediment d'obtenció va partir de l'extracció successiva amb hexà, diclorometà i metanol en un aparell tipus soxhlet. Encara que es va procedir a una elemental separació de substàncies bàsiques presents en els extractes, els compostos **1-3** es van obtenir de l'extracte diclorometànic intacte, per CC en Sephadex[®] LH-20, eluint amb metanol-diclorometà (9:1). Després van ser identificats per CG-EM.

En relació amb aquest estudi es demana:

- Proposar raonadament quin seria l'ordre d'elució en CG-EM.
- Si creieu justificada l'elecció d'aplicar l'esmentada tècnica de CC.
- Indicar a quin grup de metabòlits secundaris pertanyen les molècules en qüestió.
- Suggerir com es podrien diferenciar els compostos **2** i **3** per ^1H -RMN.

30. Resposta

a) L'ordre d'elució en CG no és fàcil de predir. Nogensmenys, hi ha dos factors bastant clars, un d'ells és el grau d'oxigenació i l'altre el grau d'insaturació, ambdós augmentant la retenció per a una menor volatilitat. Així doncs, amb aquesta senzilla idea, el compost **2** seria el de menor retenció a la columna. Entre **1** i **3**, hi ha un contrast de funcions químiques favorables i desfavorables a la volatilitat, però la molècula **3**, anagirina, presenta un detall de quasi-aromaticitat, l'anell dihidropiridinona, que hauria d'augmentar el temps de retenció en comparació amb un anàleg saturat. En efecte, l'índex de retenció en CG, índex de Kovats, publicat pels autors de l'article de referència, és el següent: **2**) 2008; **1**) 2278; **3**) 2405.

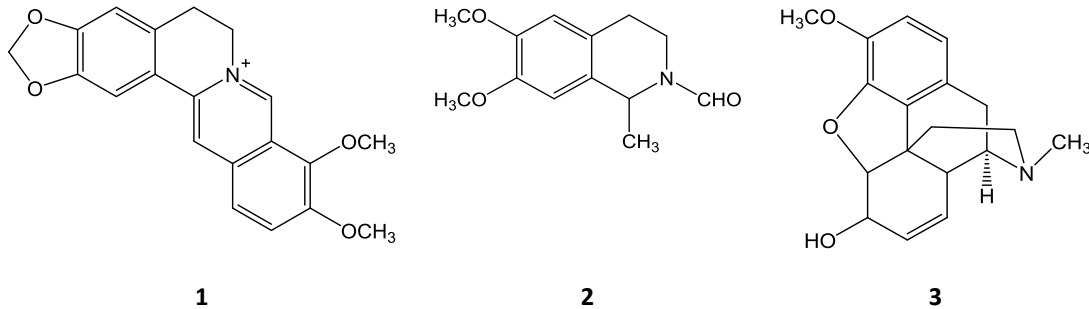
b) L'elecció de la tècnica de cromatografia amb Sephadex[®] LH-20 no es basa en el tipus de metabòlit secundari de què es tracta. Alguns alcaloides se separen, o en gel de sílice o en alúmina. La principal finalitat, que no casa amb l'exemple, és la separació de mides moleculars diferents. Tanmateix, se sol utilitzar per purificar compostos separats primàriament amb altres mitjans cromatogràfics, ja que en general el solut no queda gaire retingut.

c) Els tres alcaloides són de tipus quinolizidínics, corrents en espècies de la família Leguminosae.

d) El compost **3** presentarà tres protons olefínics (δ 6,0-7,5 ppm) i el **2** cap. Per contra, **2** presentarà un protó unit a carboni alcohòlic secundari (δ *circa* 3,5 ppm).

Exercici 31

A partir d'una espècie botànica s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:

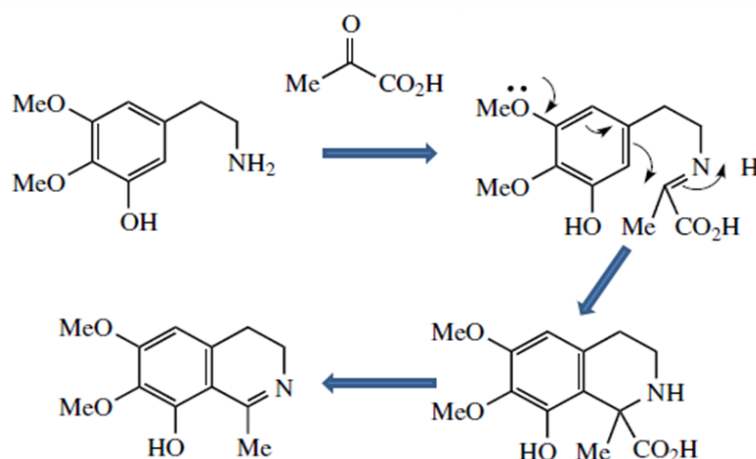


Indiqueu:

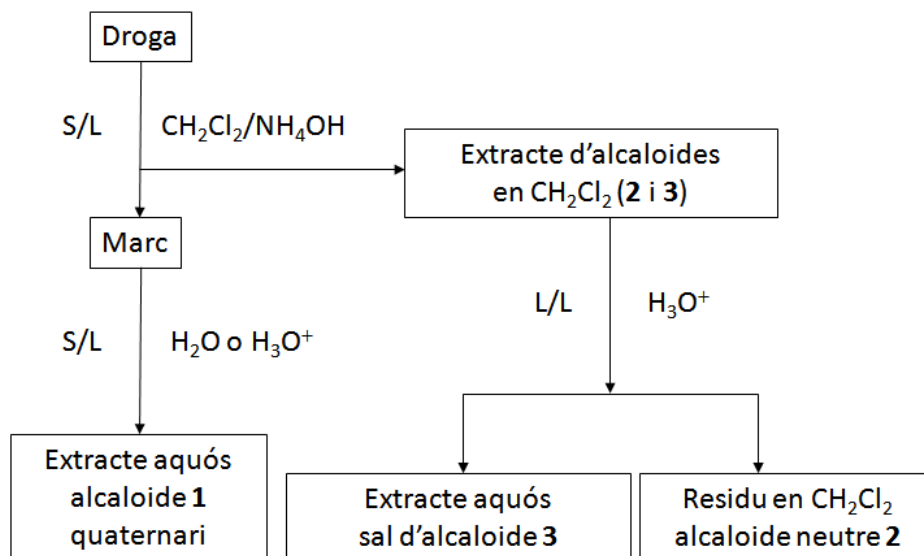
- Els precursors biogenètics i el grup a què pertanyen, dins les isoquinolines.
- Un procediment tècnic per tal d'arribar a la separació i purificació dels tres.
- Alguna droga que possiblement en continga algun i el seu potencial interès terapèutic.

31. Resposta

a) Els compostos **1** i **3** són benzilisoquinolines i la seua síntesi parteix de la dopamina. La biogènesi d'aquestes molècules s'inicia amb la síntesi, via fenilpropanoïdes, dels aminoàcids fenetilamínics (fenilalanina i tirosina). El grup amino de la dopamina es condensa amb un aldehyd obtingut per desaminació oxidativa, per a formar l'estructura benzil-isoquinolínica. Tanmateix, el compost **2** és una isoquinolina simple i la formació de l'anell heterocíclic ocorre mitjançant la participació d'àcid pirúvic, com es veu en l'esquema següent, basat en Dewick (2002).



b) L'extracció i separació podria seguir l'esquema següent:

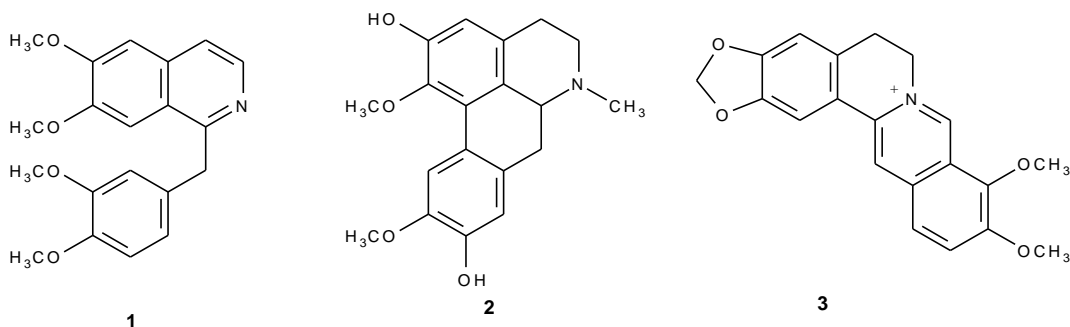


L'alcaloide neutre és el **2**, ja que la substitució *N*-formil és una de les que lleva basicitat a l'amina, com passa també en els *N*-òxids i les amides.

c) El compost **1** és berberina, present en espècies de *Berberis* (Berberidaceae), *Coptis* (Rutaceae), o *Argemone* (Papaveraceae), entre altres taxons. El compost **3** és codeïna, present en *Papaver* sp. (Papaveraceae). La planta, coneguda com a coralet o coralets (*Berberis vulgaris*), és útil en la síndrome metabòlica, malalties cardiovasculars, hiperlipidèmia i processos infecciosos. Del gènere *Papaver*, es compta amb l'herba dormidora, *P. somniferum*, rica en alcaloides benzilisoquinolítics; fenantrènics, analgèsics i antitussígens, com codeïna o morfina i no fenantrènics, com papaverina, espasmolític, o noscapina, antitussígen (Imenshahidi i Hosseinzadeh, 2016).

Exercici 32

Una droga obtinguda d'una planta de la família Berberidaceae conté els tres principis següents:



Amb relació a les seues característiques, indiqueu:

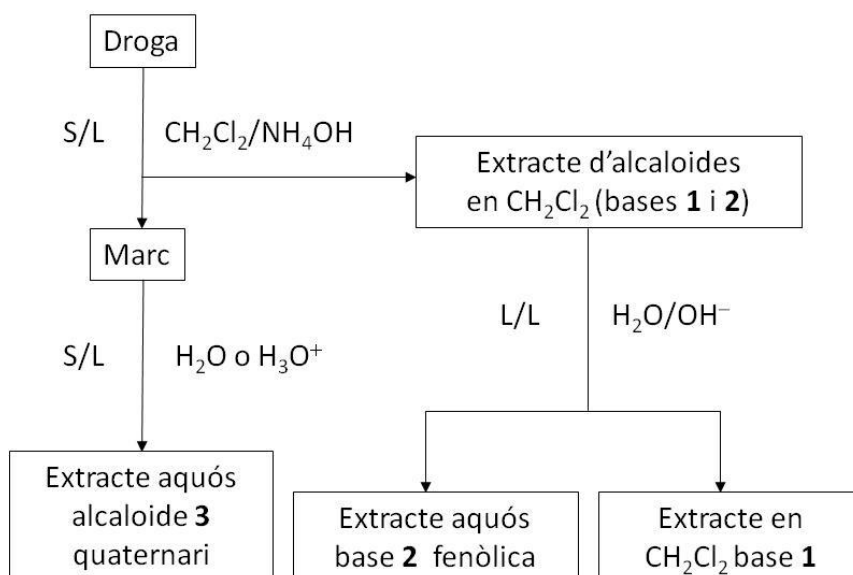
- El grup fitoquímic a què pertany cadascun d'ells.
- Dos dels possibles precursors biogenètics significatius.
- Un procés d'extracció i aïllament dels tres principis a partir de la droga.

32. Resposta

a) En el més ampli sentit, els tres alcaloides són benzilisoquinolíncics. El primer és una benzilisoquinolina simple; el segon una aporfina i el tercer una protoberberina. S'ha d'observar que el compost **3** té un carboni estructural addicional, el que uneix l'anell benzil amb el nitrogen.

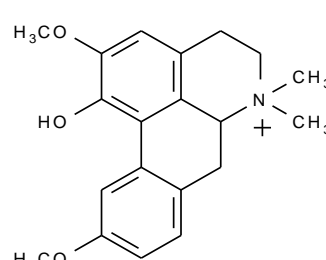
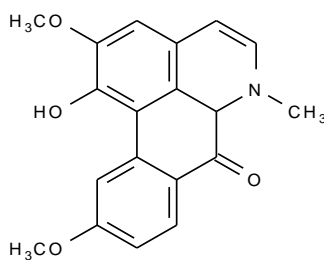
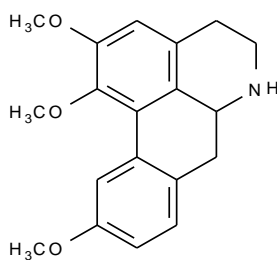
b) L'estructura benzilisoquinolíncica deriva a llarg termini de l'àcid shikímic, i de manera més immediata de la dopamina (*orto*-dihidroxifenil-etilamina).

c) La droga, habitualment dessecada i triturada, s'humiteja amb un àlcali moderat com l'amoniac aquós i s'extrau amb diclorometà. De tal mode, s'obtenen els alcaloides amb caràcter d'amina terciària, de baixa polaritat. La separació de les bases **1** i **2** es pot aconseguir solubilitzant la que té l'hidroxil aromàtic lliure en medi alcalí fort. L'alcaloide amina quaternària **3**, que està ionitzada constitutivament, podria extraure's amb aigua o amb alguna dissolució diluïda d'un àcid, a partir del marc de la primera extracció. Podria seguir-se el següent esquema extractiu:



Exercici 33

En les fulles d'una lauràcia, recollida a la selva de Borneo, s'hi troben els alcaloides següents:



2

3

1

Indiqueu:

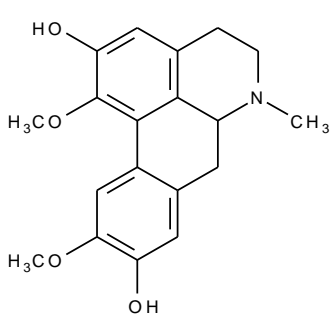
- Tres molècules farmacològicament actives que tinguen el mateix origen biogenètic.
- Un esquema d'extracció i aïllament dels tres principis a partir de la droga.
- Alguns dels senyals observables en l'espectre d' ^1H -RMN del compost **2**.

33. Resposta

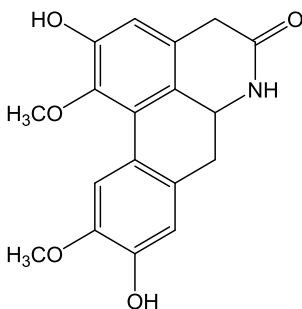
- Els tres alcaloides són, de fet, benzilisoquinolines, en concret aporfines. Algunes benzilisoquinolines destacades són la papaverina, que és simple o oberta, la boldina (aporfina), o la morfina (fenantrènica). Les accions farmacològiques d'aquestes són: espasmolítica, protectora hepàtica i hipnoanalgèsica respectivament.
- Es pot aplicar l'esquema de separació de l'exercici 32, respectant-ne el caràcter fenòlic, no fenòlic, i quaternari; i no els números assignats a les molècules.
- Quatre senyals de protons aromàtics, singlet un d'ells (H de l'anell benzènic de la isoquinolina), i altres tres de l'anell benzil: doblet *orto*, doblet *meta*, i doblet *orto/meta*. A més, dos doblets de la cadena etilamina, que apareixeran en la zona aromàtica igualment. Els metils del metoxi i de la metilamina seran singlets (3H), prop de 4 ppm el primer, entre 2 i 3 ppm el segon.

Exercici 34

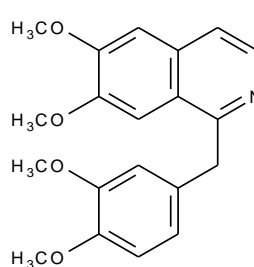
Una droga vegetal conté, entre d'altres, els tres alcaloides següents:



1



2



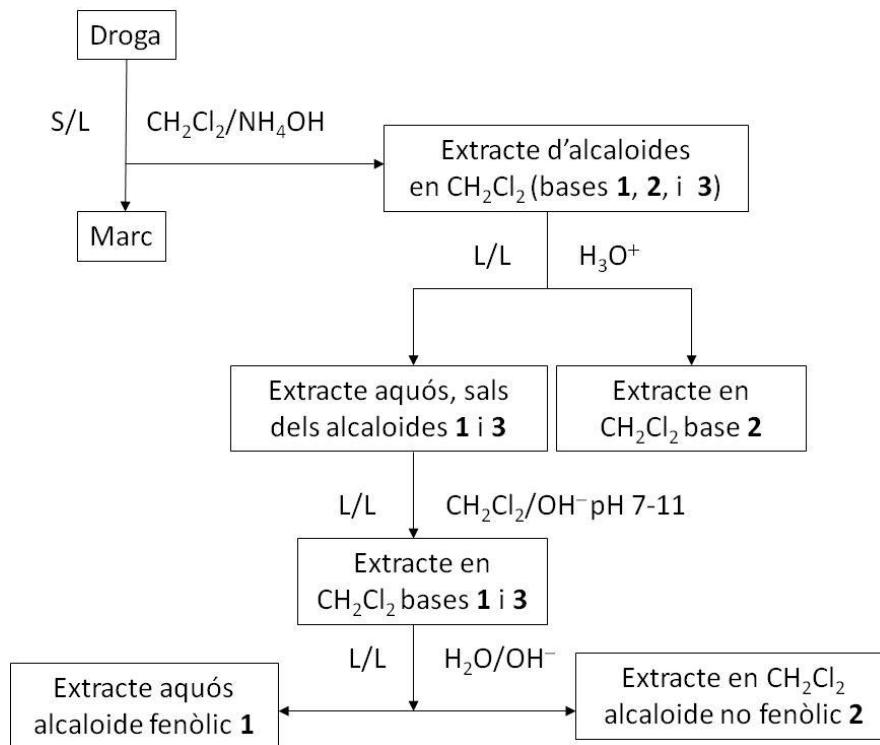
3

Respecte a aquestes molècules, indiqueu:

- Quins en serien els precursors biogenètics més destacats.
- Un esquema d'extracció i aïllament dels tres principis.
- Alguna droga que en continga algun d'ells i quina utilitat terapèutica té.

34. Resposta

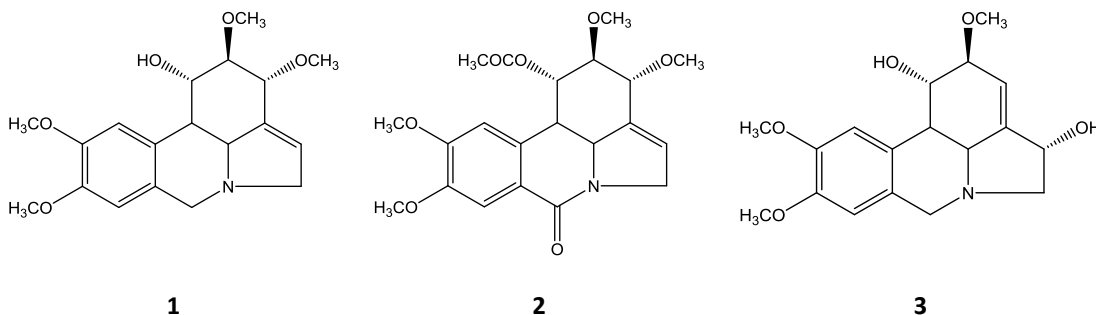
- Els tres alcaloides són bezilisoquinolínic. Per tant, els trets de la seua biosíntesi coincideixen amb l'explicació de l'exercici 31.
- Per a l'extracció, s'observa que hi ha tres tipus diferents d'alcaloides: **2** és una amida neutra; **1** és un alcaloide fenòlic; i **3** és un alcaloide no fenòlic. El següent procediment permetria separar-los.



c) L'opi, droga-producte obtinguda del fruit de *Papaver somniferum*, conté l'alcaloide **3**, papaverina. La principal activitat farmacològica de l'opi és l'analgèsica i euforitzant, les quals no coincideixen amb les de papaverina, en què predomina l'espasmolítica. Tanmateix, aquesta última modula favorablement les de l'opi, particularment pel que fa a l'efecte contactor d'efínters de la morfina, alcaloide majoritari (Holzer, 2009).

Exercici 35

En un estudi col·laboratiu entre investigadors de les Universitats d'Alacant, Barcelona i Kwa Zulu-Natal (Pietermaritzburg), Pigni i col·laboradors (2102) van publicar l'aïllament dels alcaloides 3-O-metilnarcissidina (**1**), 1-O-acetil-6-oxo-3-O-metilnarcissidina (**2**), i 11-hidroxigalantina (**3**), a partir de la summitat de *Narcissus serotinus* L. (Amaryllidaceae), recol·lectada prop de Vinaròs.



Per tal d'extraure el material vegetal es va utilitzar àcid sulfúric al 2%, metanol, èter etílic, hexà, i acetat d'etil. Amb la finalitat de separar els distints alcaloides es va aplicar la cromatografia líquida per buit (VLC), amb gel de sílice com a fase estacionària.

Contesteu:

- a) Quin creieu que seria un ordre lògic del dissolvents extractius?
- b) Quins dissolvents podrien servir per a l'elució en VLC?
- c) Cóm distingiríeu per $^1\text{H-RMN}$ els compostos **1** i **3**?

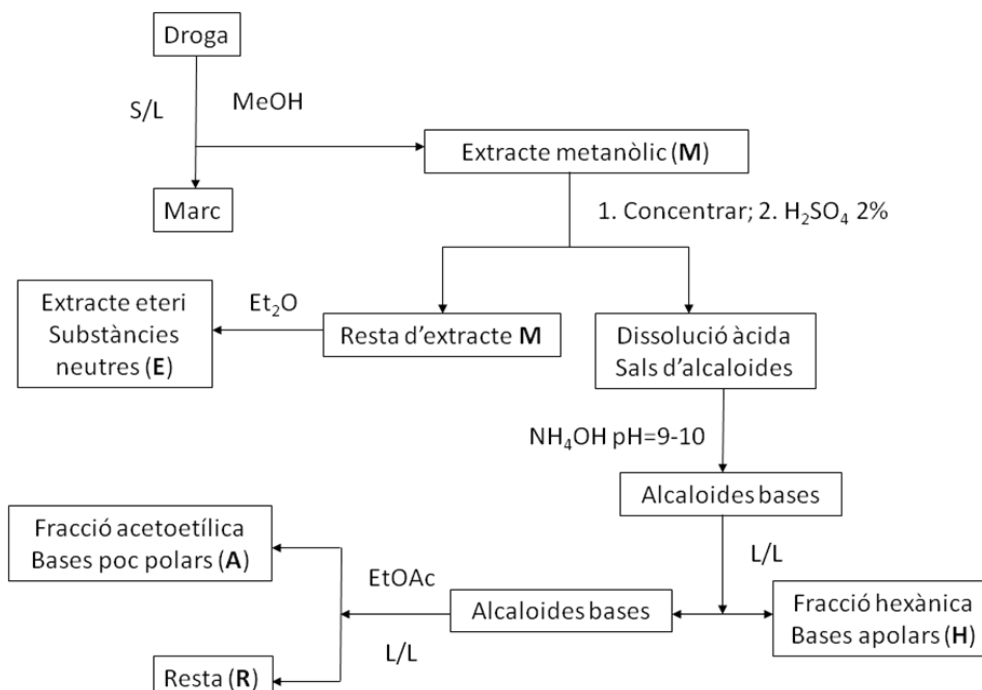
35. Resposta

a) En general, l'extracció seqüencial amb dissolvents, com sembla haver-se aplicat en l'exemple, es realitza per ordre de polaritat creixent. Per tant, es podria pensar que seguiria l'ordre següent: hexà – èter – acetat d'etil – metanol – àcid sulfúric aquós. Tanmateix, en tractar-se d'un procés d'obtenció d'alcaloides, és impensable que l'extracció amb l'àcid vaja al final, ja que això podria fer que el conjunt d'alcaloides es disseminara per diferents extractes.

Es podria pensar en una extracció inicial amb l'àcid aquós, per a seguir amb la corresponent alcalinització per tal d'obtenir els alcaloides en forma de base, els quals sí que podrien extraure's L/L amb dissolvents de polaritat creixent. El problema és que en aquest punt no casa el metanol, inhàbil per a actuar en particions L/L per la miscibilitat que presenta amb l'aigua. És per això que no es pot ubicar el metanol tampoc al final.

Una possibilitat seria usar la gran capacitat extractiva que té el metanol per a fer una extracció inespecífica, diguem-ne total, en primera instància, per a treballar amb aquest extracte metanòlic com si de droga es tractara, amb els criteris anteriors. La realitat, consultada en l'article de Pigni *et al.* (2012), és així en línies generals. Una cosa varia: l'èter no es va incloure en la seqüència de la partició L/L, sinó que va servir per a dissoldre compostos neutres poc polars.

El resum seria aquest:

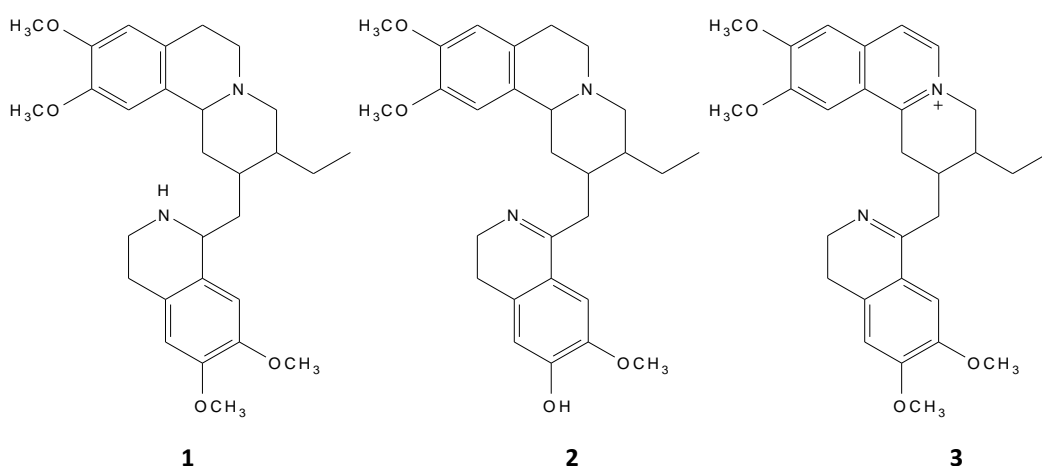


b) L'elució d'una CC de gel de sílice (fase estacionària polar) es du a terme amb dissolvents de polaritat mitjana-baixa. Per exemple, amb un dissolvent apolar com hexà o diclorometà, barrejat amb quantitats menudes, i generalment creixents d'un dissolvent més polar com acetat d'etil, acetona o metanol; aquest últim en proporcions baixes, sobretot al principi.

c) El compost **1** va presentar quatre senyals de metoxils (dos d'aromàtics, i dos d'alicíclics); i el **3**, tres (dos d'aromàtics, i un d'alicíclic). El compost **3** va mostrar dos senyals de protó unit a carboni alcohòlic secundari, i el compost **1**, sols un. A més, el protó olefínic del compostos **1** i **2** va aparéixer com a doblet; i el del compost **3**, com a doblet.

Exercici 36

Els compostos **1**, **2** i **3** són alcaloides que es troben en diverses espècies tropicals de la família Rubiaceae.



Amb relació als tres alcaloides, indiqueu:

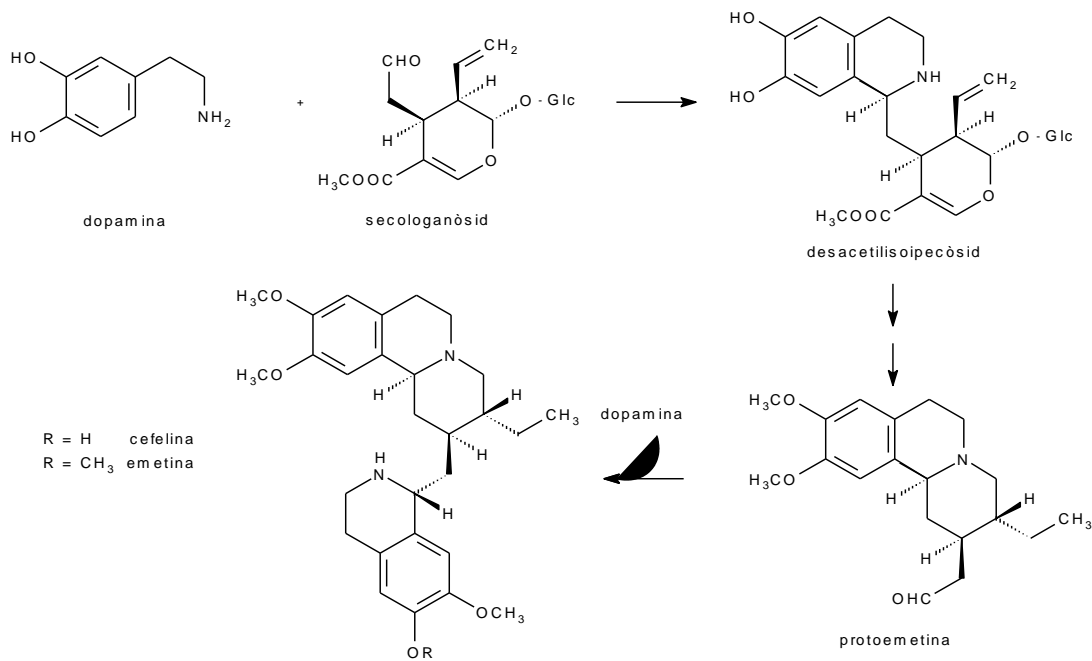
- De quins tàxons provenen i quina activitat farmacològica creieu que posseeixen.
- El seu origen biosintètic.
- Un procediment d'extracció i aïllament dels tres principis.

36. Resposta

a) L'estructura d'aquests compostos és la dels alcaloides bisoquinolínic. Més precisament, s'haurien de designar com a isoquinolinmonoterpènics per descriure un poc millor la seua naturalesa química originària, la qual es veu a l'apartat següent. D'acord amb les dades quimiotaxonòmiques a l'abast, la seua distribució es correspon amb certes espècies dels gèneres *Cephaelis* i *Psychotria*, ambdós de la família Rubiaceae. Les drogues associades són les arrels de les ipeques o ipecacuanes.

Les activitat farmacològiques d'aquests alcaloides son emètica i antiprotozoària.

b) Com es veu a continuació, l'estructura es forma a partir de la dopamina –la qual prové de tirosina–, i d'un iridoide (secologanòsid). Per tant, el seu origen és mixt: fenetil-aminoàcid i àcid mevalònic.



c) Com s'ha explicat en l'exercici 32.

Apèndix exercici 36

La varietat dels alcaloides de les rubiàcies

Quan s'estudien els alcaloides, tant si es consideren únicament els d'interès farmacèutic, o tots en conjunt, hi apareix una gran varietat de molècules obtingudes de membres de la família Rubiaceae. Això crida l'atenció i indueix a pensar que es tracta d'un taxon privilegiat sota aquest punt de vista. Aquesta primera suggestió hem de mitigar-la somerament, ja que es tracta d'un grup botànic molt voluminós, en concret la tercera família de les plantes pel seu nombre d'espècies. Es consideren més de 13.500 espècies acceptades en l'àmbit de la nomenclatura botànica que ocupen tot el món sense deixar buit cap terreny, per extrem que siga climàtica- o edàficament, i conté tant espècies herbàcies, com lianes, arbusts, o arbres (<http://www.theplantlist.org/browse/A/Rubiaceae/>; accés el 18 de setembre de 2018). Pel que fa la morfologia, en una família tan extensa és difícil generalitzar i, si atenem al criteri de Lorence i Taylor (2012), podria ser diagnòstica la concurrència de fulles oposades o verticil·lades amb estípules interpeciolars, corol·la gamopètala i ovari ínfer. Les rubiàcies s'inclouen dins l'Ordre Gentianales i subclasse Asteridae. Segons el sistema IV de l'Angiosperm Phylogeny Group (2016), les Gentianales s'inclouen amb set ordres més dins el clade euastèrids I (lamíids). Pel que fa la divisió interna de la família, se'n consideren tres subfamílies: Cinchonoideae, Ixoroideae i Rubioideae. La màxima diversitat apareix a Amèrica del Sud, Àfrica i la veïna illa de Madagascar.

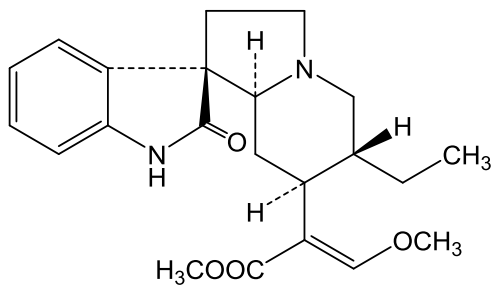
Dins de la família, s'hi troben espècies bioactives o medicinals com les ipecacuanes (exemple: *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich, ulteriorment descrita com a *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson), amb alcaloides bisoquinolíncics; les quines (*Cinchona* spp.), amb alcaloides quinolíncics; el iohimbe (*Pausinystalia yohimbe* (K. Schum.) Pierre ex Beille), amb alcaloides de tipus iohimbà; el café (*Coffea* spp.), amb pseudoalcaolides purínics; la chacruna

(*Psychotria viridis* Ruiz & Pav.), amb alcaloides carbolínics; o el kratom (*Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.), amb corinanteans. Totes aquestes relacions estan simplificades, ja que en alguns casos la varietat d'estructures per a un determinat gènere és major.

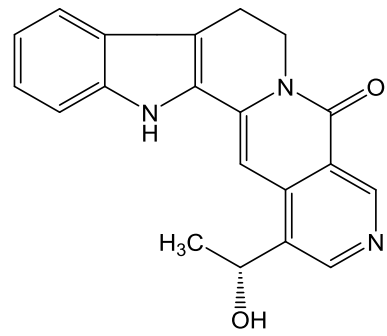
A més de les espècies anteriors, tan destacades, i sobre les quals pot trobar molta informació en els llibres de text de farmacognòsia, la família compta amb moltes més espècies que proporcionen alcaloides menys coneguts, i dotats de valor farmacològic i quimiotaxonòmic. Així, en les Cinchonoideae, amb els esmentats alcaloides de *Cinchona*, hi coexisteixen alcaloides derivats hiperconjugats de l'heteroiohimbà, com nauclina (1) de *Nauclea officinalis* (Pierre ex Pit.) Merr. & Chun; o anàlegs piridínics, com angustolina (2) de *N. subdita* (Korth.) Steud. Dins dels alcaloides indòlics no carbolínics es troba, entre d'altres, la rincofil·lina (3), d'*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.

Les Ixoroideae, la subfamília en què s'ubica *Coffea*, són, per altra part, ben pobres en alcaloides i molt riques en iridoides, els seus habituals precursors biosintètics. Entre les seues particularitats trobem una reminiscència dels alcaloides de *Cepaehelis*, com la tubulosina (4), de *Pogonopus speciosus* (Jacq.) K. Schum. De *Myrioneuron nutans* Wall. ex Hook. f. s'ha obtingut l'alcaloide myrobotinol (5), amb una infreqüent estructura oxazínica derivada de la lisina.

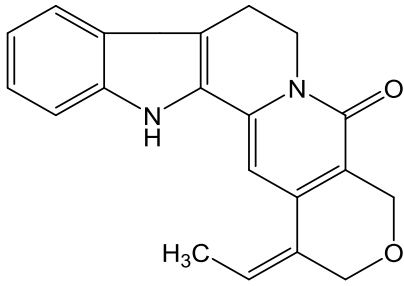
A les Rubioideae es troba una certa preponderància d'alcaloides d'estructura carbolínica unida a una part monoterpènica "crua", si es permet l'expressió, com seria el cas de la capitellina (6), d'*Hedyotis capitellata* Wall. ex G. Don, o umbel·latina (7) de *Psychotria umbellata* Thonn. També s'hi donen corinanteans més estàndard, com la vallesiachotamina (8), de *Palicourea rigida* Kunth (Martins i Nunez, 2015).



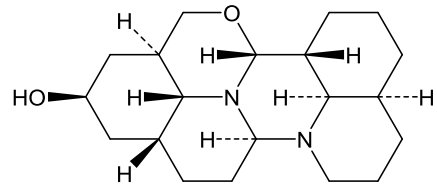
1



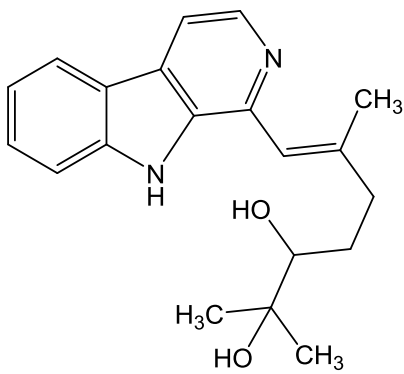
2



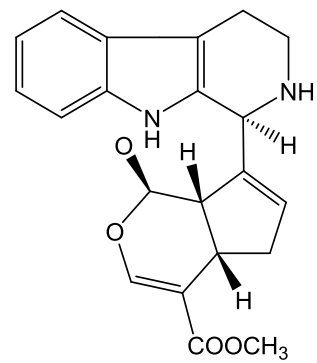
3



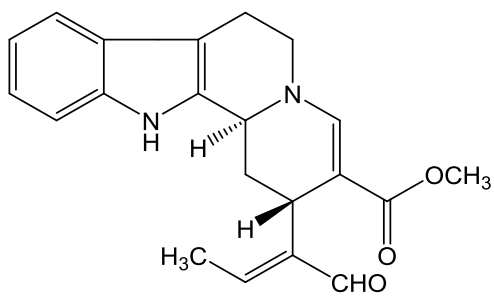
4



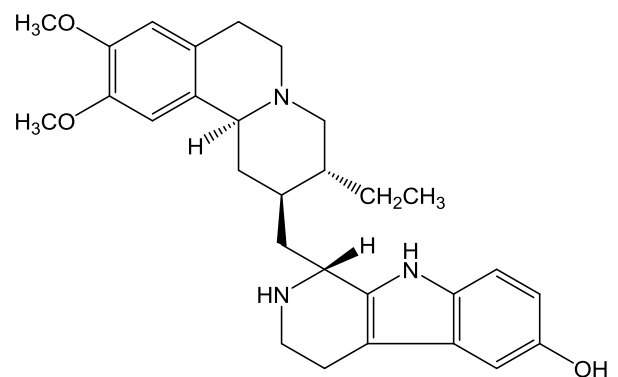
5



6



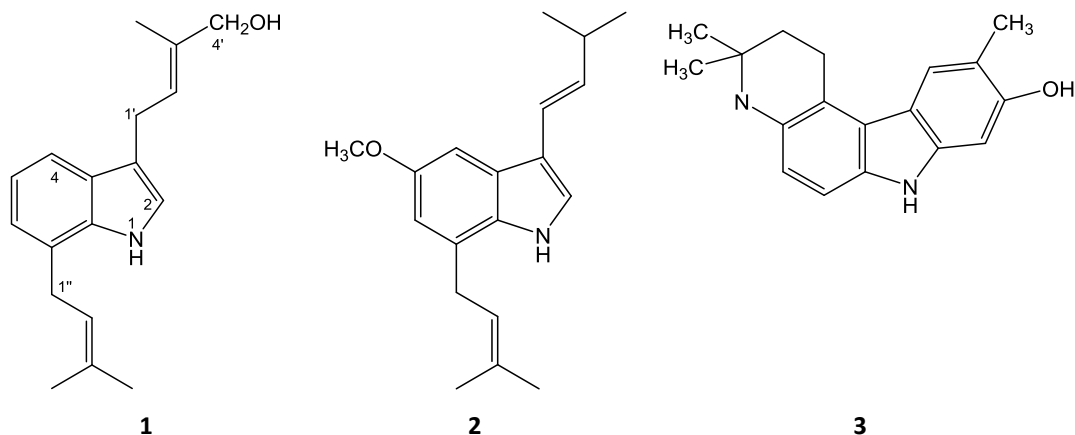
7



8

Exercici 37

Els compostos **1** i **2** foren aïllats a partir de les tiges i fulles de l'espècie *Glycosmis montana* Pierre (Rutaceae) per Wang i col·laboradors (2005). Suposeu que en el curs d'una reinvestigació d'aquesta planta es trobava una xicoteta quantitat de l'alcaloide **3**, possiblement nou en la natura.



Es demana suggerir alguna orientació sobre els apartats següents:

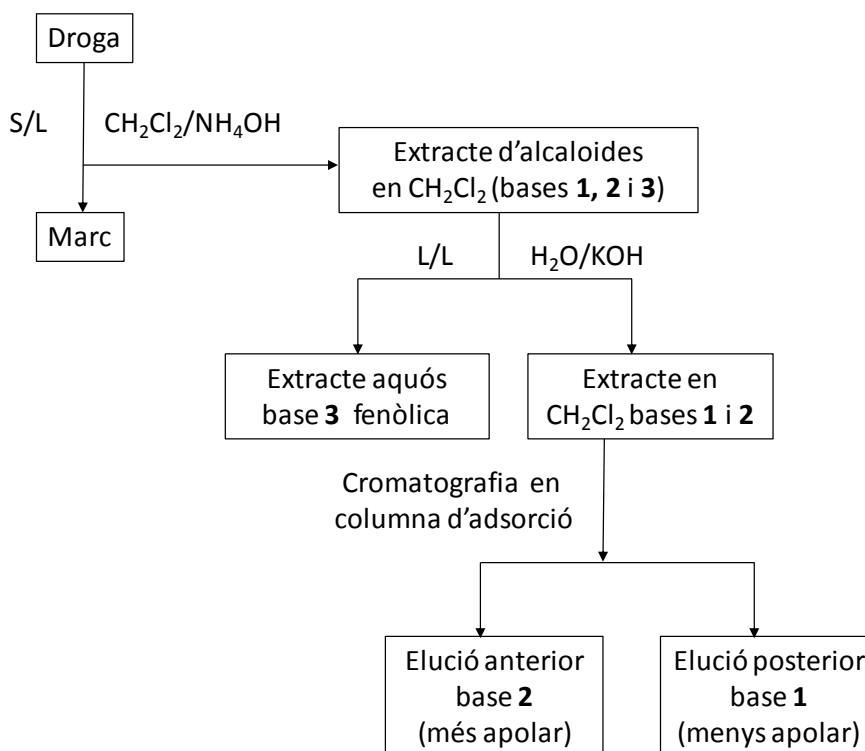
- Quin procés d'extracció i separació podria dissenyar-se?
- Com es podria distingir **3** d'**1** per $^1\text{H-RMN}$?

Les dades espectroscòpiques d' $^1\text{H-RMN}$ per a l'alcaloide **1** són les següents:

	δ_{H} (J en Hz)	δ_{H} (J en Hz)	δ_{H} (J en Hz)
1	9,77 br s	1' 3,47 d (7,2)	1'' 3,56 d (7,1)
2	7,04 br s	2' 5,69 (m)	2'' 5,43 m
4	7,38 d (7,5)	4' 3,97 br s	4'' 1,74 s
5	6,94 dd (7,5;	5' 1,73 s	5'' 1,78 s
6	7,2)6,92 d (7,2)		

37. Resposta

- Els tres alcaloides són bases molt dèbils, diisoprenilindòliques. La separació dels compostos **1** i **3** sembla, a priori, difícil mitjançant dissolvents. Podria seguir-se el següent procediment:

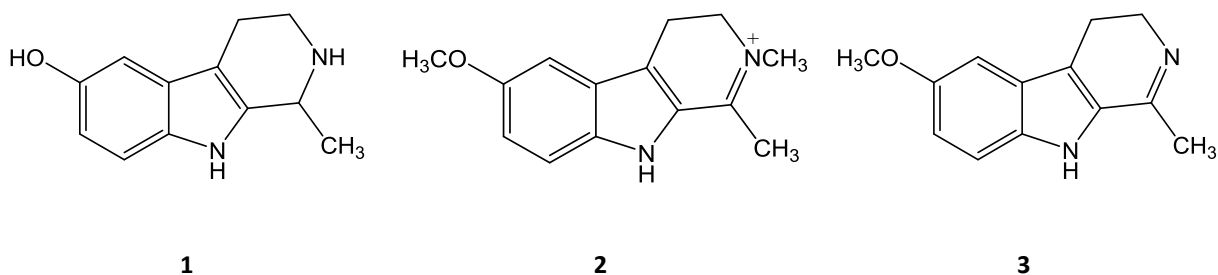


L'esquema desenvolupa un primer pas de solubilització dels alcaloides en dissolvent orgànic en medi alcalí. A partir de l'extracte, se'n procedeix al fraccionament amb una dissolució aquosa d'una base més forta, la qual cosa permet la solubilització de l'alcaloide fenòlic (3). Assumint que no seria plausible una diferenciació de solubilitat en distints dissolvents, es proposa aplicar una separació cromatogràfica, per exemple, amb gel de sílice com a fase estacionària, i algun dissolvent de baixa polaritat com a fase mòbil.

b) La molècula 3 tindria dos senyals només de l'anell benzènic, en forma de doblet amb acoblament *meta* ($J = 2$ Hz, aproximadament). A més, hauria de presentar un $-OCH_3$ aromàtic, entre 2,7-4,0 ppm, singlet (3H). Pel que fa la cadena isoprènica unida a C-3, desapareixeria el senyal a 3,97 ppm, propi dels protons metilènics de C-4', i es mostrien quatre senyals de metils, en comptes dels tres que es veuen en l'espectre de l'alcaloide 1.

Exercici 38

Els compostos 1-3 s'han obtingut d'una mescla d'extractes de plantes de la selva amazònica.



Es demana indiqueu:

- El seu origen biosintètic i el nom en concret del grup d'alcaloides a què pertanyen.
- Un esquema lògic per a la seua extracció i separació.
- La seua eventual activitat farmacològica, tot basant-se en analogies conegudes.

38. Resposta

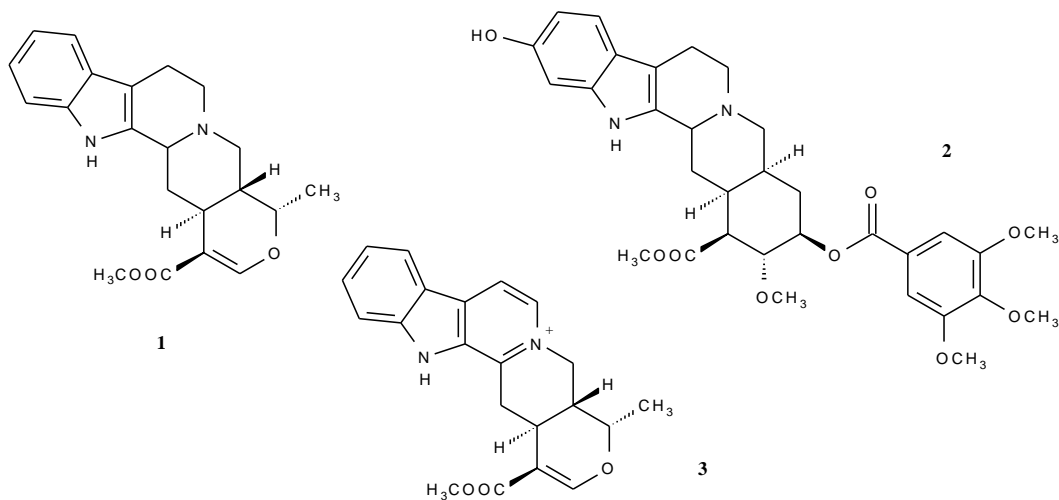
a) Aquests alcaloides provenen de la descarboxilació del triptòfan. La triptamina generada es condensa amb acetaldehid i forma un nou anell, de tipus dihidro- o tetrahidropiridina. L'estructura resultant, tricíclica, s'anomena carbolina.

b) Com en els anteriors casos en què es mostren un alcaloide base ordinari (**3**), un quaternari (**2**) i un fenòlic (**1**), val el procés explicat en l'exercici 32 i reiterat en el 36, tot salvant la designació numèrica de cada tipus d'alcaloide.

c) El més probable és que manifestaren algun grau de caràcter al·lucinogen, potser no el quaternari, ja que travessaria pitjor la barrera hematoencefàlica. Les analogies conegudes són les triptamines i β -carbolines de fongs i plantes usades com a al·lucinògens o, expressat de manera més general, psicodislàptiques (*Peganum*, *Banisteriopsis*, *Psilocybe*, etc.).

Exercici 39

Una droga obtinguda del gènere *Rauvolfia* conté els alcaloides **1**, **2** i **3**



Amb relació a aquests alcaloides, assenyaieu:

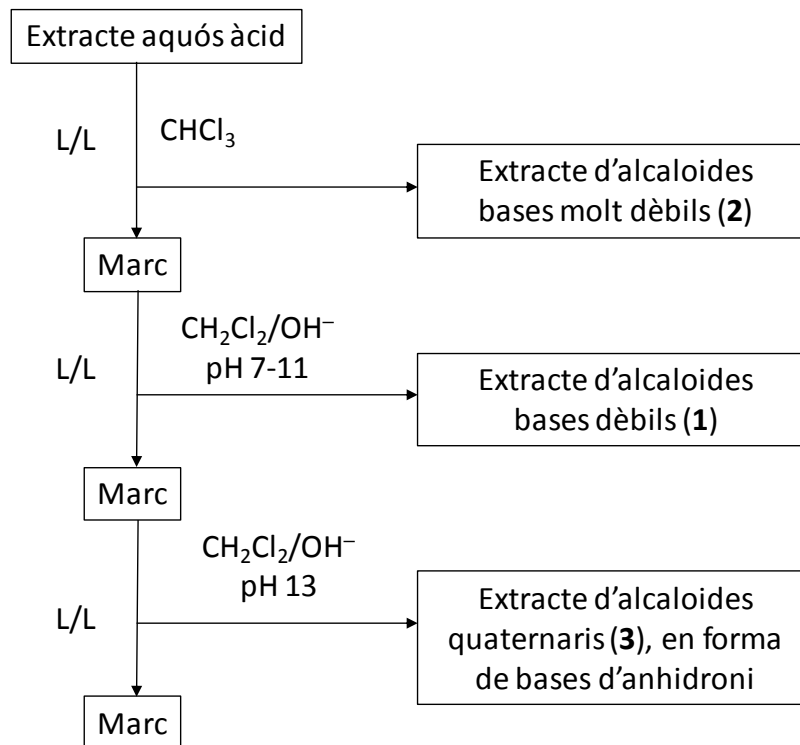
- Els precursors biogenètics i grup fitoquímic per a cadascun d'ells.
- El nom d'una droga que en continga algun dels principis.
- Un esquema que els permeta obtenir i purificar-ne els tres.
- L'activitat farmacològica del compost **1**.

39. Resposta

a) L'estructura dels alcaloides **1** i **3** és la mateixa –heteroiohimbà–, per la qual cosa és idèntic el seu origen: la condensació de la triptamina, provinent de la descarboxilació de l'aminoàcid triptòfan, amb l'iridoide secologanòsid, pareguda a la vista a l'exercici 36, en el qual l'amina inicial era dopamina, en comptes de triptamina. L'estructura **2** correspon a la d'un iohimbà, nom que rep degut a que l'anell cinquè, el més allunyat al grup indol, no és heterocíclic, com sí ho és en **1** i **3**.

b) Els alcaloides d'aquests tipus es troben en espècies de Rubiaceae (per exemple *Pausinystalia johimbe*, que conté la iohimbina), i d'Apocynaceae (per exemple les espècies de *Rauvolfia*, que contenen ajmalicina (**1**), deserpidina (**2**), i serpentina (**3**).

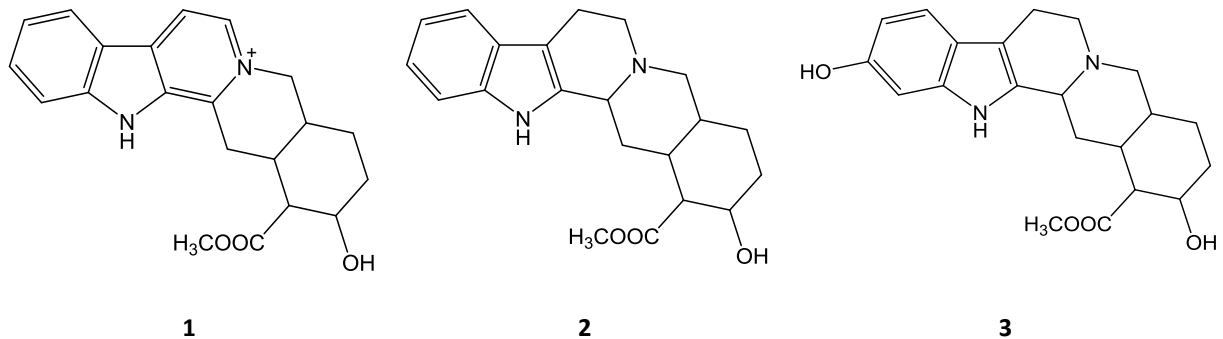
c) El procediment que s'exposa a continuació representa la idea que subjau en els procediments proposats per la purificació dels alcaloides de la *Rauvolfia serpentina*. No és, per tant, un procediment general d'extracció d'alcaloides. Una altra versió del mateix esquema podria seguir-se amb una extracció molt ampla d'alcaloides en forma de sal (acetat o fosfat), que anirien extraient-se al pH apropiat. Convé saber que l'alcaloide quaternari (**3**) podria obtenir-se en forma de sal amb aigua.



El compost **1** és antagonista de receptors α -adrenèrgics, sobretot del subtipus α_1 , la qual cosa li atorga efecte antihipertensiu (Roquebert i Demichel, 1984).

Exercici 40

Seguint un mètode convencional d'extracció d'alcaloides, els compostos **1**, **2** i **3** es van obtenir de l'escorça d'un arbre tropical, recollida prop de Micomeseng (Guinea).



Tenint en compte l'estructura dels alcaloides, suggeriu:

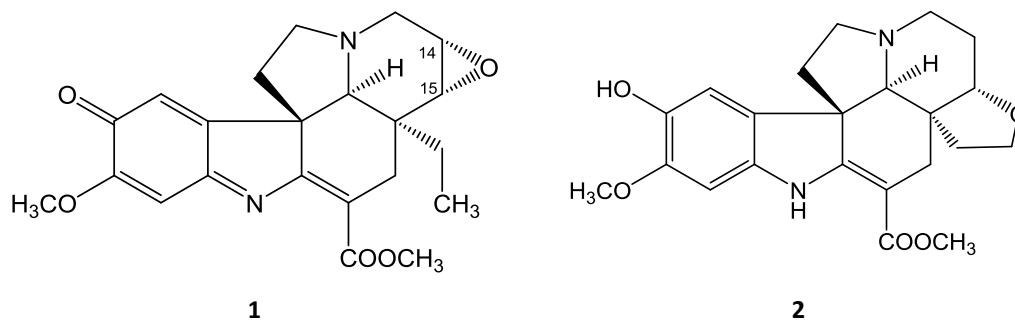
- Els precursors biogenètics més destacats.
- Un procés de separació de les tres molècules.
- El nom d'alguna família botànica en què seria plausible ubicar la planta.
- L'activitat farmacològica del compost **2**.

40. Resposta

- Com la resposta 39.a.
- Es pot aplicar l'esquema de separació de l'exercici 32, respectant el caràcter fenòlic, no fenòlic, i quaternari; no els números assignats a les molècules.
- Apocynaceae o Rubiaceae.
- L'alcaloide **2**, iohimbina, és un antagonista de receptors α -adrenèrgics, amb major selectivitat sobre el subtipus α_2 . Per açò, o en conjunció amb altres mecanismes, manifesta un poder vasodilatador en la zona genitourinària que millora la funció erètil.

Exercici 41

Les fulles de *Tabernaemontana corymbosa* Roxb. ex Wall. (Apocynaceae) recol·lectada a Pahang (Malàsia) contenen diversos alcaloides, entre els quals es troben jerantinina G (**1**) i jerantinina F (**2**):



Indiqueu, si és possible:

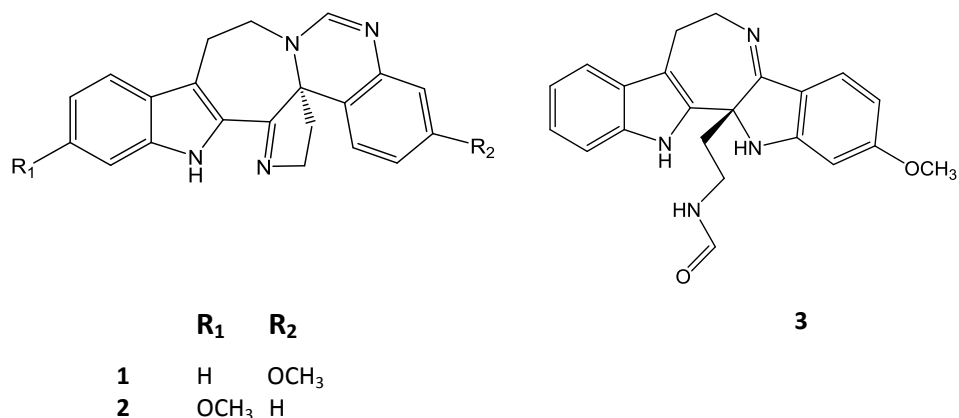
- A quin tipus estructural pertanyen i l'origen biosintètic d'aquests compostos.
- Un mètode d'extracció i aïllament dels dos alcaloides.
- Quin procés s'hi hauria d'aplicar si el nitrogen indòlic de jerantinina G estiguera metilat?
- Alguna diferència entre els espectres d'¹H-RMN d'**1** i **2**?

41. Resposta

- Alcaloides tipus indolmonoterpènics. Origen en la condensació de triptamina, procedent del triptòfan, i secologanòsid (iridoide, monoterpènic).
- Extracció amb dissolvent orgànic i amoníac, obtenció de les bases, i solubilització en medi alcalí de la base **2**, fenòlica, seguida de separació L/L.
- Si la molècula **1** tinguera el nitrogen metilat, seria un alcaloide quaternari. Per tant, el primer pas de l'apartat anterior seria inútil. Es podria extraure primer l'alcaloide **2** amb dissolvent orgànic i amoníac, i després el marc, amb aigua àcida o neutra, per tal d'obtenir la hipotètica *N*-metil-jerantinina G.
- La diferència més clara seria l'aparició de senyals de la cadena etil -CH₂-CH₃ en la molècula **1**. S'observaria el metil (C-18, 3H) com a triplet a 0,9 ppm ($J = 7$ Hz), per tenir dos protons iguals en carboni adjacent, i els protons del metilè (C-19) a 0,7 ppm i 1,2 ppm, dobles quadruplets ($J = 7$ i 14 Hz). A més, l'existència de la funció epòxid desplaçaria a freqüències majors els senyals de l'H-14, fins a 3,50 ppm, d'acord amb les dades publicades (Lim *et al.*, 2008). Es produiria igualment una simplificació de les multiplicitats dels senyals de l'anell piperidínic.

Exercici 42

Els alcaloides anomenats trigonoliimines A, B i C (substàncies **1**, **2** i **3**, respectivament) han estat descrits en l'espècie *Trigonostemon lii* Y.T. Chang (Euphorbiaceae), recollida a la província xinesa de Yunnan (Tan *et al.*, 2010).



Tot i que la seua estructura és molt infreqüent, i les diferències químiques son mínimes, es demana resoldre les qüestions següents:

- a) A partir d'un extracte etanòlic de les fulles la trigonoliimina C es va separar de les altres dues per CLAR semipreparativa amb una columna C18 eluïda amb MeOH-H₂O (7:3) que contenia dimetilamina al 0,1%. Com pogué ser aquella separació?
- b) Quines serien les diferències que es podrien observar entre les dades espectroscòpiques d'¹H-RMN de trigonoliimina A i C?

42. Resposta

- a) En el procés de separació per fase invertida (RP), els compostos de major polaritat elueixen abans degut al fet que la fase estacionària octadecil (C18) no els reté massa. Dels tres alcaloides el més polar deu ser aquell que tinga alguna funció polar. Seria el cas del compost **3**, pel seu grup formil (-HN-HC=O). En el cas que ens ocupa, l'ordre d'elució va ser **3** (9 min), **1** (13 min) i **2** (15 min) (Tan *et al.*, 2010).
- b) El grup formil, formamida per a ser més exactes, que sols el posseeix el compost **3**, marcarà una diferència. És un singlet a 7,93 ppm. L'aminoetil (-CH₂-CH₂-NH-) de **3** es troba en cadena lineal, i dona senyals entre 2,2 i 3,2 ppm. D'altra banda, el compost **1** té un protó peculiar, l'olefínic en l'anell pirimidínic (RR'N-CH=NR"), que apareix en el rang aromàtic (7,48 ppm, singlet), no tan desapatallat com el formil abans esmentat.

Apèndix Exercici 42

Aplicació de la CLAR als alcaloides

Hi ha alguns motius que fan que la CLAR siga una ferramenta necessària per a l'estudi d'alcaloides. Per exemple, el fet que en una mostra vegetal es puga trobar un alt nombre de molècules paregudes, difícils de resoldre mitjançant altres mètodes. A més, l'habitual existència de molècules quirals pot complicar encara més l'assumpte i, si això no fora prou, com que alguns compostos d'aquesta classe són molt rellevants sota un punt de vista toxicològic, la CLAR aporta solucions estandarditzades per la valoració en mostres i fluids biològics. Malgrat que en quede constatada la necessitat, també ha de quedar palesa la dificultat. La raó és que els alcaloides són substàncies ionitzables, cosa que fa que la seua solubilitat i fixació a la fase estacionària varien, per la qual cosa la forma dels pics cromatogràfics és moltes vegades asimètrica. Tal asimetria rep el nom anglés de *tailing*, que vol dir que es forma una "cua" o retard d'elució, degut al fet que hi coexisteixen variables diferents, com són el bescanvi iònic i les interaccions hidrofòbiques.

Com a procediment previ a l'anàlisi s'ha de procedir a l'extracció de la mostra, la qual normalment es realitza en medi aquós o alcohòlic en medi àcid; per exemple amb metanol, o mesclades hidroalcohòliques addicionades d'àcid clorhídric (1-5%). També es pot acidular el metanol amb àcid acètic. Aquesta estratègia és vàlida sobretot per a drogues riques en compostos lipòfils, mentre que les drogues riques en tanins i altres fenols és convenient extraure-les amb dissolvents apolars als quals s'ha afegit amoníac.

Per a la separació dels alcaloides es pot optar per allò que s'anomena *fase normal* (fase estacionària polar i fase mòbil apolar) o per la coneguda com a *fase invertida* (fase estacionària apolar i fase mòbil polar), l'última molt més emprada. Dins del exemples de la fase normal es pot citar la separació dels alcaloides oxazolindòlics d'algues del gènere

Haraldiophyllum, de la costa nor-occidental africana, la qual es va realitzar sobre columna Lichrosorb[®] ciano, eluint amb hexà-isopropanol (9:1) (Guella *et al.*, 2006).

En la situació de fase invertida, la presència de xicotetes quantitats de grups silanol Si(R)₃OH, dissociats, i no substituïts pel radical gras octadecil, fa que la fase estacionària interaccione, com s'ha indicat anteriorment, amb els grups amino protonats de l'alcaloide, alterant allò que en teoria seria una partició cromatogràfica. Per tal d'abordar el problema, tant la reducció del pH com la seua elevació poden ser apropiades; així com l'addició de compostos que formen parell iònic. Tot i això, en alguns casos, una fase mòbil hidroalcohòlica no modificada va ser suficient, com en el cas dels alcaloides de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl. (Henriques *et al.*, 2004).

La baixada de pH de la fase mòbil atenua la ionització del silanol i va ser usada per la separació dels constituents de *Mitragyna inermis* (Willd.) Kuntze, o de *Datura innoxia* Mill., en ambdós casos en presència d'àcid fòrmic/formatamònic, mentre que en el cas de *Nicotiana tabacum* L. es va usar l'acidificació amb fosfat monosòdic. Alternativament, l'increment del pH redueix el grau d'ionització de l'alcaloide, la qual cosa fa que no es retenga al silanol. Amb aquesta finalitat s'usen sals amòniques, per exemple carbonat o fosfat, per separar les bases de les importants drogues obtingudes de *Claviceps purpurea* Tul. i *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, respectivament.

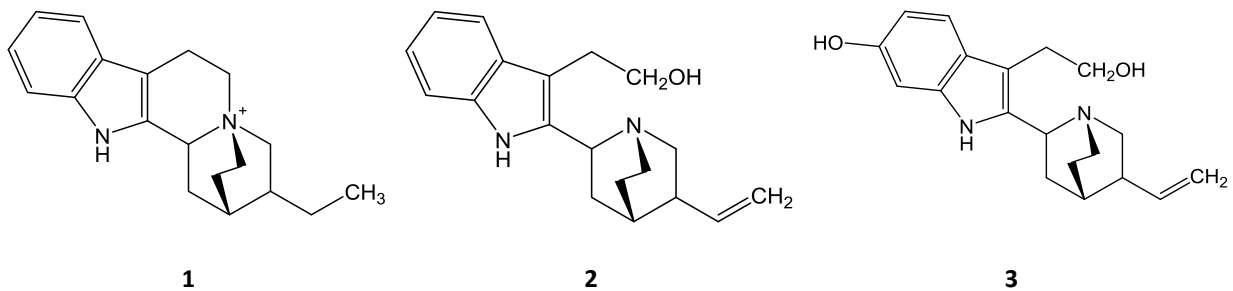
Una estratègia diferent a les modificacions de pH és l'addició de reactius de parell iònic. Aquests reactius són substàncies amb una certa analogia amb els tensioactius, amb un cap polar i una cua apolar, de manera que la zona polar enllaça iònicament amb la base a analitzar i la zona apolar s'uneix per atraccions hidrofòbiques amb la fase estacionària de fase invertida, octadecil en general. Els reactius de parell iònic més usats són els àcids hexanosulfònic, heptanosulfònic i octanosulfònic. Aquest últim va ser usat, per exemple, en la separació dels alcaloides tropànics de cultius cel·lulars de *Datura candida* (Pers.) Saff. (*Brugmansia candida* Pers.) (Cardillo *et al.*, 2010).

Encara cal explicar una possibilitat addicional, emprada des dels inicis de l'aplicació de la cromatografia d'alcaloides: el bloqueig dels silanols per amines exògenes, les quals funcionen, si es permet la comparació, per competència amb els analits a separar, també de caràcter amínic, com és sabut. Entre aquelles es poden citar dietilamina, trietilamina i hexilamina. Precisament amb la trietilamina es compta amb gran nombre d'anàlisis, dels quals cal esmentar, per exemple, la separació dels alcaloides de plàntules de *Catharanthus roseus*, o la dels d'*Erythroxylum vacciniifolium* Mart., congènere de la coca (Misra *et al.*, 2006; Zanolari *et al.*, 2003).

Amb relació als mètodes de detecció i/o determinació estructural associats al procés cromatogràfic no hi ha trets diferencials respecte a altres metabòlits de plantes. Per això s'hi poden usar, tant la detecció per UV amb *array* de fotodíodes, com la basada en l'acoblament amb RMN o EM.

Exercici 43

Els alcaloides **1**, **2** i **3** s'han aïllat de la summitat d'una espècie del gènere *Ophiorrhiza*, recollida a l'illa de Sumatra.



En relació amb aquestes molècules, indiqueu:

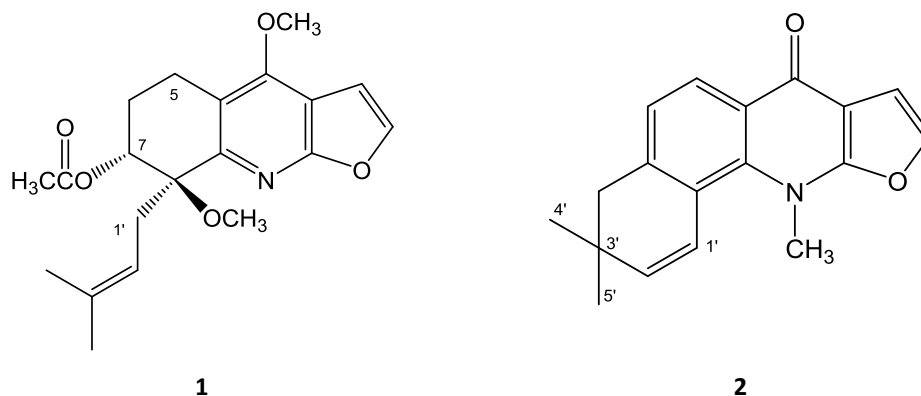
- Grup fitoquímic a què pertanyen.
- Un procediment per poder extraure i separar els tres principis.
- Atenent a criteris de distribució en la naturalesa suggeriu també a quin família botànica podria pertànyer la planta.

43. Resposta

- Són alcaloides carbolínics, és a dir aquells que posseeixen una estructura indòlica condensada amb una piridinica; reduïda en el cas que es tracta. No sols és això, sinó que el nitrogen piridinic, ionitzat, forma part també d'un agrupament quinuclidínic. Les estructures que apareixen en el present exercici estan basades en les descrites per Arbain i col·laboradors (1992).
- Com en els casos anteriors en què es mostren un alcaloide base ordinari (**2**), un quaternari (**1**) i un fenòlic (**3**) valen els processos reiterats en els exercicis 32 i connexos.
- Pel que fa a la família botànica, l'existència de l'anell etil- o vinil-quinuclidínic orienta cap a les Rubiaceae, en les quals s'inclouen les *Cinchona*.

Exercici 44

Diversos investigadors de la Universitat de Sao Paulo (Santos *et al.*, 1998) van obtenir els compostos **1** i **2** a partir de les fulles d'*Almeidea caerulea* (Nees & Mart.) A.St.-Hil. i *A. rubra* A. St.-Hil. (Rutaceae), respectivament. Diguen com es podrien diferenciar ambdues molècules per $^1\text{H-RMN}$. Proposeu també a quin grup d'alcaloides pertanyen.



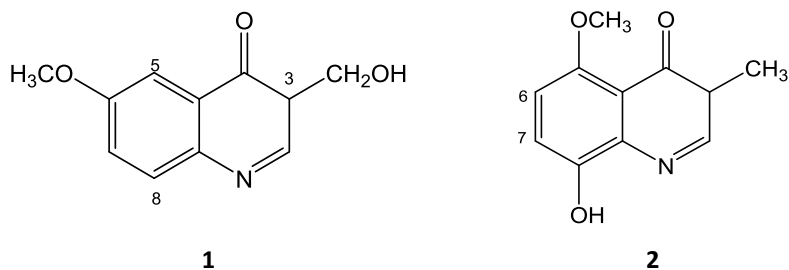
44. Resposta

Tot i que l'esquelet és idèntic, hi ha moltes diferències en RMN. El compost **1** presenta, sense comptar els grups metil, cinc carbonis sp^3 , els protons dels quals han de proporcionar senyals entre 1,5-3,0 ppm aproximadament (fragment etil C-5 i C-6), sobre 2,0 ppm (protons H-1'), i sobre 5,0-5,5 ppm (protó del C-7). Per contra, **2** únicament té el C-3' amb hibridació sp^3 , i sense hidrogen. Presentarà, doncs, senyals de protons aromàtics amb acoblament *orto* (H-5 a 8,3 ppm, i H-6 a 6,9 ppm; $J = 8,5$ Hz), i olefíniques amb acoblament *cis* (H-1' a 6,7 ppm, i H-2' a 5,6 ppm; $J = 10$ Hz). A més del metilamino (N-CH₃), a 3,9 ppm.

Els dos alcaloides són d'estructura furanoquinolínic, més específicament encara isoprenilfuranoquinolínic.

Exercici 45

Assenyeu com es podrien diferenciar les quinolones isòmeres **1** i **2** per ¹H-RMN.



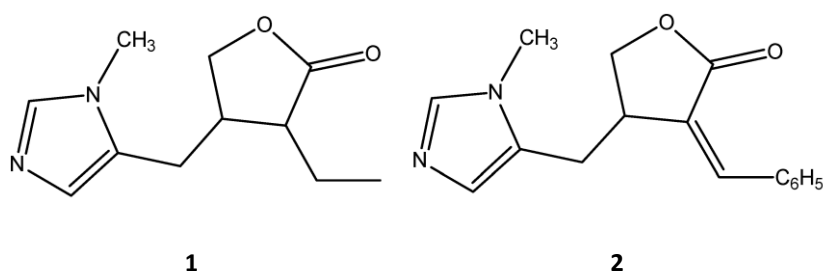
45. Resposta

Els principals senyals serien:

1. En l'anell heterocíclic de la molècula **2** el grup metil seria un doblet (x 3H) per l'acoblament amb el protó de C-3, mentre que a la molècula **1** el metil apareixeria com a doblet (2H) a freqüència molt major pel desapantallament que li provoca l'alcohol primari.
2. En l'anell benzènic, la molècula **1** presentaria tres senyals de protons aromàtics: doblet d'H-8 (*orto* J ca. 7 Hz), doblet d'H-5 (*meta* J ca. 2 Hz) i doble doblet d'H-7 (*orto/meta* J ca. 7/2 Hz). La molècula **2** presentaria dos doblets (*orto* J ca. 7 Hz) dels protons H-6 i H-7.

Exercici 46

En referència als alcaloides pilocarpina (**1**) i anhidropilosina (**2**), presents a les fulles de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth (Rutaceae).



Indiqueu:

- a) A quin tipus estructural pertanyen?
- b) Quines diferències es pot esperar que presenten els espectres d' ^1H -RMN.

46. Resposta

a) Els dos alcaloides pertanyen al grup dels imidazòlics, derivats d'histidina. L'anell pentagonal imidazòlic es troba en la natura en totes les bases púriques, així com en el neurotransmissor i autacoide histamina.

b) Per establir-hi les característiques espectroscòpiques de ressonància o d'altres tipus, la primera providència consisteix a decidir què significa $-\text{C}_6\text{H}_5$. La proporció C/H orienta cap a quatre insaturacions, o, tal vegada, tres insaturacions i un cicle. La hipòtesi més plausible és que siga un radical fenil. Altres alternatives, com la cadena hexadiinil, o un grup etinil-ciclobutenil, semblen alternatives poc realistes, sota el punt de vista fitoquímic. Admés que $-\text{C}_6\text{H}_5$ siga un fenil, els senyals aromàtics en ^1H -RMN serien evidents en **2** i no en **1**. La insaturació del carboni benzílic farà desaparèixer un dels metins ($\text{R}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{R}$) de la lactona i hi afegirà un protó olefínic *ca.* 6 ppm. Per a una anàlisi més completa es pot consultar el treball de Sawaya i col·laboradors (2008).

Exercici 47

Per extracció amb aigua alcalina de les llavors d'una espècie africana de rubiàcies es pot obtenir un compost **1** que dona positiva la reacció de la murexida. Durant el mateix procés es pot separar també un producte **2** constituït per la unió de l'àcid quínic amb un altre àcid **3**, de caràcter fenòlic, amb fórmula empírica $\text{C}_9\text{O}_4\text{H}_8$.

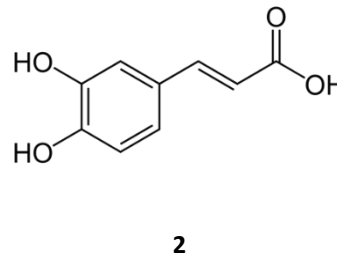
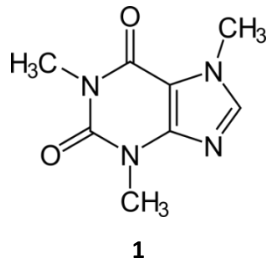
Es demana que proposeu l'estructura i l'activitat farmacològica del compost **1**, així com un procés per a la seua obtenció i purificació. Quin seria el nom de la droga i l'estructura del compost **3**?

47. Resposta

En l'àmbit de la fitoquímica, un dels compostos que dona la reacció de la murexida és la cafeïna. Aquest fàrmac és amfòter i molt dèbil en reaccions àcid-base, però suficientment polar per a ser soluble en aigua en les condicions del text proposat. L'al·lusió a les llavors d'una planta africana és compatible amb el café (*Coffea*, Rubiaceae). Certament *Coffea* existeix a Àfrica, però es conrea abundantment en altres continents, com és ben sabut.

Un apartat ben distint és suggerir què és $\text{C}_9\text{O}_4\text{H}_8$. La proporció C/H orienta cap a una molècula de tipus aromàtic; tal vegada C6-C3, com és lògic. S'estaria en presència d'un fenilpropanoide oxigenat, amb substitucions en l'anell o en la cadena lineal. Una de les diverses hipòtesis compatibles amb el grau d'oxidació i la realitat és que fora un àcid fenòlic. La conjugació amb l'àcid quínic, esmentada en el text, ens hauria de dirigir, per tal que el nostre problema es resolguera, a caracteritzar **3** com a àcid cafeic (àcid 3',4'-dihidroxifenilpropenoic, o àcid 3',4'-dihidroxicinàmic) mitjançant una simple anàlisi per CCP amb un patró comercialment disponible.

El compost **1** seria cafeïna, un estimulador cardíac, del sistema nerviós central, i diürètic, degut a les activitats inhibidora de la fosfodiesterasa i antagonista d'adenosina.



Apèndix exercici 47

Espècies amb cafeïna i presència en la planta

La cafeïna és una purina oxigenada, en concret la tri-N-metilxantina, i constitueix el *cap de sèrie* de les anomenades "bases xàntiques", compostos d'origen vegetal de gran consum en forma de begudes amb activitat estimulador del sistema nerviós central. Moltes de les espècies que produeixen cafeïna són més que conegudes, altres no tant. Dins les primeres consten cafè, té, mate, cola, etc., i ara caldria estendre la mirada per a completar-ne el coneixement sobre la distribució en altres plantes.

Els ordres en què s'han descrit són, en primer lloc, uns que podríem qualificar d'extravagants, ja que no tenen cap connexió taxonòmica amb la majoria: Magnoliales i Asparagales. Dins d'ells es troben, respectivament, dues plantes molt disperses: *Annona cherimola* Mill. Annonaceae (la xirimoia), i la *Drimys maritima* (L.) Stearn (syn. *Scilla maritima* L.) Asparagaceae (la ceba albarrana). La resta, podem classificar-los en dos grups, un grup (A) pertanyent a les Asteridae (Aquifoliales, Ericales i Gentianales) i un altre (B) que contindria tots els altres, entre els quals destaquen Malvales i Sapindales. Si es pretenguera interpretar aquesta distribució a la llum de qualsevol criteri de classificació, com seria, per exemple, el del Angiosperm Phylogeny Group es trobaria una dispersió molt considerable.

El grup A ens presenta les espècies del gènere *Ilex* (Aquifoliaceae, Aquifoliales), de les quals únicament *I. paraguariensis* A. St.-Hil. (el mate o *hierba-mate*, popular a Amèrica del Sud) conté quantitats apreciables. Resulta una mica sorprenent que diverses espècies del mateix gènere que comparteixen distribució geogràfica i ecològica manquen pràcticament de cafeïna, llevat de *I. cassine* L. i *I. vomitoria* Aiton, encara que poden contenir alguna quantitat de teofil·lina. També es compta amb les espècies de *Coffea* (*Rubiaceae*, Gentianales), les plantes de les quals s'obtenen les llavors de cafè. L'origen geogràfic d'aquesta droga es correspon amb l'àrea aràbig-etiòpica, tot i que és ben sabut que el seu conreu al territori americà és amplíssim. D'acord amb la revisió d'Ashihara i Crozier (2001), les llavors de la *C. arabica* L. contenen aproximadament un 1,0 % de cafeïna, mentre que els *cultivars* Robusta i Guarini de *C. canephora* Pierre ex A.Froehner en contenen més: 1,7 % i 2,4 %, respectivament. Per altra banda, *C. liberica* Hiern i *C. liberica* var. *dewevrei* (De Wild. & T.Durand) Lebrun (syn. *C. dewevrei* De Wild. & T.Durand) també superen l'arabica, amb 1,4% i 1,2% respectivament. La riquesa en cafeïna de *C. eugenioides* S. Moore, *C. salvatrix* Swynn. & Philipson i *C. racemosa* Lour. no n'assoleix el 0,8%. Per a finalitzar el bloc A, manca tractar del té (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae, Ericales), les fulles

dessecades del qual n'ostenten entre un 2,0-2,5 %. La riquesa en cafeïna és pareguda també en l'espècie *C. taliensis* (W. W. Sm.) Melch., així com en alguns híbrids de *C. sinensis*.

El grup B està format per algunes espècies de Malvaceae (Malvales), com la cola (*Cola*) o el cacau (*Theobroma*), que tenen en comú una mida arborescent, amb fruits polposos pluriseminats. Altres espècies, com la guaranà (*Paullinia*, Sapindaceae, Sapindales) tenen alguns aspectes morfològics que recorden més al café. Les llavors en constitueixen la droga en tots els casos. En l'espècie *Theobroma cacao* L., la xantina majoritària és la teobromina, com ocorre en *T. bicolor* Humb. & Bonpl. o *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.

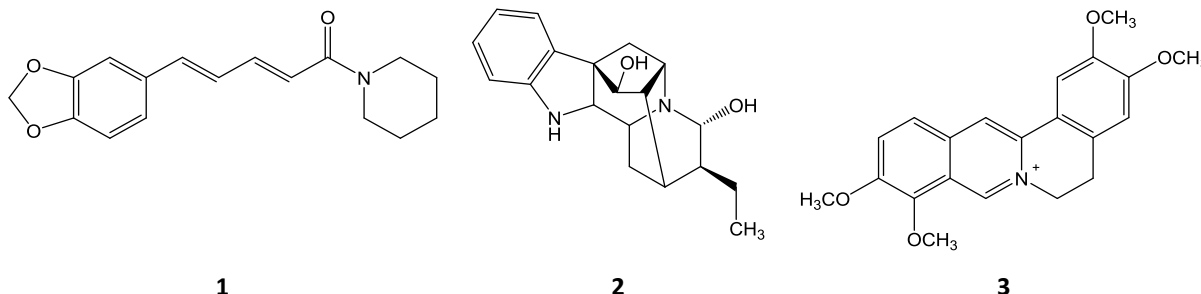
Una espècie semblant a les de *Theobroma* és *Herrania purpurea* (Pittier) R.E. Schult., que es caracteritza per la presència de teacrina (tetra-*N*-metil-xantina) com a majoritària. Tanmateix, les espècies de *Cola*, com *C. acuminata* (P. Beauv.) Schott & Endl., *C. anomala* K. Schum., *C. nitida* (Vent.) Schott & Endl. són molt més riques en cafeïna que en teobromina: al voltant de l'1,5 % de la primera respecte del 0,05 % de la segona.

Pel que fa les Sapindales, les llavors de *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*, assoleixen altres concentracions de cafeïna, superant de vegades el 6 %, una riquesa que ocasiona que les begudes que en contenen l'extracte puguin presentar una concentració de l'11 % de cafeïna. Dins el mateix ordre es compta amb l'extensa família de les rutàcies, distribuïda arreu del món, especialment en regions temperades o francament càlides, i de la qual les plantes més conegudes al nostre àmbit occidental són els molt ben aclimatats cítrics. S'ha descrit que un ample ventall d'espècies de *Citrus* (*C. maxima* (Burm.) Merr., *C. paradisi* Macfad., *C. trifoliata* L., etc) contenen quantitats detectables de bases xàntiques en òrgans joves com són les flors, tant en la fase de capoll com en la desenvolupada (Ashihara *et al.*, 2017).

Les bases xàntiques tenen un caràcter amfòter; és a dir, que es comporten com àcids en presència de bases i viceversa. Això ocorre perquè els seus grups amida –CO-NH– es troben en equilibri amb les formes enòliques –COH=N–. Naturalment, si el nitrogen de l'amida està metilat no es possible tal bescanvi. Paral·lelament, la funció –NCH₃– lleva hidrosolubilitat en comparació amb la funció –NH–. Per això hi ha alguna diferència entre les dues bases xàntiques de major importància farmacològica: la teofil·lina és lleument àcida, més hidrosoluble; la cafeïna un poc bàsica i menys hidrosoluble, tot i que en calent augmenta clarament la seua solubilitat. Aquesta observació prèvia és complementària a un fet important pel que fa l'extracció: la cafeïna es troba al si de la droga unida a compostos diversos amb enllaços no covalents. Es tracta de l'existència de complexos amb tanins, àcids fenòlics o sucres. Per a desfer aquests conjugats es poden utilitzar hidròxids alcalinoterris (de magnesi, calci) o amoníac, així com carbonat sòdic; a continuació, el principi actiu es pot dissoldre amb cloroform, tricloroetilè, o acetat d'etil. També és factible tractar la droga amb alcohol, i l'extracte amb òxid magnèsic, el qual exerceix la doble funció de trencar els esmentats conjugats i d'adsorbir sobre ell tanins i pigments vegetals. Per a finalitzar es pot referir la purificació per la possibilitat de formar sals dobles de sodi i cafeïna, amb àcids orgànics com el salicílic.

Exercici 48

A partir d'una mescla de drogues vegetals s'han aïllat, entre d'altres, els tres metabòlits secundaris següents:

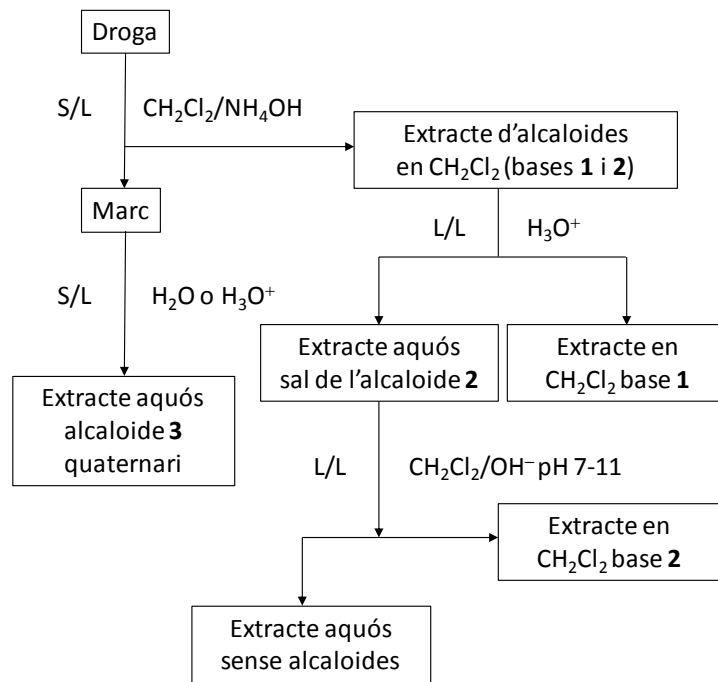


Es demana que proporcioneu el nom dels precursors biogenètics i grup fitoquímic, així com un procediment que conduisca a l'obtenció i purificació dels tres principis. Igualment, indiqueu el nom d'un d'ells, amb menció d'una droga que el continga i la seua activitat farmacològica.

48. Resposta

L'alcaloide, o pseudoalcaloide, **1** (piperina) prové de la lisina pel que fa la seua part nitrogenada; la part aromàtica C6-C5 és clarament d'origen dihidroxicinamoílic, encara que en comptes de la forma original, C6-C3 es troba suplementada per la unió amb un C2, malonil CoA (HOOC-COSCoA). L'alcaloide **2** (ajmalina) prové, com tots els indolmonoterpènics, de triptamina i secologanòsid. El **3** (palmatina) és un alcaloide protoberberínic, un dels tipus dels benzilisoquinolínic.

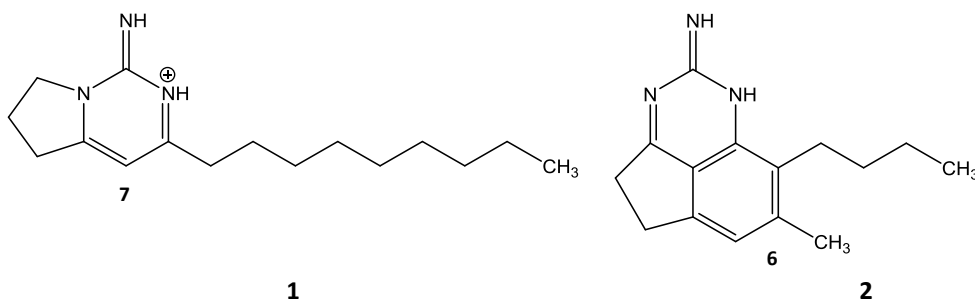
Per a l'extracció s'ha de pensar que hi ha tres alcaloides amb distintes propietats: **1**) una amida neutra; **2**) una base dèbil; i **3**) un alcaloide quaternari. El següent procediment permetria teòricament separar-los.



Sobre la presència en plantes medicinals, piperina és el principi pungent de les espècies de pebre (*Piper* sp., Piperaceae); ajmalina es troba, entre d'altres, en espècies de rauvòlfia (*Rauvolfia* sp., Apocynaceae) i té activitat antiarítmica cardíaca. Per finalitzar, palmatina, antidisentèrica i amarga, es troba en l'arrel del Colombo (*Jateorrhiza palmata* o *Cocculus palmatus*, Menispermaceae).

Exercici 49

Els principis antiprotozoaris monalidina A (**1**) i arbusculadina (**2**) es van obtenir, en quantitats ínfimes, de l'esponja *Monanchora arbuscula* (Crambeidae), recol·lectada a Cabo Frio (Rio de Janeiro), per extracció amb metanol i posterior partició amb hexà/aigua. De la fracció hidrometanòlica es van obtenir, per CLAR amb fase estacionària C18, el primer compost eluït amb aigua, i el segon amb aigua-metanol (1:1) (Santos *et al.*, 2015).



Expliqueu, tenint en compte la seua trajectòria en el procés d'aïllament, alguna idea sobre les seues característiques fisicoquímiques. A més, indiqueu quins senyals en permetrien la distinció per espectroscòpia d¹H-RMN.

49. Resposta

Com a informació prèvia s'ha de dir que aquests compostos poden ser qualificats com a alcaloides guanidínics, i igualment podrien ser exclosos d'aquesta categoria i considerar-los com a alquil- o arilpirimidines; per tant, ubicats en l'àmbit bioquímic dels policètids.

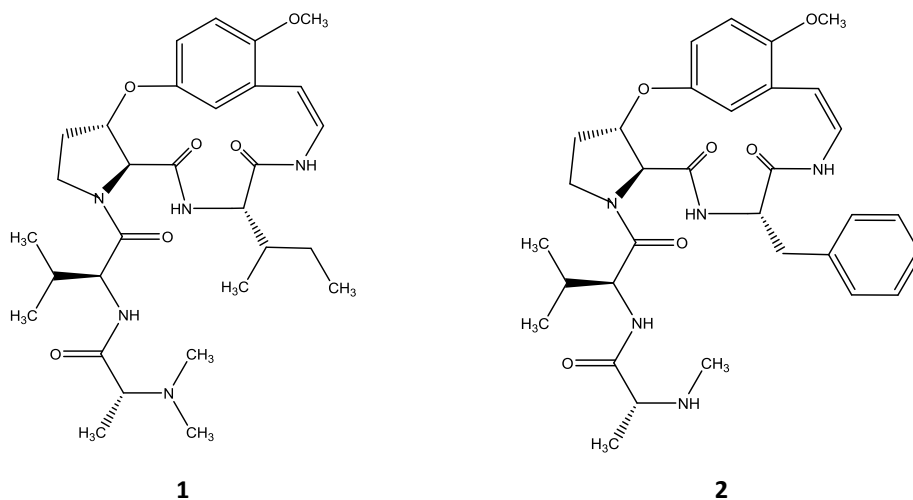
L'extracció amb metanol no indica res d'especial sobre les seues propietats fisicoquímiques, ja que es tracta d'un dissolvent capaç d'extraure directament compostos molt variats. Tanmateix, després, la presència d'ambdues substàncies en la fracció de major polaritat, i no en l'hexànica, indica que manifesten una certa hidrofília. Això es deu necessàriament a l'agrupament bàsic guanido (R-NH-CNH-NH-R), el qual li atorga la possibilitat d'ionització per trànsit de protons. Si no fora així, la resta de la molècula, completament apolar, li donaria la solubilitat en hexà.

Pel que fa a la separació cromatogràfica sobre C18, és a dir sobre octadecil-silà, s'ha d'interpretar que el compost de major retenció, el **2**, presenta, en consonància amb allò exposat abans, una major lipofília. Tot i que aquest compost benzènic (**2**) no apareix ionitzat segons l'estructura proporcionada pels autors, no seria impossible la seua protonació, com ocorre en qualsevol derivat guanido.

Els senyals que permeten diferenciar-ne les dues molècules serien fonamentalment els dos que presenta el compost **2** en l'anell benzènic: un singlet aromàtic (H-6), i un grup metil sobre el carboni adjacent. Les dades que aporten els autors són els singlets a 6,86 ppm i 2,43 ppm respectivament. Nogensmenys, el senyal d'H-6 és sols parcialment vàlid, ja que el protó H-7 del compost **1** apareix a la mateixa zona de l'espectre, en concret a 7,00 ppm. Per altra banda, els protons metilènics serien més nombrosos (22 H, entre 1,24 i 4,11 ppm) per a **1** que per a **2** (10 H, entre 1,56 i 3,18 ppm).

Exercici 50

A partir d'un extracte metanòlic de les arrels dessecades del ginjoler (*Ziziphus jujuba* Mill., Rhamnaceae) es van obtenir, junt amb altres compostos molt relacionats estructuralment, les molècules **1** i **2**, denominades jubanina I i nummularina B respectivament.



El procés de purificació a partir de l'extracte metanòlic es va realitzar per suspensió amb àcid clorhídric diluït, fins a pH 3-4. L'esmentada suspensió es va extraure amb acetat d'etil, i el residu aquós resultant es va tractar amb hidròxid sòdic fins a pH 9, i es va extraure amb cloroform. La fracció clorofòrmica així obtinguda es va separar per CC, eluint amb mescles cloroform-metanol (30:1→1:1), i allò va donar cinc fraccions que van ser després sotmeses a cromatografia amb Sephadex® LH-20 o CLAR (Kang *et al.*, 2015).

Assenyaleu:

- A quin tipus de metabòlits secundaris pertanyen els compostos en qüestió?
- Quina seria la seua biosíntesi?
- Quines són les bases fisicoquímiques que en justifiquen l'extracció i purificació?
- Quines diferències s'hi podrien observar per espectroscòpia ^1H -RMN?

50. Resposta

a) Igual que s'ha formulat en l'exercici 49, s'ha de verificar, amb relació al caràcter peptídic i, per tant, nitrogenat de les molècules, si són o no alcaloides. Certament, existeix la categoria *alcaloides peptídics*, referida en general a determinats pèptids bàsics. Dilucidar-ne el caràcter alcaloídic és una qüestió de tipus formal oberta, per bé que s'ha de saber que els denominats alcaloides ciclopeptídics són considerats un grup fitoquímic definit de les Rhamnaceae. La primera vegada que es va parlar d'alcaloides peptídics com una categoria va ser el 1964, per País i col·laboradors.

b) Queda palés que la major part de la molècula deriva d'un procés anàleg a la síntesi proteica a partir d'aminoàcids i que, a més, s'hi observa una part estirilamina (Ph-CH=CH-NH-R). L'esmentada síntesi proteica seria probablement de tipus no-ribosomal, i la part estirènica ha de provenir de la via del shikimat.

c) El procés relatat coincideix plenament amb allò descrit i comentat sobre la generalitat dels alcaloides. És per això que la naturalesa teòrica que es discutia en l'apartat a) resulta favorable al caràcter fisicoquímic d'alcaloide vist en exercicis anteriors.

d) Una gran part de l'estructura química és comuna a ambdues molècules. S'hi poden observar algunes diferències sobre les quals s'ha de dir com es reflecteixen en un hipotètic espectre ^1H -RMN; en concret, en la molècula **2** el grup benzil provinent de la fenilalanina, i la doble metilació de l'amina terminal de la cadena lineal de la molècula **1**. En el primer cas es reflecteix pels senyals entre 7,2 i 7,3 ppm (H aromàtics, m), i en el segon pel senyal a 2,17 ppm (x3H; -N(CH₃)₂). A més, la cadena isobutil que, procedent de la isoleucina, presenta **1**, mostra senyals de protons entre 0,67 i 1,75 ppm, segons els autors.

Bibliografia

- Al-Harrasi A, Rehman NU, Khan AL, Al-Broumi M, Al-Amri I, Hussain J, Hussain H, Csuk R. Chemical, molecular and structural studies of *Boswellia* species: β -Boswellic aldehyde and 3-epi-11 β -dihydroxy BA as precursors in biosynthesis of boswellic acids. PLoS One. 2018; 13(6): e0198666. doi: 10.1371/journal.pone.0198666.
- Ali B, Imran M, Hussain R, Ahmed Z, Malik A. Structural determination of abutilins A and B, new flavonoids from *Abutilon pakistanicum*, by 1D and 2D NMR spectroscopy. Magn Reson Chem 2010; 48: 159-63.
- Ali Z, Khan IA. Alkaloids and saponins from blue cohosh. Phytochemistry. 2008; 69:1037-42.
- Ahmed AA, Hegazy ME, Hassan NM, Wojcinska M, Karchesy J, Pare PW, Mabry TJ. Constituents of *Chrysothamnus viscidiflorus*. Phytochemistry 2006; 67: 1547-53.
- Arbain D, Byrne LT, Prima Putra D, Sargent MV, Skelton BW, White AH. Ophiorrhizine, a new quaternary indole alkaloid related to cinchonamine, from *Ophiorrhiza major* Ridl. J Chem Soc Perkin Trans 1. 1992; 663-4.
- Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends Plant Sci. 2001; 6: 407-13.
- Ashihara H, Mizuno K, Yokota T, Crozier A. Xanthine alkaloids: occurrence, biosynthesis, and function in plants. Prog Chem Org Nat Prod. 2017; 105: 1-88.
- Bharadwaj R, Chinchansure AA, Kulkarni RR, Arkile M, Sarkar D, Joshi SP. Rottlerin derivatives and other compounds from *Mallotus philippinensis* fruits and their potential antimycobacterial activity. Planta Med Lett 2015; 2: e28-e30.
- Broomhead AJ, Dewick PM. Aryltetralin lignans from *Linum flavum* and *Linum catharticum*. Phytochemistry 1990; 29: 3839-44.
- Cabo Torres J, Pardo García P. Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia, 4ª Edició. Granada, 1974.
- Cardillo AB, Otalvaro AAM, Busto VD, Talou JR, Velasquez LME, Giuliatti AM. Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by *Brugmansia candida* hairy root cultures in bioreactors. Process Biochem. 2010; 45: 1577-1581.
- Chen J, Fan X, Zhu J, Song L, Li Z, Lin F, Yu R, Xu H, Zi J. Limonoids from seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. and their cytotoxic activity. Acta Pharm Sin B. 2018; 8: 639-44.
- Choi YH, Sertic S, Kim HK, Wilson EG, Michopoulos F, Lefeber AW, Erkelens C, Prat Kricun SD, Verpoorte R. Classification of Ilex species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. J Agric Food Chem. 2005; 53: 1237-45.
- Colegate SM, Gardner DR, Joy RJ, Betz JM, Panter KE. Dehydropyrrolizidine alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv. 'Tropic Sun'). J Agric Food Chem. 2012; 60: 3541-50.
- Dewick PM. Alkaloids, in Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2ª Edició, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.
- Dianita R, Jantan I. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacological aspects of the genus *Premna*: a review. Pharm Biol. 2017; 55: 1715-39.

- Feng XL, Yu Y, Gao H, Mu ZQ, Cheng XR, Zhouband WX, Yao XS. New sesquiterpenoids from the rhizomes of *Acorus tatarinowii*. RSC Adv. 2014; 4: 42071-7.
- Frick KM, Kamphuis LG, Siddique KH, Singh KB, Foley RC. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. Front Plant Sci. 2017; 8, Art. 87.
- Fu Y, Chen J, Li YJ, Zheng YF, Li P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. Food Chem. 2013; 141: 1063-71.
- Guella G, N'Diaye I, Fofana M, Mancini I. Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal. Tetrahedron 2006; 62: 1165-70.
- Gupta SC, Prasad S, Tyagi AK, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Neem (*Azadirachta indica*): an indian traditional panacea with modern molecular basis. Phytomedicine. 2017; 34: 14-20.
- Henriques AT, Lopes SO, Paranhos JT, Gregianini TS, Fett-Neto AG, Schripsema J, Von Poser GL. *N*, β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. Phytochemistry 2004; 65:449-454.
- Holdsworth DK, Jones RA, R Self. Volatile alkaloids from *Areca catechu*. Phytochemistry 1998; 48:581-582.
- Holzer P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. Regul Pept. 2009; 155: 11-7.
- Hotti H, Rischer H. The killer of Socrates: coniine and related alkaloids in the Plant Kingdom. Molecules. 2017; 22. pii: E1962.
- Hsiao PY, Lee SJ, Chen IS, Hsu HY, Chang HS. Cytotoxic cardenolides and sesquiterpenoids from the fruits of *Reevesia formosana*. Phytochemistry 2016; 130: 282-90.
- Imai A, Lankin DC, Nikolić D, Ahn S, van Breemen RB, Farnsworth NR, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. Cycloartane triterpenes from the aerial parts of *Actaea racemosa*. J Nat Prod. 2016; 79: 541-54.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. *Berberis vulgaris* and berberine: an update review. Phytother Res. 2016; 30:1745-64.
- Kajiyama K, Demizu S, Hiraga Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, *et al*. Two prenylatedretrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. Phytochemistry 1992; 31: 3229-32.
- Kang KB, Ming G, Kim GJ, Ha TK, Choi H, Oh WK, Sung SH. Jubanines F-J, cyclopeptide alkaloids from the roots of *Ziziphus jujuba*. Phytochemistry 2015; 119: 90-5.
- Li PL, Liu MH, Hu JH, Su WW. Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* 'Tomentosa' by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2014; 90: 167-79.
- Lim KH, Hiraku O, Komiyama K, Kam TS. Jerantinines A-G, cytotoxic *Aspidosperma* alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. J Nat Prod. 2008; 71: 1591-4.
- Liu XG, Wu SQ, Li P, Yang H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in *Ginkgo biloba*. J Pharm Biomed Anal. 2015; 113: 212-25.

- Lorence DH, Taylor CM. Rubiaceae, en Flora Mesoamericana, Davidse G, Sousa M, Knapp S., Chiang F. (eds.). UNAM, Missouri Botanical Garden i The Natural History Museum. Vol. 4, 1-563, 2012.
- Manzuoerh R, Farahpour MR, Oryan A, Sonboli A. Effectiveness of topical administration of *Anethum graveolens* essential oil on MRSA-infected wounds. Biomed Pharmacother. 2019; 109: 1650-8.
- Martins D, Nunez CV. Secondary metabolites from Rubiaceae species. Molecules. 2015; 20: 13422-95.
- Misra N, Gupta AK. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. J Plant Physiol. 2006; 163: 11-8.
- Nash KM, Shah ZA. Current Perspectives on the beneficial role of *Ginkgo biloba* in neurological and cerebrovascular disorders. Integr Med Insights. 2015; 10: 1-9.
- Nawrot-Hadzik I, Granica S, Domaradzki K, Pecio Ł, Matkowski A. Isolation and determination of phenolic glycosides and anthraquinones from rhizomes of various *Reynoutria species*. Planta Med. 2018; 84: 1118-26.
- Nian Y, Wang HY, Su J, Zhou L, Qiu MH. A cytotoxic 4 α -methyl steroid from the aerial parts of *Cimicifuga foetida* L. Fitoterapia 2012; 83(2):293-7.
- Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food Chem Toxicol. 2003; 41: 1727-38.
- Païs M, Monseur X, Lusinchi X, Goutarel R. Alcaloïdes Peptidiques. II. Structure de la Pandamine, Alcaloïde du *Panda oleosa* Pierre (Pandacees). Bull Soc Chim France 1964: 817.
- Petruczynik A. Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. Cent Eur J Chem. 2012; 10: 802-35.
- Roquebert J, Demichel P. Inhibition of the alpha 1 and alpha 2-adrenoceptor-mediated pressor response in pithed rats by raubasine, tetrahydroalstonine and akuammigine. Eur J Pharmacol. 1984; 106: 203-5.
- Rumalla CS, Jadhav AN, Smillie T, Fronczek FR, Khan IA. Alkaloids from *Heimia salicifolia*. Phytochemistry. 2008; 69:1756-62.
- Saleem S, Jafri L, Ul Haq I, Chang LC, Calderwood D, Green BD, Mirza B. Plants *Fagonia cretica* L. and *Hedera nepalensis* K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity. J Ethnopharmacol. 2014; 156: 26-32.
- Santos CS, Januário AH, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MFGF, Pirani JR. Cycloartane triterpenoids and alkaloids form *Almeidea* spp. J Braz Chem Soc. 1998; 9: 39-42.
- Santos MF, Harper PM, Williams DE, Mesquita JT, Pinto ÉG, da Costa-Silva TA, Hajdu E, Ferreira AG, Santos RA, Murphy PJ, Andersen RJ, Tempone AG, Berlinck RG. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. J Nat Prod. 2015. 22; 78: 1101-12.
- Sawaya AC, Abreu IN, Andreatza NL, Eberlin MN, Mazzafera P. HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. Molecules 2008; 13: 1518-29.

- Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP. Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry*. 2007; 68: 980-96.
- Sekine N, Ashitani T, Murayama T, Shibutani S, Hattori S, Takahashi K. Bioactivity of latifolin and its derivatives against termites and fungi. *J Agric Food Chem*. 2009; 57: 5707-12.
- Shakeri F, Taavoni S, Goushegir A, Haghani H. Effectiveness of red clover in alleviating menopausal symptoms: a 12-week randomized, controlled trial. *Climacteric*. 2015; 18: 568-73.
- Sharma V, Janmeda P. Chemopreventive role of *Euphorbia neriifolia* (Linn) and its isolated flavonoid against N-nitrosodiethylamine-induced renal histopathological damage in male mice. *Toxicol Int*. 2013; 20: 101-7.
- Shihano M, Henmi A, Matsnmoto Y, Kusano G, Miyase T, Hatakeyama Y. Studies on the index compounds for HPLC analysis of *Glycyrrhiza uralensis*. *Heterocycles* 1997; 45: 2053-60.
- Su BN, Park EJ, Mbwambo ZH, Santarsiero BD, Mesecar AD, Fong HH, Pezzuto JM, Kinghorn AD. New chemical constituents of *Euphorbia quinquecostata* and absolute configuration assignment by a convenient Mosher ester procedure carried out in NMR tubes. *J Nat Prod*. 2002; 65: 1278-82.
- Tan CJ, Di YT, Wang YH, Zhang Y, Si YK, Zhang Q, Gao S, Hu XJ, Fang X, Li SF, Hao XJ. Three new indole alkaloids from *Trigonostemon liliifolius*. *Org Lett*. 2010; 12: 2370-3.
- Tanaka R, Kasubuchi K, Kita S, Tokuda H, Nishino H, Matsunaga S. Bioactive steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *J Nat Prod*. 2000; 63: 99-103.
- The Angiosperm Phylogeny group. APG IV; *Bot J Linnean Soc*. 2016; 181: 1–20.
- Tian J, Ma QG, Yang JB, Wang AG, Ji TF, Wang YG, Su YL. Hepatoprotective phenolic glycosides from *Gymnema tingens*. *Planta Med*. 2013; 79: 761-7.
- Tofighi Z, Asgharian P, Goodarzi S, Hadjiakhoondi A, Ostad SN, Yassa N. Potent cytotoxic flavonoids from Iranian *Securigera securidaca*. *Med Chem Res*. 2014; 23: 1718-24.
- Tofighi Z, Moradi-Afrapoli F, Ebrahimi SN, Goodarzi S, Hadjiakhoondi A, Neuburger M, Hamburger M, Abdollahi M, Yassa N. Securigenin glycosides as hypoglycemic principles of *Securigera securidaca* seeds. *J Nat Med*. 2017; 71: 272-80.
- Tsoukalas M, Muller CD, Lobstein A, Urbain A. Pregnane glycosides from *Cynanchum marnierianum* stimulate GLP-1 secretion in STC-1 cells. *Planta Med*. 2016; 82: 992-9.
- Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatograph A* 2009; 1216: 2002-32.
- Wang J, Di Y, Yang X, Li S, Wang Y, Hao X. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the stems of *Glycosmis pentaphylla*. *Phytochemistry* 2006; 67: 486-91.
- Wang J, Zheng Y, Efferth T, Wang R, Shen Y, Hao X. Indole and carbazole alkaloids from *Glycosmis montana* with weak anti-HIV and cytotoxic activities. *Phytochemistry*. 2005; 66: 697-701.
- Wu L, Chen ZL, Su Y, Wang QH, Kuang HX. Cycloartenol triterpenoid saponins from *Cimicifuga simplex* (Ranunculaceae) and their biological effects. *Chin J Nat Med*. 2015; 13: 81-9.

- Xing Y, Li N, Zhou D, Chen G, Jiao K, Wang W, Si Y, Hou Y. Sesquiterpene coumarins from *Ferula sinkiangensis* act as neuroinflammation inhibitors. *Planta Med.* 2017; 83: 135-42.
- Yamasaki K, Hishiki R, Kato E, Kawabata J. Study of kaempferol glycoside as an insulin mimic reveals glycon to be the key active structure. *ACS Med Chem Lett.* 2010; 2: 17-21.
- Yessoufou K, Elansary HO, Mahmoud EA, Skalicka-Woźniak K. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. *Ind Crop Prod.* 2015; 74: 752-8.
- Yuan XH, Li BG, Zhan g XY, Qi HY, Zhou M, Zhang GL. Two diterpenes and three diterpene glucosides from *Phlogacanthus curviflorus*. *J Nat Prod.* 2005; 68: 86-9.
- Zanolari B, Wolfender JL, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo MQ, Hostettmann K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography–UV detection–multiple mass spectrometry and liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectrometry. *J Chromatogr. A* 2003; 1020: 75–89.
- Zare K, Movafeghi A, Mohammadi SA, Asnaashari S, Nazemiyeh H. New phenolics from *Linum mucronatum* subsp. *orientale*. *BiolImpacts* 2014; 4: 117-22.
- Zhang WY, Feng XL, Lu D, Gao H, Yu Y, Yao XS. New lignans attenuating cognitive deterioration of A β transgenic flies discovered in *Acorus tatarinowii*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018; 28: 814-9.
- Zhang HX, Sun G, Gu JL, Du ZZ. J. New sweet-tasting oleanane-type triterpenoid saponins from “Tugancao” (*Derris eriocarpa* How). *J Agric. Food Chem.* 2017; 65: 2357-63.
- Zhang HX, Lunga PK, Li ZJ, Dai Q, Du ZZ. Flavonoids and stilbenoids from *Derris eriocarpa*. *Fitoterapia* 2014; 95: 147-53.
- Zhang X, Thuong PT, Min BS, Ngoc TM, Hung TM, Lee IS, Na M, Seong YH, Song KS, Bae K. Phenolic glycosides with antioxidant activity from the stem bark of *Populus davidiana*. *J Nat Prod.* 2006; 69: 1370-3.
- Zhou M, Xu M, Ma XX, Zheng K, Yang K, Yang CR, Wang YF, Zhang YJ. Antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Ilex asprella*. *Planta Med.* 2012; 78: 1702-5.
- Zhu DY, Song QG, Jian FX, Chang XR, Guo WB. Study on chemical constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Acta Chim Sinica* 1984; 42: 1080-4.