

CORFO - FONTEC

**DISEÑO DE MÉTODOS DE PRODUCCION DE
BOLDINA Y GLAUCINA A PARTIR DEL BOLDO
PARA LA
INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y DE ALIMENTOS**

Informe final

biogénesis Ltda.

junio 1993

INDICE

Materia	Página
Resumen	2
Alcaloides del boldo (figura)	3
A. Introducción	4
B. Objetivos	8
C. Resultados	10
I.I.1. Establecimiento del proyecto	10
I.I.2. Revisión y actualización de la literatura	10
I.I.3. Organización del equipo de trabajo	11
I.I.4. Cotización y adquisición de materiales e insumos	12
I.I.5. Diseño de protocolos y montaje de técnicas	12
I.II.1. Tratamiento y análisis de materia prima	18
1.1. Secado	19
1.2. Molienda y análisis granulométrico	19
1.3. Análisis de boldina	20
I.II.2. Estudio de oxidación de boldina	23
I.II.3. Estudio de cinética de extracción inicial	24
I.II.4. Estudio de extracción de no-alcaloidales	30
I.II.5. Equilibrio de distribución. Extracción con solventes	33
I.II.6. Cristalización de boldina cruda	35
I.II.7. Purificación de boldina	37

II.1. Síntesis de 9- <i>O</i> -metilboldina y glaucina	39
II.2. Cinética de metilación	43
II.3. Optimización	47
II.4. Separación de <i>N,N</i> -dimetilanilina	52
II.5. Preparación de sales de la glaucina	55
II.6. Purificación de sales	57
II.7. Regeneración de agentes metilantes	58
D. Comentarios finales	60
Ejemplos	66
Extracción de alcaloides totales de la corteza de boldo	66
Cristalización de boldina-CHCl ₃ cruda	67
Purificación de boldina-CHCl ₃	67
Preparación de clorhidrato de boldina	68
Metilación de boldina con diazometano	69
Preparación de metolsulfato de feniltrimetilamonio	70
Preparación de hidróxido de feniltrimetilamonio	71
Metilación de boldina con hidróxido de feniltrimetilamonio	71
Preparación de bromhidrato de glaucina	72
Preparación de sesquifosfato de glaucina	73
Bibliografía seleccionada	74

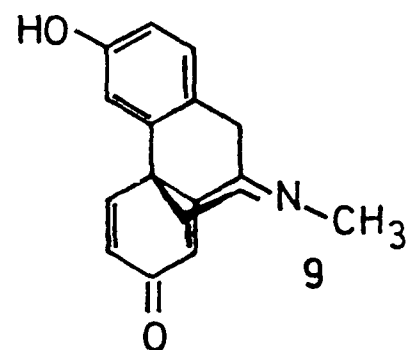
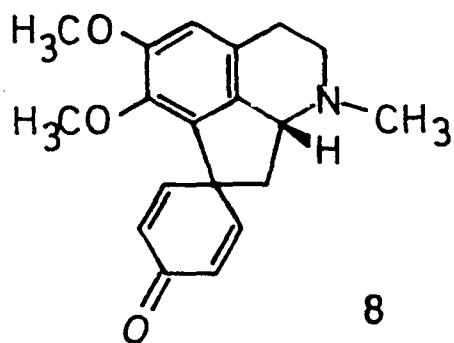
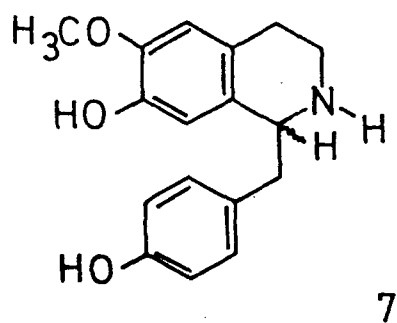
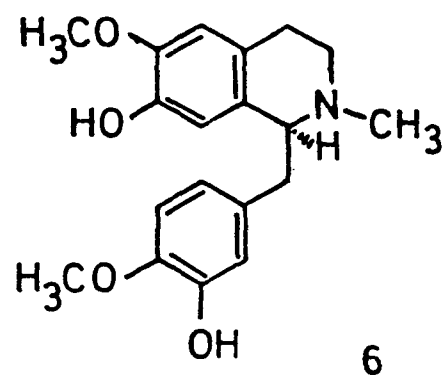
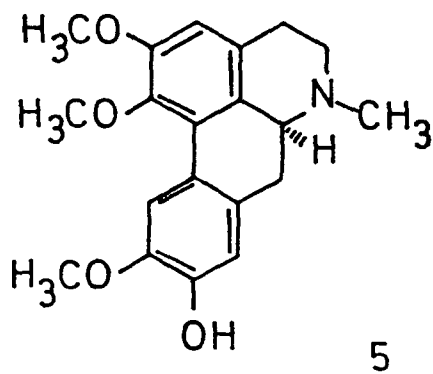
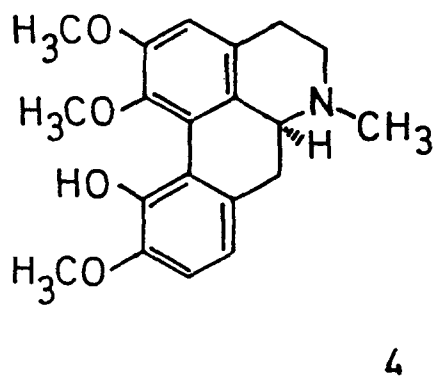
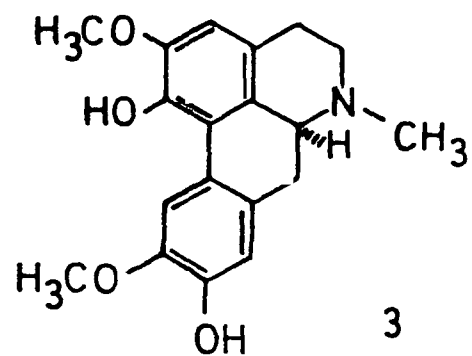
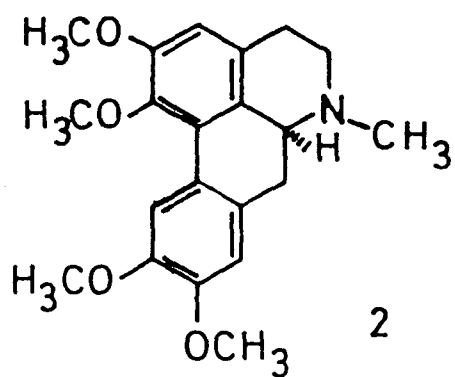
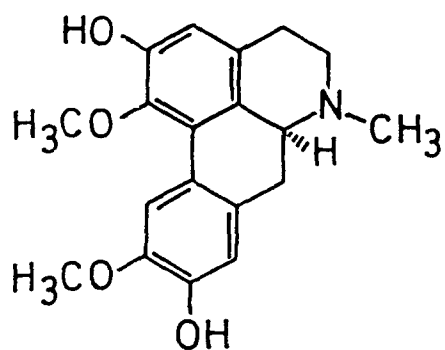
RESUMEN

La boldina (1), alcaloide principal del boldo (*Peumus boldus* Mol.), es un producto que en el último tiempo ha ido cobrando importancia científica y comercial debido a sus propiedades antioxidantes, aprovechables sobre todo en las industrias de alimentos y farmacéutica. Este hecho conduce a que su producción en escala industrial se revele como una vía válida para aumentar el valor agregado del boldo, recurso natural que en la actualidad se exporta sin ninguna elaboración. Por otra parte, la estructura química de la boldina la señala como una interesante materia prima para la síntesis de su *O,O*-dimetiléter, conocido como glaucina (2), un importante agente para el tratamiento sintomático de la tos.

En el desarrollo de este proyecto se pusieron a punto metodologías que permiten aislar boldina con buen rendimiento y económicamente a partir de la corteza de boldo. Trabajando con estos métodos la boldina se obtiene inicialmente como un producto crudo constituido en un 90% por el complejo (1 : 1) con cloroformo, consistiendo el resto principalmente de alcaloides minoritarios del boldo tales como los aporfinoides glaucina (2), isoboldina (3), isocoridina (4), *N*-metil-laurotetanina (5), sus *N*-óxidos y análogos *N*-desmetilados y de deshidrogenación parcial, además de reticulina (6), coclaurina (7), pronuciferina (8) y sinoacutina (9). Se establecieron condiciones convenientes para purificar la boldina cruda como su complejo con cloroformo, relativamente inestable al aire y a la luz, o bien como diversas sales más adecuadas para su almacenamiento y para el uso biomédico entre las cuales se destacan el clorhidrato y el tartrato ácido (1 : 1).

Se desarrollaron dos métodos alternativos para transformar la boldina en glaucina: ambas son *O*-metilaciones selectivas, ya sea con diazometano o con hidróxido de feniltrimetilamonio, siendo la segunda la única de interés industrial. Se establecieron condiciones para transformar la glaucina cruda en sales de utilidad biomédica, en especial el bromhidrato, el lactato y el sesquifosfato (1.5 : 1), para la primera de las cuales ya existe un mercado en la industria farmacéutica.

ALCALOIDES DEL BOLDO



A. INTRODUCCION

En la actualidad las industrias de alimentos y farmacéutica emplean grandes volúmenes de sustancias antioxidantes sintéticas en la prevención del daño peroxidativo de grasas, aceites y otras moléculas de naturaleza lipídica. Durante la última década, sin embargo, el uso de estos antioxidantes ha sido ampliamente cuestionado por la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos) como resultado de las crecientes demostraciones de su potencial riesgo para la salud humana (citotoxicidad y carcinogénesis). Esta situación ha llevado a un renovado interés industrial por la búsqueda y el desarrollo de sustancias antioxidantes, pero de origen natural. Esto último se fundamenta en la premisa - favorecida tanto por el mercado consumidor como por las autoridades de salud - de que por ser naturales las sustancias de dicho origen son potencialmente menos tóxicas.

Una alternativa interesante, surgida recientemente como resultado de nuestras investigaciones, se basa en el aprovechamiento de la potente actividad antioxidante que presentan productos naturales contenidos en el boldo (*Peumus boldus* Molina). Esta especie nativa, que crece en forma espontánea y abundante entre la IV Región y la X Región de Chile, es la fuente de las hojas que se utilizan mayoritariamente en Sudamérica en infusiones a las que se les atribuyen variadas propiedades medicinales. En diversos países europeos es más común el uso de extractos más o menos purificados de hojas de boldo (también importadas desde Chile), que gozan de cierta reputación sobre todo como digestivos. Hemos

encontrado que la boldina (1), compuesto presente en abundancia en este árbol [1], se comporta de manera altamente efectiva en la preservación del aceite de pescado [2] así como en la protección de componentes celulares contra el daño peroxidativo radicalario [3]. Cabe destacar que tal actividad resulta ser a lo menos igual o superior a la de la mayoría de los antioxidantes sintéticos actualmente en uso. Sumándose a la alta efectividad de la boldina como antioxidante, la reconocida inocuidad de esta sustancia [4] plantea como muy viable su utilización en las industrias alimentaria y farmacéutica.

El interés por la investigación y el desarrollo de productos naturales con actividad antioxidante no se limita a la sustitución de los compuestos sintéticos actualmente en uso. De hecho, el reciente reconocimiento de la participación de procesos radicalarios oxidativos en numerosas patologías permite proyectar el uso de la boldina en la elaboración de productos de vital importancia para la industria farmacéutica. Por otra parte, la estructura de la boldina permite plantear una amplia gama de modificaciones hemisintéticas entre las cuales destaca su transformación en glaucina (2) [5, 6], compuesto de probada utilidad como antitusivo [7] que actualmente ocupa un espacio en el mercado farmacéutico mundial. Existen patentes que describen la glaucina como componente de preparados antialérgicos [8] y analgésicos [9], y de manera un tanto inesperada se ha demostrado ultimamente que este alcaloide es también un antioxidante de actividad comparable a la boldina [10] y que por lo tanto posee una potencialidad terapéutica que no ha sido explorada en absoluto.

Chile, como único productor mundial de boldo, ha venido exportando por décadas hojas y ocasionalmente corteza de esta planta a diversos países europeos y latino- americanos. Cada año, por concepto de dichas exportaciones, nuestro país ingresa alrededor de U\$S 350.000. Por otra parte, tan sólo por concepto de importaciones de etoxiquin, antioxidante sintético empleado en la industria nacional elaboradora de harina de pescado, Chile gasta cerca de U\$S 5.000.000 anuales.

En el marco de los objetivos generales del presente proyecto, el interés oficial por incorporar valor agregado al boldo se evidencia en el apoyo de CORFO a través de FONTEC para diseñar métodos de extracción técnica y económicamente viables de boldina, así como su conversión en glaucina.

Las hojas de boldo han sido la materia prima tradicional para obtener boldina y como tales han sido objeto de varias patentes de invención [11]. Sin embargo, este alcaloide no es mayoritario en las hojas de la planta, en las cuales además la concentración de alcaloides totales es relativamente baja. Se sabe que la corteza de boldo es una fuente mucho más rica y ventajosa y que por lo mismo este material vegetal se exporta ocasionalmente a países europeos. No obstante lo anterior, no existen patentes relativas a la extracción de boldina desde la corteza del árbol y varias tesis de grado de universidades chilenas que han tocado el tema o bien son inaccesibles [12], o bien sus conclusiones carecen de interés o no han podido ser reproducidas por nosotros. Se hizo necesario, por lo tanto, reestudiar las diferentes alternativas que se ofrecen para extraer los alcaloides de la corteza de

boldo, separar y purificar la boldina y transformarla en formas más convenientes para su uso farmacológico.

La glaucina que se emplea actualmente en medicina se extrae de *Glaucium flavum* Crantz, planta papaverácea que se cultiva con este fin en Europa sudoriental. Se han patentado procesos de extracción de la glaucina [13] que intentan mejorar los rendimientos pobres que se obtienen de esta planta, en la cual el alcaloide constituye a lo sumo el 2% de la materia seca, y por lo general bastante menos. En vista de este factor limitante se ha desarrollado tecnología para sintetizar glaucina (por vías conducentes necesariamente a la mezcla racémica) y separarla en sus isómeros ópticos (*S*) (natural) y (*R*) por cristalización fraccionada de sus tartratos diastereoisómeros [14], dada la tendencia creciente por parte de los organismos reguladores a exigir que los fármacos quirales se comercialicen en sus formas enantioméricas. Sin embargo, estos procesos no parecerían poder competir económicamente con la producción de (*S*)-glaucina a partir de una boldina enantiomericamente pura y de bajo costo como la que se puede extraer de la corteza de boldo, donde se encuentra en proporciones de hasta 6% en peso, y utilizando alguno de los métodos de *O*-metilación selectiva descritos en la literatura científica y de patentes [5, 6, 15, 16]. En el presente proyecto se desarrolló una tecnología que permite obtener en Chile glaucina a partir de boldina, empleando condiciones tecnológica y comercialmente viables.

B . OBJETIVOS

Como se describiera en detalle en el proyecto original y se planteara en los Términos de Referencia, los objetivos principales para las fases 1 y 2 de la etapa I (Extracción de la boldina. Optimización y estandarización del método) y de la etapa II (Producción de la glaucina. Ensayo y estandarización del método) fueron:

- I.I.1. Establecimiento del proyecto en el lugar de trabajo.
- I.I.2. Revisión y actualización de la literatura.
- I.I.3. Organización del equipo de trabajo.
- I.I.4. Cotización y adquisición de materiales e insumos.
- I.I.5. Diseño de los protocolos de investigación y montaje de técnicas.

- I.II.1. Tratamiento y análisis de materia prima:
 - a) molienda,
 - b) análisis granulométrico y
 - c) análisis de boldina.
- I.II.2. Estudio de oxidación de boldina.
- I.II.3. Estudio de cinética de extracción inicial.
- I.II.4. Estudio de extracción de no-alcaloidales.
- I.II.5. Equilibrio de distribución. Extracción con solventes.
- I.II.6. Cristalización de boldina cruda.
- I.II.7. Purificación de boldina.

- II.1. Síntesis de *O*-metilboldina y glaucina. Obtención de *N*-metillaurotetanina.
- II.2. Cinética de metilación.
- II.3. Optimización.
- II.4. Separación de *N,N*-dimetilanilina.
- II.5. Preparación de sales de la glaucina.
- II.6. Purificación de sales.
- II.7. Regeneración de agentes metilantes.

Tal como se describe con mayor detalle en las secciones siguientes, todos estos objetivos fueron cumplidos a cabalidad.

C. RESULTADOS

I.I.1. Establecimiento del proyecto.

Según lo previsto la investigación fue emplazada en el Laboratorio de Química Biodinámica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Se celebraron los convenios que aseguraron, para los 18 meses de ejecución del proyecto, la disponibilidad de espacio de laboratorio y otras infraestructuras y la utilización de equipos e instrumental. En este sentido este objetivo básico fue cabalmente cumplido.

I.I.2. Revisión y actualización de la literatura.

Durante los meses de noviembre y diciembre de 1991 los dos investigadores principales del proyecto efectuaron nuevas búsquedas bibliográficas con el objeto de confirmar y actualizar la información disponible. En este afán se recopilaron más de 80 publicaciones primarias, una veintena de patentes y 8 tesis sobre la materia, no todas las cuales son relevantes (ver bibliografía seleccionada). Durante el desarrollo ulterior del proyecto se siguió revisando la bibliografía científica y tecnológica sin que en este período aparecieran nuevos antecedentes que alteraran la proposición inicial del trabajo sino que más bien la confirmaron en toda su extensión. Sin perjuicio de lo anterior se agregan como anexos resúmenes de las

presentaciones a congresos realizadas en los dos últimos años por los investigadores jefe y asociado de este proyecto, así como copias de los artículos publicados por los mismos en *Biochemical Pharmacology* (dos trabajos), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *Planta Medica*, *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, del manuscrito del artículo que ya ha sido aceptado para su publicación en *Fitoterapia*, y de una revisión del tema que ha sido aprobada para su publicación en *Pharmacological Research*..

I.I.3.Organización del equipo de trabajo.

El grupo de trabajo quedó conformado por el Dr. Bruce Cassels, en su calidad de investigador jefe (2 horas diarias) y el Dr. Hernán Speisky como investigador asociado (3 horas diarias). Como asistente de investigación se contrató los servicios del químico Sr. Miguel Mella (jornada completa). Asesor científico fue designado el Dr. Alejandro Urzúa, quien cuenta con amplia experiencia en el campo de los alcaloides isoquinolínicos y particularmente de los alcaloides del boldo. También participó en algunas etapas del trabajo el estudiante egresado de la carrera de químico Sr. Marcelo Asencio. El equipo de investigadores mantuvo reuniones periódicas de coordinación y planificación del proyecto en desde noviembre de 1991 hasta la finalización del proyecto, en mayo de 1993.

I.I.4.Cotización y adquisición de materiales e insumos.

Se cotizaron los reactivos e insumos en plaza y se encargaron aquellos que serían objetos de importación de modo de contar con ellos en los tiempos adecuados. Esta última situación afectaba principalmente los adsorbentes cromatográficos y las resinas de intercambio iónico dada la conveniencia de adquirir cantidades que permitieran abaratar los costos unitarios. Por lo mismo fue importante hacer los pedidos, cada vez que fue posible, con varios meses de anticipación a la fecha en que se suponía que se comenzaría a usar tales productos. La mayor urgencia se concentró en la adquisición de solventes orgánicos tales como cloroformo, metanol, éter de petróleo, diclorometano, acetonitrilo, etc. (técnicos, en cantidades de decenas hasta un par de centenares de litros, en plaza; analíticos importados), material fungible (de importación, en lo relativo a material de vidrio esmerilado standard) y algunos reactivos (ácidos y bases, agentes alquilantes y sus precursores, por ejemplo) e insumos (en su mayoría disponibles en Chile). Una parte importante de ellos ya se encontraba en el Laboratorio de ejecución del proyecto a fines de diciembre de 1991.

I.I.5.Diseño de los protocolos de investigación y montaje de técnicas.

De acuerdo a lo señalado en el punto 2. anterior, sobre la revisión de la literatura, no se encontraron nuevos antecedentes que ameritaran el cambio del

protocolo sugerido en el proyecto original. Por tanto, el protocolo de investigación fue el mismo que aquél y por ser conocido no vuelve a describir. En relación a la preparación y montaje de técnicas, en el curso de los dos primeros meses se diseñaron, implementaron y pusieron a punto las técnicas de extracción de boldina a partir de la corteza de boldo, seca y molida (ver más abajo lo relativo a procedencia y características), usando solventes orgánicos : éter de petróleo y metanol. Esto permitió evaluar la eventual importancia de un desengrasado del material vegetal antes de extraer los alcaloides. Si bien el éter de petróleo no extrae cantidades apreciables de boldina, sí permite eliminar la mayor parte de los componentes de baja polaridad como las ceras, esteroides y otros. Por el contrario, el metanol, en las condiciones experimentales más fáciles de satisfacer, que consisten en percolaciones sucesivas a temperatura ambiente, extrae la mayor parte de los alcaloides (principalmente boldina) presentes en la corteza de boldo. Con ambos solventes se utilizó el sistema *batch*, sin optimizar en la primera etapa la relación sólido/solvente ni los tiempos de contacto.

Por otra parte, para separar la fracción alcaloidal de los componentes no básicos presentes en los extractos, fue necesario aprovechar (1) la variación de las solubilidades de los alcaloides en agua en función del pH, o bien (2) su adsorción selectiva sobre resinas de intercambio catiónico. En este sentido se diseñó, montó y puso a punto ambas técnicas (1 y 2). La primera se ensayó utilizando un extracto metanólico de corteza de boldo de la VII Región (relación aproximada de 0,3 litros por cada 0,1 kg de corteza seca molida, en tres veces), previamente concentrado para eliminar y recuperar el solvente orgánico cuya presencia dificultaría las

operaciones ulteriores. Cabe mencionar que este material resultó ser inesperadamente pobre en alcaloides (3,4% en peso de materia seca), lo cual se podría atribuir de manera preliminar al hecho que se trataba de corteza de retoños jóvenes y/o a su recolección a fines del invierno. Posteriormente se efectuó el análisis cuantitativo de los alcaloides de materia prima de otras procedencias. Los primeros experimentos pusieron de relieve la importancia que tiene la elección del ácido empleado para mantener los alcaloides en solución acuosa mientras se extraen los componentes no alcaloidales con un solvente inmiscible con el agua, tal como el cloroformo y, por otra parte, la relevancia de la base que se usa para neutralizar el ácido y permitir la extracción de los alcaloides. Así, si bien no parecería ser crucial el anión para asegurar una buena solubilidad de los alcaloides en agua (y una pérdida despreciable de éstos durante la extracción del material no deseado con el solvente orgánico inmiscible), resultó claro de la experimentación que es necesario evitar la precipitación de sales junto con los alcaloides, lo que dificulta gravemente el aislamiento de estos últimos. Por ejemplo, el ácido tartárico (que pareciera ser muy conveniente debido a la mínima formación de pares iónicos con los alcaloides que pudieran ser extraídos de la solución ácida) forma un bitartrato poco soluble al agregar amoníaco (que también pareciera ser una base deseable para facilitar el control del pH óptimo para la extracción de la boldina, dado que ésta es una base fenólica, muy soluble y muy oxidable a pH elevado). Esto obliga a añadir un exceso de amoníaco que haría menos eficiente la recuperación del alcaloide. El ácido sulfúrico no presentaría este inconveniente, pero sus características hacen temer posibles bajas de rendimiento debidas a la descomposición de la boldina. Por otra parte, el ácido clorhídrico, especialmente a

concentraciones mayores o en presencia de cloruros inorgánicos, conlleva la pérdida de alcaloides (o un aumento de la complejidad del proceso) debido a su tendencia a formar pares iónicos extraíbles con solventes como el cloroformo.

En relación con el control analítico de las diferentes etapas del proceso, se tuvo éxito en el desarrollo de un método basado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) que permite cuantificar boldina en materias primas, extractos vegetales y fracciones alcaloidales mixtas, así como determinar la pureza del producto final. Este método también permitió - con modificaciones relativamente pequeñas - el análisis simultáneo de boldina, glaucina y otros alcaloides minoritarios del boldo. El proceso consiste en la elución isocrática de boldina con una mezcla de metanol y tampón de fosfato de pH 6 (50:50) como fase móvil en una columna de fase reversa Lichrosorb C₁₈, tal como se describe en el artículo de los investigadores principales de este proyecto publicado en *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, seguida de un gradiente de concentración en el cual aumenta progresivamente el porcentaje de metanol en el eluyente para eluir sustancias menos polares (como la glaucina, por ejemplo) en tiempos suficientemente cortos como para que el método resulte de utilidad práctica, en el análisis simultáneo de diversos compuestos presentes en el boldo y en extractos, fracciones y mezclas de productos de reacción. La boldina y sus análogos aporfínicos son detectados espectrofotométricamente a 280 nm y son cuantificados mediante un integrador anexo al detector. La longitud de onda elegida reúne de manera óptima las características de sensibilidad y especificidad necesarias para el análisis de compuestos aromáticos bencenoides alcoxilados

como la boldina (lo que vale también para la glaucina, la *N*-metil-laurotetanina, etc.). Este método representa una condición esencial para el monitoreo continuo de los diversos procesos ensayados para obtener este alcaloide y para el control de calidad de los productos, ya sea para su venta como tales o como intermediarios para la producción de glaucina y análogos. En su forma modificada permite seguir de manera cuantitativa el avance de la metilación de la boldina, reacción clave en la transformación de este alcaloide en glaucina y materia de la segunda etapa del proyecto.

En otro plano, se diseñó, montó y ensayó la técnica de cristalización de la boldina cruda (como complejo 1:1 con cloroformo, desde este mismo solvente, en el cual precipita al concentrar) así como también la técnica de fraccionamiento cromatográfico de la mezcla de alcaloides contenidos en las aguas madres de boldina. La boldina cruda de corteza de boldo contiene cantidades considerables de otros alcaloides y de sustancias coloreadas, por lo cual se hace necesario purificarla. Se ha visto que la recristalización en cloroformo debe repetirse hasta cuatro veces - con una etapa de tratamiento con carbón activado y filtración en caliente - si se desea llegar a un producto puro según el criterio de HPLC descrito más arriba. Esto involucra pérdidas considerables y obliga a un reprocesamiento de aguas madres cada vez más impuras. Por el contrario, la cromatografía en columna de sílice, eluyendo con mezclas de cloroformo conteniendo entre 4 y 12% de metanol, permite obtener una boldina de buena pureza en una sola etapa, aunque son cuantitativamente importantes otras fracciones que aun contienen mezclas de este alcaloide con sustancias que muestran comportamientos

cromatográficos muy similares (por ejemplo, isoboldina). En este sentido, no se debe perder de vista que la cromatografía es sin duda la mejor alternativa para recuperar algunos de los alcaloides minoritarios presentes en la corteza de boldo y que también tienen o podrían tener valor comercial: glaucina, *N*-metil-laurotetanina, isocoridina, norisocoridina, laurotetanina, laurolitsina (o norboldina), reticulina, coclaurina, por ejemplo, algunas de cuyas estructuras aparecen en la página 3. Como se señala más adelante, para la obtención de boldina de pureza adecuada para investigaciones biomédicas (mayor que la necesaria para fines farmacéuticos) se combinaron procesos de cristalización del complejo con cloroformo, de preparación del clorhidrato y de recristalización ulterior de este último.

Sin perjuicio de lo anterior, aunque en forma paralela e independiente de este trabajo, se estudió la preparación de otras sales de boldina que eventualmente podrían conducir a una mayor diversificación de productos vendibles para usos farmacéuticos o para la industria de alimentos.

A mediados de septiembre de 1991 se efectuó un viaje a la localidad de San Clemente (VII Región), donde se recolectaron las primeras muestras (10 Kg) de corteza de boldo. Con posterioridad a la iniciación del proyecto se efectuaron recolecciones análogas en la zona de Santa Cruz (VI Región), Melipilla (Región Metropolitana), Cartagena, Casablanca y Villa Alemana (V Región). Estos materiales se sometieron a procesos de secado a temperatura ambiente y en estufa a temperaturas controladas (40-60 °C). En los meses de verano, a principios de

1992, se adquirieron cantidades adicionales de materia prima ya seca (menos del 5% de humedad) en las proximidades de Melipilla y Casablanca.

Los resultados preliminares obtenidos en la fase de diseño, montaje y ensayo de los protocolos y las técnicas (solventes orgánicos, separación de la fracción alcaloidal, método de análisis, cristalización y fraccionamiento cromatográfico) proveyeron una información valiosa en cuanto permitieron ratificar, corregir y poner a punto los procesos que luego se aplicarían sistemáticamente en la fase 2 del proyecto. En este sentido la fase 1 dio cumplimiento íntegramente a los objetivos propuestos.

I.II.1.Tratamiento y análisis de materia prima:

molienda, análisis granulométrico y análisis de boldina.

La extracción de cualquier metabolito vegetal exige una molienda previa que permita un acceso suficientemente rápido del solvente al interior del tejido. La velocidad, la eficacia y la reproducibilidad de la extracción dependen, entre otras cosas, de la granulometría del material, ya que las partículas demasiado gruesas exigen más tiempo para que el solvente penetre hasta su centro y vuelva a salir cargado del material extraíble, mientras que las partículas demasiado finas introducen dificultades tecnológicas asociadas a su separación de la fase líquida. En el primer informe se había descrito someramente la obtención de corteza de boldo de diversos orígenes, su secado y el inicio del trabajo de molienda. En el

segundo se describieron los avances efectuados en el estudio de las variables involucradas, llegando a resolver de manera satisfactoria los problemas planteados.

1.1. Secado.

En relación al secado, se probó que la exposición al aire circulante, sobre bandejas metálicas, sin exposición al sol, de la corteza fresca (humedad inicial 15-20%) trozada (aproximadamente 15 cm x 3 cm), en el clima de verano de la zona central de Chile (temperaturas a la sombra de entre 15 y 30 °C), permite alcanzar al cabo de 15 días un grado de humedad residual de 5%. La extensión del período de secado hasta 30 días no modifica este resultado, que es idéntico al que se obtiene en dos días en estufa con circulación forzada de aire a 40-50 °C. Dado que la recolección del boldo se realiza en verano y en la zona central, parecería ser ventajoso adoptar como norma el secado al aire y a la sombra.

1.2. Molienda y análisis granulométrico.

En relación a la molienda, se compararon los resultados obtenidos con molinos de martillos y de cuchillas usando tamices, encontrándose que los resultados no difieren de manera significativa. Se encontró, sin embargo, que la recuperación de boldina mediante extracción metanólica fue óptima en el rango de 0,2 a 4 mm (80% de las partículas totales obtenidas). Las partículas de dimensiones inferiores a los 0,2 mm tapan sistemáticamente los sistemas de

filtración, mientras que aquellas de tamaño superior a los 4 mm exigen tiempos de extracción sustancialmente mayores y por lo tanto son económicamente menos viables. La extracción acuosa (con soluciones de menor poder humectante y de penetración en las partículas de corteza) generó resultados similares, aunque la recuperación óptima de boldina se logró extrayendo partículas con un tamaño promedio menor (entre 0,2 y 2 mm). Una vez obtenidos estos resultados, se siguió trabajando con material molido en un molino de martillos utilizando un tamiz adecuado para obtener partículas de la granulometría citada en último término.

1.3. Análisis de boldina.

Para determinar el tenor en boldina de las diversas muestras de corteza de boldo recolectadas o compradas se empleó metanol a su temperatura de ebullición (65 °C) en extractor de Soxhlet, método universalmente reconocido por su eficacia en la extracción cuantitativa de sustancias solubles en el solvente elegido. Por lo tanto, valores de boldina obtenidos luego de la aplicación de este método dan cuenta confiable del contenido de alcaloide extraíble. Los extractos metanólicos obtenidos de esta manera se concentraron a sequedad a presión reducida y a temperatura inferior a 50 °C (para minimizar posibles reacciones de descomposición) empleando un evaporador rotatorio. Los residuos de los extractos se sometieron a distribución entre soluciones acuosas de diferente pH (entre pH = 2 y pH = 10) y solventes orgánicos inmiscibles con agua tales como

cloroformo y diclorometano alcanzando el equilibrio mediante agitación mecánica. Los resultados de esta parte del trabajo se detallan en las secciones I.II.4 y I.II.5.

Sobre la base de la pesada de las fracciones alcaloidales obtenidas de las diferentes muestras por el procedimiento anterior se calculó el porcentaje de alcaloides totales en relación al peso de corteza "seca" (con aproximadamente 5% de humedad residual). Los resultados se detallan en la tabla siguiente:

Lugar de recolección	mes de recolección	alcaloides totales*
San Clemente (VII Región)	septiembre 1991	3,4%
Santa Cruz (VI Región)	noviembre 1991	6,5%
Cartagena (V Región)	diciembre 1991	6,6%
Melipilla (Región Metropolitana)	enero 1992	7,9%
Villa Alemana (V Región)	enero 1992	8,0%
Casablanca (V Región)	enero 1992	8,1%

* porcentaje calculado sobre base seca con 5% de humedad residual.

Con los datos disponibles no es posible asegurar la importancia relativa de variaciones locales y estacionales en la riqueza alcaloidal de las muestras, ya que las recolecciones se hicieron entre la VII y la V Región y entre fines de invierno y la mitad del verano. Estudios realizados por Urzúa y cols. [1] indican que la corteza seca de boldo contiene entre 6 y 10% de alcaloides. Sin embargo, nuestros resultados muestran que parecería haber una tendencia a una mayor acumulación

de alcaloides hacia el verano, época en la que normalmente se hace la recolección de boldo debido a la prevalencia de condiciones climáticas más favorables. Dado que nos fue posible adquirir cantidades considerables de corteza en las proximidades de Casablanca y que este material resultó ser el más rico en alcaloides, el trabajo ulterior se realizó con esta partida.

Para determinar el tenor de boldina en las fracciones alcaloidales se empleó el método desarrollado por nosotros [17], basado en el uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia [18]. Se empleó una columna de fase reversa (C_{18}), eluyendo a razón de 0,75 mL por minuto con metanol 45% - tampón de fosfato (pH = 7,4) y detectando los alcaloides a la salida de la columna por su absorbancia en el ultravioleta a 280 nm. De esta manera se encontró que, de los alcaloides totales de la corteza de boldo recolectado en verano en la zona de Casablanca, un 71% corresponde a boldina, lo que implica un tenor de boldina de 5,7% en peso (sobre corteza con 5% de humedad).

Según Kannegiesser [19], los porcentajes de boldina en la corteza (determinados por otro método, menos cuantitativo) variarían entre 2 y 7% independientemente de la época de explotación (entre julio y noviembre, en Sagrada Familia, VII Región). Empleando datos de Urzúa y Acuña [1] se puede calcular que las muestras de corteza analizadas por ellos contenían entre 4 y 7,5% de boldina. Nuestros resultados se enmarcan dentro de estos límites. Sin embargo, se destaca la necesidad de determinar el máximo porcentaje de boldina

extraíble de cada partida de corteza de boldo para optimizar los parámetros de su procesamiento industrial.

I.II.2. Estudio de oxidación de boldina.

La boldina es notablemente inestable a la luz y al aire. Su complejo (1 : 1) con cloroformo, que es la forma en la cual se suele obtener y comercializar, pierde lentamente el solvente de cristalización y además se oscurece como consecuencia de reacciones de oxidación apenas caracterizadas. En el presente proyecto se comprobó que, guardando el complejo boldina-cloroformo a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) en recipientes herméticos y al abrigo de la luz, no se altera perceptiblemente en el transcurso de seis meses. Por el contrario, aún en recipientes bien cerrados pero expuestos a la luz solar difusa (en el interior del laboratorio), es evidente el oscurecimiento del material al cabo de poco más de una semana.

La boldina en solución clorofórmica se oscurece en el transcurso de pocas horas cuando es expuesta a la luz solar difusa en presencia de oxígeno. Manteniendo las soluciones al abrigo de la luz su oscurecimiento se previene de manera eficaz, por lo menos durante períodos que no superan los tres días. En solución acuosa neutra la oxidación de la boldina es apreciablemente más rápida que en el material cristalizado. Además, ésta se ve acelerada por la presencia de metales como hierro y cobre. Nuestros estudios demuestran que en presencia de

quelantes como el EDTA es posible prevenir la descomposición oxidativa catalizada por estos metales. En el proceso de obtención de boldina a partir de corteza de boldo es preciso, por lo tanto, tomar la precaución de usar materiales inertes (de preferencia vidrio o polímeros sintéticos) para reducir la pérdida oxidativa del producto, así como evitar su exposición innecesaria a la luz. Si bien esta pérdida no es muy importante desde el punto de vista cuantitativo, lo es en lo que se refiere a la calidad analítica del alcaloide obtenido.

Ya en el primer informe de avance se habían mencionado intentos preliminares de preparación de sales de boldina. Aunque los resultados correspondientes se detallan más adelante (sección I.II.7), se puede señalar que, en general, las sales obtenidas son más estables a la luz y al aire (en fase sólida) que el complejo boldina-cloroformo.

I.II.3. Estudio de cinética de extracción inicial.

En el proyecto original se plantearon diferentes alternativas de proceso basadas en la extracción inicial con solventes orgánicos o con soluciones acuosas. Experimentos preliminares mostraron que no existen diferencias apreciables entre la extracción con metanol o con etanol al 95%. Por razones de costo, se trabajó en los sucesivos con metanol técnico de síntesis, prácticamente libre de residuos no volátiles y con un contenido de agua inferior al 1%.

Se fijó como meta inicial el desengrasado del material vegetal como etapa previa a la extracción de los alcaloides, de acuerdo con el procedimiento habitual en las investigaciones de química de productos naturales. Se encontró que el empleo de éter de petróleo industrial en el aparato de Soxhlet extrae cantidades importantes (hasta 5%) de material de baja polaridad (ceras, esteroides y otras sustancias entre las cuales se destacan componentes del aceite esencial), sin conducir a pérdidas de la fracción alcaloidal. A pesar de la relativa depuración de la corteza lograda por esta vía, su tratamiento con alcoholes conlleva la extracción de abundante material no alcaloidal que debe ser separado en una etapa ulterior. La experiencia acumulada en este trabajo señala que los rendimientos finales de alcaloides obtenidos con o sin desengrasado previo no difieren de manera significativa.

La cinética de la extracción metanólica se estudió a una temperatura de aproximadamente 20 °C, por percolación en un sistema *batch*, inicialmente en recipientes de un litro y después de 20 litros, usando una relación de carga inicial (volumen de metanol por peso de corteza molida) de 3 : 1 y en las etapas sucesivas de extracción, cuando el material vegetal ya estaba impregnado con el solvente, de 2 : 1. El tiempo de contacto en cada etapa fue de seis a ocho horas, más allá de las cuales se había demostrado que no aumentaba la concentración de alcaloides en el percolado. Trabajando en estas condiciones se pesaron los residuos de cada extracto metanólico sucesivo, obteniéndose los siguientes resultados que representan el porcentaje de material extraído (sólidos totales que involucran alcaloides y sustancias no alcaloidales):

Número de extracción sólidos extraídos (%) sólidos extraídos (% acumulativo)

1	10	10
2	6	16
3	4,1	20,1
4	2,8	22,9
5	2,1	25

La extracción en Soxhlet (aproximadamente 65 °C, con un gran número de etapas) indicó que el porcentaje total extraíble con metanol del material vegetal sin desengrasar fluctúa entre el 30,5 y el 31,7%. Por lo tanto, cinco extracciones *batch* a temperatura ambiente, en las condiciones ensayadas por nosotros, conducen a la acumulación de un 25% de sólidos extraídos que representan cerca del 80% del total de sustancias extraíbles con metanol ($25 \times 100 / 31,7 = 78,9\%$).

Con el fin de determinar el porcentaje de alcaloides totales en los residuos reunidos, se efectuó un reparto de dichos residuos entre cloroformo y una solución acuosa de pH = 2 para extraer sustancias no alcaloidales (ver sección I.II.4) y luego se llevó el pH a un valor de 8 para extraer los alcaloides con el mismo solvente orgánico. De esta manera se obtuvo un 32% de alcaloides totales con respecto al peso del residuo de los extractos metanólicos. Esto corresponde a un 8% referido al peso de corteza extraída, resultado porcentual que no difiere significativamente del que se determinara con el extracto total (8,1%).

Considerando que la percolación metanólica a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) permite obtener, en cinco etapas de extracción, 79% de las sustancias extraíbles totales, y que la proporción de alcaloides extraídos en estas condiciones es prácticamente la misma que la de sustancias extraíbles no alcaloidales, se puede calcular que este procedimiento conduce a un rendimiento de alcaloides de poco más del 6% ($78,9 \times 8 / 100 = 6,3\%$).

Un porcentaje similar se logra en cuatro etapas en lugar de cinco si se aumenta la temperatura hasta 30 °C. En estas condiciones, sin embargo, las pérdidas de metanol por evaporación empiezan a hacerse apreciables y tanto la economía de solvente como consideraciones de salud ambiental obligan a plantear el uso de equipos cerrados, mucho más costosos.

Como alternativas a la extracción metanólica se estudió el comportamiento de soluciones acuosas ácidas, sobre la base de la experiencia que consignan varias patentes polacas [11] con respecto a los alcaloides de las hojas de boldo. Se trabajó con agua potable sola y con diversas concentraciones de ácido acético, observándose que el agua sola, a 20 °C, en cinco etapas de extracción efectuadas según una pauta análoga a la descrita para el metanol (relación peso-volumen inicial, 1 : 3; y 1 : 2 en las extracciones ulteriores), sólo dio un rendimiento de alcaloides del 2,8% sobre peso de corteza seca, lo que corresponde al 35% de los alcaloides presentes según el criterio de extracción metanólica en Soxhlet ($2,8 \times 100 / 8,1 = 34,6\%$). Se compararon los rendimientos obtenidos por percolación simple y con agitación mecánica, observándose que sin agitación no hay

diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos con tiempos de residencia de entre dos y seis horas en el percolador, mientras que la agitación permite alcanzar los mismos rendimientos en una hora. Como norma se adoptó un tiempo de residencia (con agitación) de una hora para cada etapa de extracción.

Empleando soluciones de ácido acético 0,1 M, también a 20 °C, el rendimiento de extracción en cinco etapas fue ligeramente inferior al 3,1%, correspondiente al 37,6% de los alcaloides totales presentes y por lo tanto apenas supera el que se obtiene con agua sola. Aumentando la concentración del ácido acético a 0,5 M y trabajando siempre a 20 °C, se obtuvo un rendimiento del 5,8% (correspondiente al 71,6% de los alcaloides totales) en cinco etapas. Este rendimiento se elevó al 6,3% en una etapa más y al 7,1% recién tras un total de nueve extracciones. Por lo tanto, cabe destacar que la aplicación de soluciones ácidas de bajo costo, que evitan la necesidad de recuperar metanol, constituiría una alternativa muy conveniente para la extracción de los alcaloides de la corteza del boldo.

Para evaluar la influencia de la naturaleza más o menos lipofílica del ácido en estos resultados, y sobre la base de una de las patentes [11] que describen la extracción y el fraccionamiento de los alcaloides de las hojas del boldo, se hicieron ensayos paralelos empleando ácido acético 0,5 M conjuntamente con ácido tricloroacético 0,05 M. En estas condiciones el rendimiento de alcaloides obtenidos al cabo del fraccionamiento descrito más arriba fue de sólo 5,2% en cinco etapas, 5,3% en seis etapas y 5,6% en nueve etapas, pudiéndose detectar cromatográficamente cantidades considerables de alcaloides, entre los cuales se

reconoció claramente la boldina, en el extracto clorofórmico hecho a $\text{pH} = 2$. Esto se explicaría por la formación de pares iónicos solubles en cloroformo en los cuales participan el anión muy lipofílico del ácido tricloroacético y los cationes (ácidos conjugados) de los alcaloides más lipofílicos de la mezcla total, que en las hojas de boldo (no así en la corteza) son mayoritarios. A pesar de esta circunstancia, el análisis cromatográfico de la mezcla alcaloidal extraída a $\text{pH} = 8$ mostró que su contenido de boldina no superaba el 80%, lo cual indica que el agregado de ácido tricloroacético no constituye ninguna ventaja adicional para el fin que se persigue.

Con el objeto de estudiar la influencia de la temperatura en la cinética de extracción de los alcaloides de la corteza de boldo, se estudió el comportamiento del sistema con ácido acético 0,5 M a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. De esta manera se lograron rendimientos de alcaloides totales de 6,8% en cinco etapas, de 7,2% en seis etapas y de 7,9% (sobre un máximo teóricamente alcanzable de 8,1%) en nueve etapas.

Por último, se compararon los resultados anteriores con los que se obtuvieron a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero utilizando ácido acético 1,0 M. En estas condiciones, al cabo de cinco etapas, se obtuvo un rendimiento del 7,2% que ascendió al 7,6% con una etapa más, lo que indica una pequeña ventaja con respecto a la operación con ácido 0,5 M. De este estudio se concluye que resulta conveniente trabajar a temperatura un poco superior a la ambiente y que la concentración óptima de ácido acético es cercana a 1M.

I.II.4. Estudio de extracción de no-alcaloidales.

Los extractos de corteza de boldo, obtenidos ya sea con solventes orgánicos o con soluciones acuosas, contienen invariablemente sustancias no alcaloidales que es necesario separar de los alcaloides. Algunas de estas sustancias, tales como por ejemplo la sacarosa que se suele encontrar en cantidades importantes en los tejidos vegetales, son muy solubles en agua. Esto permite separarlas mediante la extracción de los alcaloides desde sus soluciones acuosas con solventes relativamente apolares como el cloroformo o el diclorometano. Otros componentes no alcaloidales, como los terpenoides, arilpropanoides y lignanos en general y algunos flavonoides, se extraen eficazmente con cloroformo y solventes análogos. Por esta razón es necesario someter los extractos totales obtenidos a fraccionamientos que se basan en el reparto de sus componentes entre soluciones acuosas y solventes orgánicos no miscibles con agua. En estos fraccionamientos se aprovecha el equilibrio ácido-base de los alcaloides para asegurar, según convenga, su permanencia en la fase acuosa o en la fase orgánica.

Sabiendo que la boldina y los demás alcaloides presentes en el boldo se encuentran casi totalmente protonados y, por lo tanto, no son extraídos como tales por solventes orgánicos desde sus soluciones acuosas a valores de pH inferiores a 3, se adoptó como norma la acidificación de los extractos iniciales con ácido clorhídrico hasta $\text{pH} = 2$. En estas condiciones las extracciones con cloroformo y con diclorometano arrojaron resultados un tanto diferentes pero que a nuestro

juicio no revisten importancia práctica. Así, por ejemplo, usando un volumen de solvente orgánico por cada dos volúmenes de extracto acuoso con ácido acético 0,5 M, se obtuvo en cuatro extracciones rendimientos de 3,9% y de 5,2% (en relación al peso de corteza de boldo) de sustancias no alcaloidales, respectivamente, con cloroformo y con diclorometano. El uso de uno u otro solvente en esta etapa no modificó de manera apreciable ni el rendimiento ni la composición de la mezcla de alcaloides crudos, salvo en los casos en los cuales se trabajó con mezclas de ácidos acético y tricloroacético en la extracción inicial, tal como se vio en la sección anterior.

Una alternativa al uso de solventes inmiscibles con agua es el empleo de resinas de intercambio catiónico que son capaces de retener los alcaloides en su forma protonada (en general, a pH ácido), permitiendo eliminar las sustancias no alcaloidales por simple lavado. Para evaluar esta metodología se hicieron pasar a razón de 1 mL por minuto extractos acuosos ácidos de corteza de boldo, cuyo pH se reguló a valores entre 4 y 2, a través de lechos de resinas carboxílica (Amberlite CG-50) y sulfónica (Lewatit S-100) de volúmenes calculados sobre la base de su capacidad (del orden de 1 meq/mL), previamente convertidas en su forma protonada por regeneración con HCl 1 M (relación 1 : 5 g/mL, flujo 1 mL/minuto) y lavadas con agua destilada. Luego de la elución con HCl 1 M, alcalinización a pH = 8 del eluido y su extracción con cloroformo, se encontró que las cantidades de alcaloides retenidas constituían menos del 15% de lo introducido en las columnas. Para determinar el destino de los alcaloides faltantes se repitieron los experimentos recogiendo las aguas de lavado, llevándolas a pH = 8 y

extrayéndolas con cloroformo para cuantificar los alcaloides no retenidos. De esta manera fue posible recuperar más del 80% de la cantidad de alcaloides presente en el extracto ácido alcaloidal introducido en la columna. Estos resultados poco alentadores se atribuyen al hecho de que los extractos acuosos del material vegetal contienen concentraciones elevadas de cationes inorgánicos tales como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} que son retenidos preferencialmente. Fue posible fijar de manera cuantitativa los alcaloides en las columnas mediante el uso de relaciones resina/extracto alcaloidal suficientemente altas, entre seis y ocho veces superiores a las esperadas considerando la cantidad de alcaloides presentes. Sin embargo, el costo de la resina necesaria, los grandes volúmenes involucrados y la incertidumbre de poder separar adecuadamente los alcaloides de las sustancias no alcaloidales nos hicieron desistir de un mayor desarrollo de este método.

Cabe señalar, sin embargo, que el uso de resinas de intercambio de cationes para separar los alcaloides de las sustancias no alcaloidales puede ser una alternativa válida en procesos en los cuales la extracción inicial se realice con alcoholes de bajo peso molecular tales como metanol, etanol o isopropanol, ya que las solubilidades de las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos en estos solventes son muy apreciablemente menores que sus solubilidades en agua o en ácido acético diluido y, por lo tanto, los cationes correspondientes no son extraídos en proporción importante por estos solventes.

I.II.5. Equilibrio de distribución. Extracción con solventes.

Para recuperar los alcaloides de la solución ácida de la cual se han eliminado los componentes no alcaloidales extraíbles con solventes inmiscibles (sección I.II.4), es necesario liberar las bases orgánicas de sus formas protonadas mediante un aumento del pH. En los procesos utilizados para extraer muchos alcaloides el pH alcanzado no es crítico y se prefieren valores elevados, generalmente superiores a 10, ya que en estas condiciones la concentración de las especies no ionizadas es máxima [20]. Sin embargo, tratándose de alcaloides fenólicos como la boldina, una elevación inadecuada del pH conduce a la formación de iones fenóxido que, al igual que las especies catiónicas, sólo se extraen con gran dificultad desde sus soluciones acuosas y de preferencia cuando se añaden contraiones muy lipofílicos. Por otra parte, como ya se ha visto (sección I.II.2), a mayor pH aumenta la velocidad de oxidación de la boldina en solución acuosa. Por lo tanto, fue necesario estudiar el equilibrio de distribución de la boldina entre cloroformo y soluciones acuosas de diferente pH para encontrar el rango óptimo de este parámetro. Trabajando con soluciones tamponadas entre pH = 7 y pH = 9 se encontró los siguientes resultados para la constante de partición aparente:

pH	K _p
7,0	12
7,4	23
7,8	27
8,2	31
8,6	30
9.0	25

Estos resultados indican, por tanto, que a pH cercano a 8,2 es posible obtener una distribución óptima de boldina a la fase clorofórmica. Adicionalmente, a este pH la oxidación espontánea de la boldina es menor que aquella observada a valores superiores de pH. Ya que las soluciones saturadas de bicarbonato de sodio recién preparadas dan aproximadamente el valor óptimo de pH para la extracción de la boldina, se encontró que era conveniente emplear NaHCO_3 sólido para alcalinizar los extractos ácidos.

En virtud del alto coeficiente de distribución de la boldina entre soluciones acuosas de pH cercano a 8 y cloroformo, fue posible lograr extracciones prácticamente cuantitativas empleando volúmenes relativamente pequeños del solvente orgánico, siempre que se operara reequilibrando la solución acuosa residual con nuevas porciones de cloroformo fresco. Así, se lograron recuperaciones superiores al 95% extrayendo tres veces sucesivas con volúmenes de cloroformo iguales a 1/5 del volumen de la solución acuosa. En consecuencia

se pasó a utilizar esta relación entre los volúmenes del solvente orgánico y la solución acuosa tanto en el trabajo analítico como en el preparativo. Cabe señalar, sin embargo, que la formación de emulsiones es un inconveniente práctico que se encuentra en esta etapa y que se supera aumentando la proporción de cloroformo o bien por centrifugación.

I.II.6.Cristalización de boldina cruda.

La boldina cristaliza en cloroformo conjuntamente con un mol del solvente por mol de alcaloide. Esta cristalización se produce con mucha facilidad, por lo cual basta con evaporar parcialmente el solvente para que se obtengan cosechas del complejo boldina-cloroformo. En la corteza de boldo, sin embargo, la boldina constituye aproximadamente el 75% de los alcaloides totales, encontrándose presente un número considerable de sustancias relacionadas que cocrystalizan con cierta facilidad. Por lo tanto, la boldina (cruda) que se obtiene por concentración de soluciones clorofórmicas de los alcaloides de la corteza de boldo está impurificada con una cierta cantidad de otras sustancias alcaloidales extraíbles con cloroformo desde soluciones acuosas alcalinas. Las aguas madres de la boldina cruda contienen todos los componentes de la mezcla original, pero empobrecidos en boldina.

Debido a lo anterior, el grado de pureza de la boldina que se obtiene por cristalización en la solución clorofórmica concentrada disminuye en la medida en

que se fuerce un aumento del rendimiento por evaporación de cantidades mayores de solvente. En otras palabras, si se concentra más la solución clorofórmica original se obtiene más boldina pero de calidad inferior.

Concentrando la solución clorofórmica de alcaloides totales (obtenida reuniendo los tres extractos sucesivos de la solución acuosa acética alcalinizada) a poco más de 60 °C (temperatura de ebullición del cloroformo y sus soluciones diluidas a presión normal) hasta que apenas comienza la cristalización del complejo boldina-cloroformo, y enfriando a continuación la solución saturada hasta una temperatura de 20 °C con agitación continua, se alcanza en pocos minutos un equilibrio en el cual el rendimiento de la fase sólida corresponde a cerca del 70% de la masa de alcaloides. Por filtración al vacío, sin lavado ulterior (ya que las pérdidas son considerables), se obtiene una boldina cruda de un tenor de aproximadamente 90% de pureza. De esta manera, partiendo de 1 kg de corteza se obtienen 75 g de boldina cruda que contiene unos 67 g del complejo boldina-cloroformo correspondientes a aproximadamente 49 g de boldina pura.

Si la solución clorofórmica de alcaloides totales se concentra más allá del punto en el cual se inicia la cristalización del complejo boldina-cloroformo, el producto obtenido comienza a empobrecerse en boldina aunque el rendimiento total de alcaloides aumenta. Las boldinas crudas menos puras ya no se pueden purificar adecuadamente por recristalización (ver sección I.II.7) y se hace necesario recurrir a procedimientos cromatográficos.

Concentrando las aguas madres alcaloidales a sequedad se obtiene un residuo que pesa unos 45 g y contiene cerca del 30% de boldina. Sin embargo, dada la participación minoritaria de la boldina en esta mezcla alcaloidal, la aplicación del procedimiento anterior no conduce a un enriquecimiento de los cristales en el material deseado. Como resultado de esto último, optamos por reservar estos residuos de aguas madres, en conjunto con los que se obtienen en la purificación de la boldina (sección I.II.7), para separar cromatográficamente los alcaloides minoritarios y al mismo tiempo recuperar la mayor parte de la boldina contenida en dichos residuos.

I.II.7.Purificación de boldina.

Para purificar la boldina cruda de 90% de pureza resultó ser adecuada la recrystalización en cloroformo. Repitiendo el esquema de cristalización seguido para obtener el alcaloide crudo, se obtiene con un rendimiento de 80-85% (62 g partiendo de 1 kg de corteza) un complejo boldina-cloroformo de aproximadamente 96% de pureza. Para lograr boldina-cloroformo de aproximadamente 98% de pureza basta con una cristalización más, en la cual se vuelve a perder necesariamente algo más del 10% del material. En consecuencia, cuando se logra tal pureza, el rendimiento de boldina-cloroformo se reduce a 55 g (correspondientes a 40 g de boldina pura) por kg de corteza. Las propiedades espectroscópicas de este material son las siguientes:

BOLDINA (**1**)-CHCl₃.—RMN de ¹H δ (CDCl₃) 2.53 (3H, *s*, NCH₃), 2.6 (3H, *m*, H-4β/5β/7β), 3.0 (3H, *m*, H-5α/6α/7α), 3.1 (1H, *m*, H-4α), 3.59 (3H, *s*, OCH₃-1), 3.90 (3H, *s*, OCH₃-10), 6.61 (1H, *s*, H-3), 6.81 (1H, *s*, H-8), 7.27 (1H, *s*, CHCl₃), 7.89 (1H, *s*, H-11). RMN de ¹³C δ (CDCl₃) 28.97 (C-4), 34.27 (C-7), 44.04 (*N*-CH₃), 53.58 (C-5), 56.37 (*O*-9-CH₃), 60.51 (*O*-1-CH₃), 62.79 (C-6a), 110.43 (C-11), 113.54 (C-8), 114.53 (C-3), 123.83 (C-11a), 126.24 (C-1a), 126.76 (C-1b), 129.99 (C-7a), 130.35 (C-3a), 144.22 (C-9), 145.36 (C-1), 145.88 (C-2), 148.40 (C-10).

Una alternativa útil, señalada ya en forma tentativa en el primer informe, consiste en preparar y purificar una sal de boldina, más estable frente al aire y con una solubilidad en agua más adecuada para estudios farmacológicos y formulaciones farmacéuticas. Entre las diversas sales ensayadas resultó ser más conveniente el clorhidrato, que se puede recrystalizar bien en isopropanol.

Tanto las aguas madres de la boldina cruda de 90% como las boldinas crudas de menor pureza obtenidas por eliminación de proporciones más elevadas del solvente en la cristalización inicial permiten recuperar el alcaloide principal mediante cromatografía en columnas de gel de sílice a temperatura y presión ambientes, eluyendo con mezclas de cloroformo y metanol (4 : 1). Para el manejo de 45 g de residuo de aguas madres es preciso emplear una columna que contenga aproximadamente 600 g de gel de sílice, de 15 cm de largo y 10 cm de diámetro. De esta manera se obtienen rendimientos variables de boldina que dependen del grado de pureza del material de partida, pero que en general superan el 50% de la

cantidad aplicada a la columna. Antes de la boldina se eluye una mezcla de alcaloides en la cual predominan isocoridina y *N*-metillaurotetanina. Después de la boldina se eluye otra mezcla compleja en la cual pudimos determinar por primera vez la presencia de (*R*)- y (*S*)-coclorina [21], precursores biosintéticos de los restantes alcaloides de la planta. La separación de estos componentes, así como la recuperación de cantidades adicionales de boldina, exige nuevas etapas cromatográficas análogas a la primera.

II.1. Síntesis de 9-*O*-metilboldina y glaucina.

Obtención de *N*-metillaurotetanina.

Ya en los inicios de la determinación de la estructura de la boldina (**1**), hacia 1925, este alcaloide había sido *O*-metilado selectivamente con diazometano para producir su *O,O*-dimetiléter que resultó ser idéntico a la glaucina (**2**) [5, 6]. Dada la distancia que separa los dos hidroxilos fenólicos, éstos deben metilarse de manera independiente uno del otro. Por lo tanto, para contar con patrones adecuados para efectuar estudios de la cinética de metilación, se consideró necesario contar con patrones de los dos productos de *O*-metilación parcial de la boldina. Estos son la 2-*O*-metilboldina, conocida en su calidad de producto natural como *N*-metil-laurotetanina (**5**), y la 9-*O*-metilboldina, conocida también como predicentrina (**10**).

Trabajos anteriores [22] habían señalado que, tratando boldina con diazometano durante el tiempo apenas necesario para la desaparición del alcaloide de partida, se obtenía una mezcla de predicentrina y glaucina separables por cromatografía. Este resultado pudo ser reproducido sin inconvenientes disolviendo el complejo boldina-cloroformo en metanol y tratándolo con una solución recién preparada de diazometano en éter etílico. El avance de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina en gel de sílice eluyendo con el aceótropo de cloroformo y metanol (87.5 : 12.5 en volumen). De esta manera se pudo observar la desaparición lenta de la boldina y la aparición concomitante de dos productos. Una vez desaparecidos los últimos restos de boldina se destruyó el exceso de reactivo con ácido acético, se extrajeron los alcaloides de la manera habitual y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice, siendo posteriormente identificados como predicentrina (el de R_f menor) y glaucina (el de R_f mayor) por sus espectros de RMN de protones y de ^{13}C registrados a 300 y 75 MHz, respectivamente:

PREDICENTRINA (**10**).— RMN de ^1H δ (300 MHz, CDCl_3) 2.54 (3H, *s*, NCH_3), 2.6 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.0 (3H, *m*, H-5 α /6 α /7 α), 3.1 (1H, *m*, H-4 α), 3.58 (3H, *s*, OCH_3 -1), 3.90 (3H, *s*, OCH_3 -10 o -9), 3.93 (3H, *s*, OCH_3 -9 o -10), 6.58 (1H, *s*, H-3), 6.78 (1H, *s*, H-8), 7.93 (1H, *s*, H-11). RMN de ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3) 28.86 (C-4), 34.48 (C-7), 43.92 (*N*- CH_3), 53.54 (C-5), 56.03 (*O*-10- CH_3 u *O*-9- CH_3), 56.26 (*O*-9- CH_3 u *O*-10- CH_3), 60.48 (*O*-1- CH_3), 62.77 (C-6a), 111.15 (C-11), 111.38 (C-8), 113.82 (C-3), 124.44 (C-11a),

126.17 (C-1b), 126.43 (C-1a), 129.46 (C-7a), 129.78 (C-3a), 142.66 (C-1), 148.08 (C-10), 148.26 (C-9), 148.51 (C-9), 148.63 (C-2).

GLAUCINA (2).—pf (EtOAc) 119-120 °C, RMN de ^1H δ (300 MHz, CDCl_3) 2.52 (3H, *s*, NCH_3), 2.8 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.2 (3H, *m*, H-5 α /6 α /7 α), 3.3 (1H, *m*, H-4 α), 3.63 (3H, *s*, 1- OCH_3), 3.86 (3H, *s*, OCH_3), 3.88 (3H, *s*, OCH_3), 3.90 (3H, *s*, OCH_3), 6.56 (1H, *s*, H-3), 6.76 (1H, *s*, H-8), 8.07 (1H, *s*, H-11). RMN de ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3) 29.42 (C-4), 34.75 (C-7), 44.16 (*N*- CH_3), 53.53 (C-5), 56.01 (*O*-9- CH_3 y *O*-10- CH_3), 56.01 (*O*-2- CH_3), 60.39 (*O*-1- CH_3), 62.79 (C-6a), 110.65 (C-8), 111.12 (C-11), 111.91 (C-3), 114.51 (C-9), 124.73 (C-11a), 127.13 (C-1a), 127.30 (C-1b), 129.05 (C-3a), 129.51 (C-7a), 144.56 (C-1), 147.73 (C-10), 148.26 (C-9), 152.20 (C-2).

En los cromatogramas analíticos efectuados para seguir la reacción de metilación de boldina con diazometano sólo se observó la presencia de boldina, predicentrina y glaucina, sin indicios de una cuarta sustancia como sería la esperable *N*-metil-laurotetanina. Si bien este hecho podría deberse a un comportamiento cromatográfico muy semejante de los isómeros 2- y 9-*O*-metilados, intentos de aislar *N*-metil-laurotetanina de la mezcla de productos de reacción no dieron resultados positivos. Por lo tanto se recurrió a la *N*-metilación de laurotetanina, accesible en Chile a partir de la corteza de laurel chileno (*Laurelia sempervirens* R. et P.) [23]. El Dr. Alejandro Urzúa nos facilitó una muestra de residuo de aguas madres del alcaloide oxoaporfínico aterolina, obtenidas en el fraccionamiento del material vegetal citado, que contenían cantidades apreciables

de laurotetanina. Por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con mezclas de clorofomo y metanol de polaridad creciente, fue posible purificar laurotetanina, caracterizada espectrometricamente :

LAUROTETANINA (5a).—RMN de ^1H δ (300 MHz, CDCl_3) 2.6 (3H, *m*, H-4/5/7), 3.1 (4H, *m*, H-4/5/6a/7), 3.63 (3H, *s*, OCH_3 -1), 3.87 (3H, *s*, OCH_3 -2 o -10), 3.88 (3H, *s*, OCH_3 -10 o -2), 6.57 (1H, *s*, H-3), 6.80 (1H, *s*, H-8), 8.04 (1H, *s*, H-11).

La laurotetanina aislada de esta manera se sometió a una *N*-metilación selectiva en solución metanólica, por tratamiento con formaldehído y borohidruro de sodio. El producto de reacción, purificado por cromatografía preparativa, se caracterizó espectroscopicamente (RMN de protones y de ^{13}C con registro a 300 y 75 MHz, respectivamente):

N-METIL-LAUROTETANINA (5).—RMN de ^1H δ (300 MHz, CDCl_3) 2.54 (3H, *s*, NCH_3), 2.6 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.1 (4H, *m*, H-4 α /5 α /6 α /7 α), 3.64 (3H, *s*, OCH_3 -1), 3.86 (3H, *s*, OCH_3 -2 o -10), 3.87 (3H, *s*, OCH_3 -10 o -2), 6.56 (1H, *s*, H-3), 6.85 (1H, *s*, H-8), 8.10 (1H, *s*, H-11). RMN de ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3) 28.73 (C-4), 34.88 (C-7), 43.81 (*N*- CH_3), 53.52 (C-5), 56.04 (*O*-10- CH_3 u *O*-2- CH_3), 56.22 (*O*-2- CH_3 u *O*-10- CH_3), 60.62 (*O*-1- CH_3), 62.53 (C-6a), 110.45 (C-3), 114.34 (C-11), 114.51 (C-8), 123.90 (C-11a), 126 (C1a), 127 (C-3a), 128 (C-1b), 129.62 (C-7a), 143.43 (C-9), 144.58 (C-1), 148.72 (C-10), 152.41 (C-2).

II.2. Cinética de metilación.

Al contar con boldina, glaucina y los dos intermediarios de mono-*O*-metilación fue posible iniciar un estudio de la cinética de metilación de la boldina. Se efectuó un análisis de los espectros de RMN de protones a 300 MHz de estos cuatro alcaloides en CDCl₃ con el fin de determinar si los desplazamientos químicos de algunos protones están suficientemente bien resueltos en estas condiciones como para intentar una cuantificación espectroscópica de las mezclas de estos compuestos.

Núcleo	1	5	10	2
H-3	6.61*	6.56*	6.58*	6.56*
H-4	NA	NA	NA	NA
H-5	NA	NA	NA	NA
H6a	NA	NA	NA	NA
H-7	NA	NA	NA	NA
H-8	6.81*	6.85*	6.78*	6.76*
H-11	7.89	8.10	7.93	8.07
<i>N</i> -CH ₃	2.53	2.54	2.54	2.52
<i>O</i> -1-CH ₃	3.59	3.64	3.58	3.63
<i>O</i> -2-CH ₃	—	3.86 [†]	—	3.86 [†]
<i>O</i> -9-CH ₃	3.90	—	3.93 [†]	3.90 [†]
<i>O</i> -10-CH ₃	—	3.87 [†]	3.90 [†]	3.88 [†]

Los valores señalados con los símbolos * y † no han sido asignados con exactitud y son intercambiables entre columnas. NA significa no asignado.

De la observación de la tabla se deduce que la región espectral entre 7.8 y 8.2 ppm contiene las resonancias correspondientes a los protones H-11 de los cuatro compuestos, con desplazamientos químicos suficientemente diferentes como para integrar las señales por separado. Por lo tanto, el registro seriado de espectros de mezclas de metilación correspondientes a diferentes tiempos de reacción debería permitir extraer conclusiones acerca de las velocidades relativas del ataque del diazometano sobre uno y otro grupo fenólico.

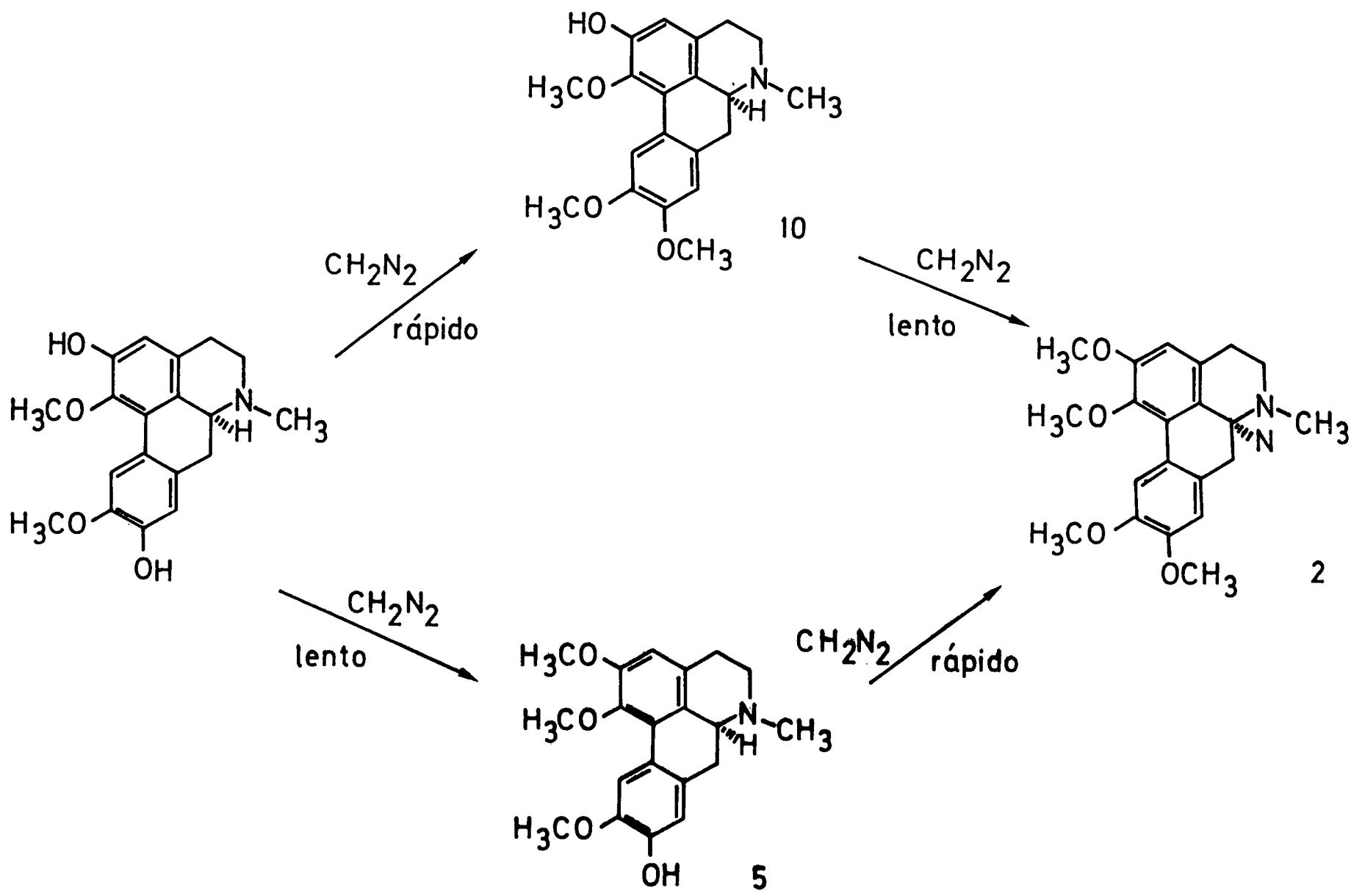
Una vez definida esta alternativa de estudio cinético, se repitió la metilación de boldina con diazometano a 20 °C, pero ahora retirando alícuotas cada diez minutos, tratando cada una de inmediato con ácido acético para destruir el exceso de reactivo y detener la reacción. Los resultados permiten describir una cinética aproximada en términos de porcentajes molares de boldina (**1**), *N*-metil-laurotetanina (**5**), predicentrina (**10**) y glaucina (**2**) a diferentes tiempos, como se resume en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	1	5	10	2
10	100	-	-	-
20	96	-	4	-
30	95	-	5	-
40	91	-	9	-
50	85	-	15	-
60	78	-	18	3
70	76	-	19	5
80	nd	nd	nd	nd
90	72	1	22	5
100	70	1	24	4

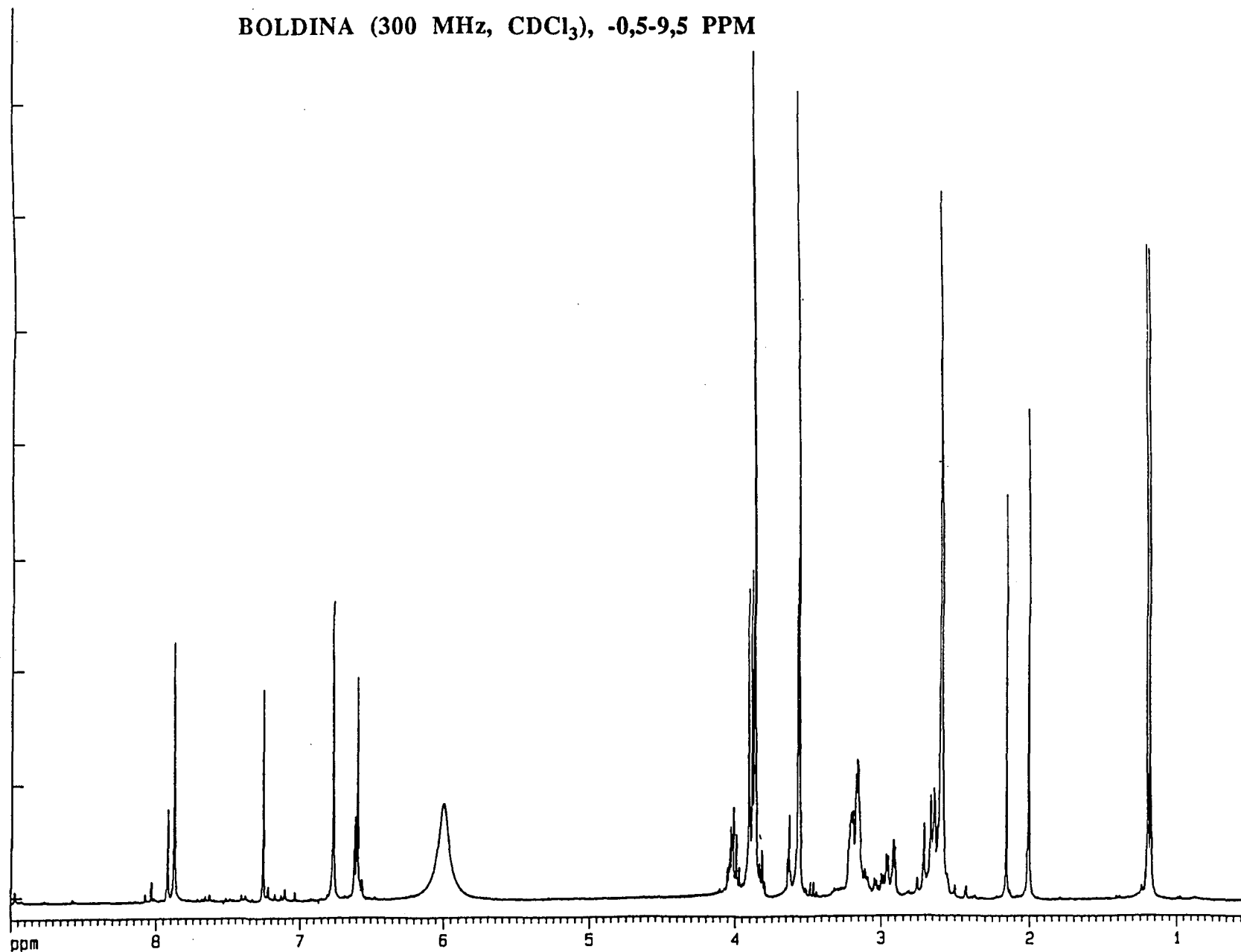
Debido a las bajas concentraciones de las sustancias involucradas, no fue posible obtener espectros de calidad óptima de algunas de las alícuotas en un tiempo razonable, por lo cual la cuantificación de los cuatro alcaloides no es muy exacta. Sin embargo, llama la atención la ausencia prácticamente total de *N*-metil-laurotetanina durante todo el tiempo transcurrido, por lo menos hasta una conversión de boldina de aproximadamente 30%. Esto avala la observación anterior (sección II.1) en el sentido de que no fue posible aislar *N*-metil-laurotetanina de la mezcla de reacción efectuada en escala preparativa. Es notable también la baja concentración de glaucina, que recién se detecta cuando se ha consumido aproximadamente 20% de la boldina inicial. Esto indica que la metilación en 2-*O*- es apreciablemente más lenta que en 9-*O*-, tanto en la boldina como en sus dos mono-*O*-metilderivados. Así, la boldina (**1**) se metila

rapidamente en 9-*O*- para dar predicentrina (**10**). Esta, a su vez, sólo se metila con lentitud en 2-*O*- para dar glaucina (**2**), y por lo tanto se observa una considerable acumulación inicial de predicentrina (**10**). Por el contrario, la lenta metilación en 2-*O*- daría origen a trazas de *N*-metil-laurotetanina (**5**) que sufrirían una rápida metilación ulterior en 9-*O*- para dar glaucina (**2**), lo que imposibilitaría la acumulación de cantidades apreciables del intermediario 2-*O*-metilado. Esta interpretación está esquematizada en la página siguiente, **46a**.

Para ilustrar este comportamiento durante la metilación se reproduce el espectro de RMN de protones (a 300 MHz, en CDCl₃) registrado después de 100 minutos de iniciada la reacción de boldina con diazometano en metanol-éter, con una ampliación de la región entre 6,5 y 8,5 ppm, que es donde se observan las mayores diferencias entre los compuestos involucrados (páginas **46b** y **46c**).



ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MEZCLA DE METILACION PARCIAL DE
BOLDINA (300 MHz, CDCl_3), -0,5-9,5 PPM



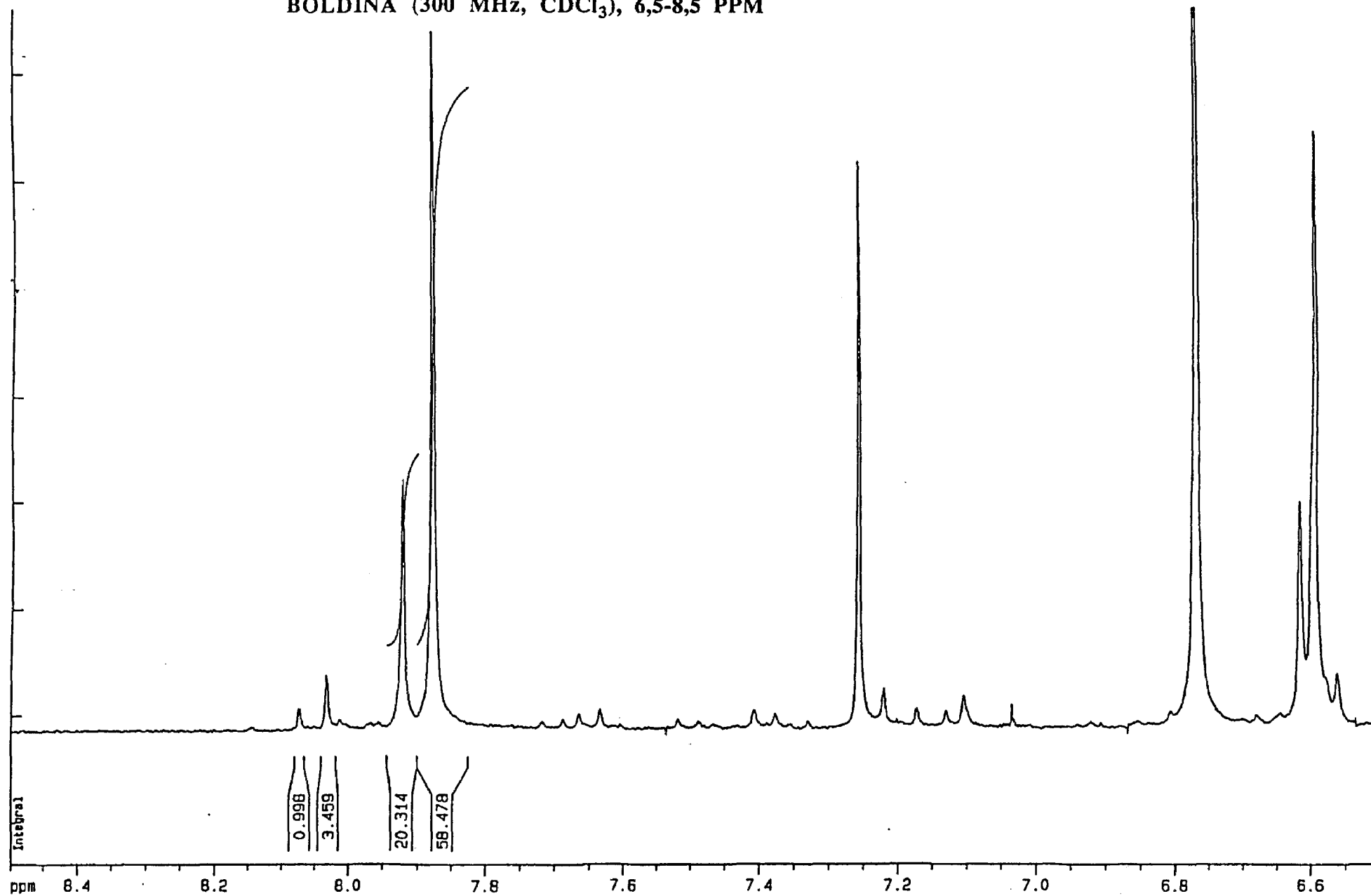
Current Data Parameters
NAME marcelo
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameter
Date 930311
Time 11.20
PULPROG zg30
SOLVENT CDCl_3
AQ 3.7355721 s
FIDRES 0.133849 H
DQ 114.0 u
RG 4
NUCLEUS ^1H
HL1 1 d
D1 1.0000000 s
P1 11.1 u
DE 142.5 u
SFO1 300.1354792 M
SWH 4385.96 H
TD 32768
NS 384
DS 2

F2 - Processing parameter
SI 16384
SF 300.1333675 M
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 H
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 22.00 c
F1P 9.000 p
F1 2701.20 H
F2P 0.500 p
F2 150.07 H
PPMCM 0.38636 p
HZCM 115.96062 H

ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MEZCLA DE METILACION PARCIAL DE
BOLDINA (300 MHz, CDCl_3), 6,5-8,5 PPM



II.3. Optimización.

Tal como se vio en la sección II.2., la metilación con diazometano es muy lenta. Por otra parte, y de acuerdo con lo señalado en el proyecto original, el reactivo es un gas explosivo y muy tóxico que sólo se puede manipular con cierto grado de seguridad y en pequeña escala en solución. Además el diazometano es relativamente caro, lo que hace menos interesante aún su utilización industrial. Sin embargo, tiene la característica inusual de metilar selectivamente los grupos fenólicos en presencia de funciones amina, como es el caso de la boldina.

Una alternativa que sí se utiliza ampliamente en la industria para la *O*-metilación selectiva de la morfina [15], reacción que constituye la fuente principal de codeína, que se emplea sobre todo como antitusígeno, es el ataque nucleofílico del anión fenolato derivado de la morfina sobre el catión feniltrimetilamonio. Esta reacción fue estudiada con cierto detalle hace ya casi ochenta años, aunque en esa época su mecanismo no había sido racionalizado [16]. En décadas posteriores se utilizó esporádicamente en modificaciones hemisintéticas de alcaloides fenólicos, pero recién hacia 1980 volvieron a ser consideradas sus proyecciones industriales más allá del uso ya tradicional para transformar morfina en codeína [6, 24].

Ya que para activar los grupos fenólicos para la metilación es necesario tratar el alcaloide (en este caso boldina) con una base fuerte, se ha planteado en general el uso del feniltrimetilamonio como hidróxido o como un alcóxido inferior. El hidróxido de feniltrimetilamonio es un producto que sólo se comercializa en

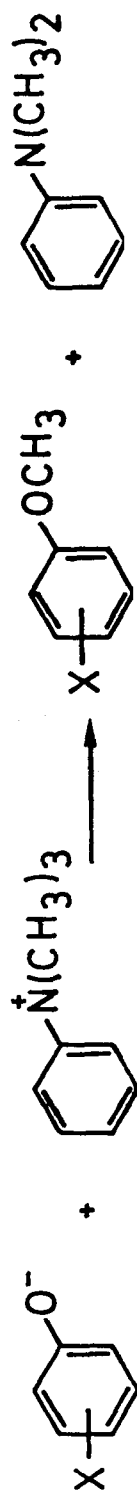
pequeña escala, en solución acuosa o metanólica, como reactivo analítico, a precios prohibitivos desde el punto de vista industrial. Se puede preparar a partir de sales comerciales como el cloruro, el bromuro, el yoduro, el bencenosulfonato o el metosulfato, pero éstas también son relativamente caras. Fue necesario, por lo tanto, poner a punto un método de obtención de hidróxido de feniltrimetilamonio que utilizara reactivos técnicos.

Con este fin se consideró en primer lugar la preparación del metosulfato de feniltrimetilamonio. Se encontró que era conveniente su síntesis tratando *N,N*-dimetilnilina disuelta en tolueno con sulfato de dimetilo a temperatura ligeramente superior a la ambiente, calentando después a 100 °C durante una hora. El producto, que es prácticamente insoluble en tolueno, cristaliza de manera casi cuantitativa cuando la mezcla se enfría a 10-15 °C, y se recoge por filtración rápida ya que es bastante higroscópico. Después de eliminar restos de tolueno por secado al vacío, queda listo para la etapa siguiente.

La preparación del hidróxido de feniltrimetilamonio de calidad óptima se logra haciendo pasar una solución del metosulfato en metanol o en agua a través de una columna de resina intercambiadora de aniones (básica fuerte, por ejemplo Dowex 1, Amberlite IRA-400, Lewatit M-600) en su forma hidroxílica. Con este objeto se preparó una solución concentrada de metosulfato de feniltrimetilamonio en metanol técnico y se hizo pasar a través de una columna de capacidad suficiente de resina Lewatit M-600 previamente regenerada con NaOH 1 M en metanol (relación 1 : 5 g/mL, flujo 1 mL/minuto), eluyendo finalmente con metanol hasta

alcanzar una concentración final 1M. Sin embargo, para el trabajo en pequeña escala, es satisfactorio y más cómodo intercambiar la mayor parte del anión metosulfato por hidroxilo mediante la precipitación del metosulfato de sodio, poco soluble en metanol frío. Para lograr este fin, el metosulfato de feniltrimetilamonio, sin purificación adicional, se disuelve en metanol técnico y se trata a temperatura ambiente con una solución al 10% de hidróxido de sodio puro en metanol técnico (hay que señalar que el metanol técnico de síntesis no contiene cantidades apreciables de impurezas que influyan en las operaciones que nos interesan). La mezcla de reacción se deja en reposo durante una noche en refrigerador y se filtra, lavando el sólido con pequeñas porciones de metanol frío (ya que es apreciablemente soluble) y se lleva al volumen calculado para una solución 1M.

La reacción de fenoles con hidróxido de feniltrimetilamonio se efectúa a temperaturas superiores a los 100 °C, ya sea en fase parcialmente sólida (sin solvente) o en un solvente inerte (tolueno, por ejemplo) que permita controlar fácilmente la temperatura al mantenerlo a ebullición en condiciones de reflujo. Sin embargo, tratándose de una reacción en la cual el intermediario mecanístico tiene una considerable separación de cargas, su velocidad depende de la polaridad del medio y es, por lo tanto, ventajoso añadir un solvente dipolar aprótico como dimetilformamida, dimetilsulfóxido o hexametiltriámina fosfórica. Se eligió la dimetilformamida debido a su menor costo, su baja toxicidad y su temperatura de ebullición bastante inferior a los solventes de alternativa.



Para someter las sales de boldina a la *O*-metilación con hidróxido de feniltrimetilamonio, éstas deberían transformarse primero en la base libre de manera de no consumir innecesariamente un equivalente adicional de reactivo. La alternativa más simple es utilizar directamente la boldina que se obtiene como base en la cristalización desde el extracto clorofórmico (ver secciones I.II.6. y I.II.7.). No obstante lo anterior, es bien sabido que el cloroformo reacciona fácilmente con soluciones concentradas de ión hidroxilo para dar diclorocarbano, sustancia muy reactiva que podría atacar la boldina para dar origen a productos secundarios indeseados. Por esta razón es necesario eliminar el cloroformo del complejo con boldina, lo que se logra mediante un calentamiento a 50 °C, bajo presión reducida, previo a la adición del hidróxido de feniltrimetilamonio.

La boldina tiene dos grupos fenólicos que deben ser metilados para obtener glaucina. Por lo tanto, cada mol de boldina consume dos moles de agente metilante. La experiencia indicó que, para efectuar la di-*O*-metilación con rendimiento óptimo, se necesita un exceso de hidróxido de feniltrimetilamonio de aproximadamente 25%. En consecuencia, se tomó como norma el empleo de una relación molar de 2,5 : 1 de agente metilante con respecto al alcaloide.

Tomando en cuenta los puntos señalados, fue posible disponer de boldina en condiciones adecuadas para su metilación disolviendo el complejo boldina-cloroformo en dimetilformamida y manteniéndolo a 50 °C y bajo presión reducida de trompa de agua (aproximadamente 30 Torr) durante 10 minutos para eliminar el cloroformo. La solución de boldina en dimetilformamida, previamente enfriada a

temperatura ambiente, se trata con un volumen suficiente de solución metanólica 1M de hidróxido de feniltrimetilamonio para alcanzar una relación molar de 2,5 a 1, y se vuelve a calentar a 50 °C y bajo presión reducida para eliminar el metanol. Se aumenta la temperatura hasta 120 °C y se mantiene así (a presión normal) durante el tiempo necesario para que toda la boldina sea transformada en glaucina, lo que se controla cromatográficamente. La experiencia indicó que, en general, una hora es suficiente. El control de la temperatura, a escala de laboratorio, se logra con facilidad en un baño de aceite. Sin embargo, si no se cuenta con una termostatación adecuada, es conveniente efectuar la reacción diluyendo la solución en dimetilformamida con tolueno y manteniendo el sistema a reflujo a presión normal. Al disminuir la polaridad media del solvente la reacción de metilación se hace más lenta y son necesarios tiempos mayores que pueden sobrepasar las dos horas.

Trabajando con el complejo boldina-cloroformo purificado por recristalización (de un tenor de 96-98% de pureza), independientemente de que se realice la *O*-metilación selectiva en dimetilformamida sola o en este solvente diluido con tolueno, si se sigue adecuadamente el avance de la reacción se logran rendimientos de glaucina aislada de aproximadamente 80% de lo que señala la teoría. Sin embargo, ensayos realizados sin solvente alguno, es decir, calentando directamente la boldina (previamente liberada de restos de cloroformo) con hidróxido de feniltrimetilamonio, permitieron lograr recuperaciones mayores de glaucina que se acercan al 90%, probablemente debido a la ausencia del cosolvente

dimetilformamida que perjudica la distribución del producto entre la fase acuosa alcalina y el solvente orgánico empleado para la extracción.

II.4. Separación de *N,N*-dimetilanilina.

En la reacción de metilación de fenoles con hidróxido de feniltrimetilamonio el reactivo le entrega un grupo metilo al anión fenóxido, generándose *N,N*-dimetilanilina. En el caso que nos interesa, tanto la glaucina como la *N,N*-dimetilanilina son sustancias básicas que deben ser separadas antes de intentar preparar sales de glaucina para su purificación y ulterior comercialización, ya que de otra manera las dos bases consumirían por igual el ácido utilizado y sería necesario un proceso engorroso de cristalización fraccionada de las sales formadas. Para superar este inconveniente se consideraron dos alternativas: eliminación de la *N,N*-dimetilanilina por destilación fraccionada o por extracción selectiva.

La *N,N*-dimetilanilina hierve a presión normal a 193-194 °C, valor bastante superior a los puntos de ebullición de los solventes utilizados en la *O*-metilación selectiva. En efecto, la dimetilformamida hierve a poco más de 150 °C y el tolueno a 110-111 °C, por lo cual este último, en particular, es fácilmente eliminable de la mezcla de productos. Reduciendo la presión a valores cercanos a los 30 Torr se logra destilar la dimetilanilina a menos de 100 °C, pero aún eliminando previamente gran parte de la dimetilformamida, en estas condiciones el producto

secundario de la reacción siempre se recoge contaminado con restos del solvente dipolar aprótico. Aunque sería factible una destilación fraccionada más eficiente, por ejemplo a presiones inferiores a las que se logran con trompa de agua, o con una buena columna de fraccionamiento, se consideró inconveniente someter la glaucina a temperaturas relativamente elevadas durante un tiempo mayor que el estrictamente necesario, por lo que se abandonó esta alternativa de purificación.

La extracción selectiva de la *N,N*-dimetilanilina se basa en su carácter más debilmente básico (en su calidad de amina aromática) que la glaucina, que se puede describir como una amina terciaria alifática. La mezcla de reacción se trata con buena agitación con la cantidad de solución acuosa de ácido acético 1M necesaria para que el pH de la fase acuosa alcance un valor de 5-6. En estas condiciones la glaucina se encuentra casi totalmente protonada, mientras que la *N,N*-dimetilanilina está casi totalmente en estado de base libre. Dado que la *N,N*-dimetilanilina es bastante soluble en hidrocarburos aromáticos y la glaucina no lo es tanto, la primera se extrae de manera muy eficaz con benceno o con tolueno. El uso de benceno permite una recuperación más fácil de la *N,N*-dimetilanilina, pero el tolueno es considerablemente menos tóxico y debería ser preferido. Los extractos bencénicos o toluénicos se pueden aprovechar para regenerar el agente metilante, como se señala más adelante en la sección II.7.

En la fase acuosa de la cual se ha extraído la *N,N*-dimetilanilina permanece la glaucina, junto con la dimetilformamida en el caso en que se haya utilizado este cosolvente. Alcalinizando la fase acuosa con amoníaco concentrado hasta

pH = 8-9 precipita la mayor parte de la glaucina. En lugar de recogerla por filtración, sin embargo, ya que de todas maneras es necesario procesar las aguas madres, es preferible extraerla con cloroformo. La experiencia indicó que tres extracciones sucesivas con cloroformo en una relación volumétrica de 1 : 3 con respecto a la solución acuosa alcalina permiten recuperar la mayor parte de la glaucina contenida en esta última. En estas condiciones la dimetilformamida permanece casi completamente en la fase acuosa, aunque al parecer su presencia aumenta la solubilidad de la glaucina en dicha fase, haciendo caer el rendimiento del producto recuperado. Cuando se parte del complejo boldina-cloroformo purificado (96-98%), la glaucina obtenida de esta manera es suficientemente pura para proceder directamente a la preparación de sus sales (sección II.5.). Si se utiliza boldina-cloroformo cruda como material de partida, aunque las sales de glaucina impura cristalizan adecuadamente, se hace necesario someterlas a más etapas de recristalización. Dado que se prevé que el clorhidrato de boldina de buena pureza sea un producto comercial interesante, parece preferible en general purificar el complejo boldina-cloroformo para emplearlo tanto en la preparación del clorhidrato como en la hemisíntesis de glaucina, con la salvedad señalada en la sección I.II.2. en cuanto a la relativa inestabilidad del complejo de la base libre con cloroformo.

II.5. Preparación de sales de la glaucina.

La literatura de patentes es rica en ejemplos de sales de glaucina, tanto de la (S)-(+)-glaucina natural como de la mezcla racémica obtenida por síntesis "total". Así se describe la cristalización del bromhidrato, que es la forma tradicionalmente más utilizada por la industria farmacéutica, y del clorhidrato [25]. Al parecer debido al sabor amargo del bromhidrato y del clorhidrato, poco aptos para la preparación de jarabes y otros preparados orales para el tratamiento sintomático de la tos, la literatura más reciente suele referirse con mayor frecuencia al sesquifosfato (con nombres poco descriptivos o poco sistemáticos como por ejemplo "glaucine 1.5 phosphate"). Este habría sido preparado inicialmente en Polonia partiendo del alcaloide natural de configuración (S) [26], mientras que con posterioridad la literatura occidental se concentra en la sal preparada a partir de la base racémica sintética [27] que permite prescindir de los cultivos de *Glaucium flavum* de Europa Oriental. La base racémica ha sido resuelta por cristalización del tartrato ácido, lo que permite obtener tanto la (S)-(+)- como la (R)-(-)-glaucina [26, 27]. Por último se han descrito los lactatos de glaucina racémica y de (R)-(-)-glaucina, [28] que no parecerían ofrecer mayores ventajas con respecto a las sales del isómero natural que se prepara por *O*-metilación selectiva de la boldina según lo expuesto en la sección II.3.

En nuestras manos la preparación del bromhidrato de glaucina trascurrió sin dificultades, disolviendo la base en un alcohol inferior (de preferencia isopropanol, en el cual se alcanza un balance óptimo entre la insolubilidad de la

sal, el bajo costo del solvente y la facilidad con que se elimina este último para obtener el producto seco), y añadiendo la cantidad calculada de acetropo de ácido bromhídrico en agua (48%). Es importante no agregar exceso de ácido porque el aumento de la proporción de agua en la mezcla en la que la sal debe cristalizar hace caer de manera importante el rendimiento de ésta. Empleando la cantidad justa de ácido y manteniendo la mezcla en la que se ha iniciado la cristalización del bromhidrato a 5 °C durante doce horas, se logran rendimientos cercanos al 80%. Concentrando a sequedad las aguas madres, disolviendo el residuo en agua, llevando el pH a 9-10, extrayendo con cloroformo y eliminando éste a presión reducida se recupera glaucina en cantidades que permiten repetir la cristalización del bromhidrato alcanzando rendimientos globales que superan el 90%.

La preparación del lactato (1 : 1) de (S)-(+)-glaucina tampoco presentó mayores dificultades. Mezclando cantidades equimoleculares de soluciones de (S)-(+)-glaucina y ácido láctico en un alcohol de bajo peso molecular (de preferencia etanol o isopropanol) de manera de alcanzar una concentración final del 10% y añadiendo un volumen bastante mayor (entre 5 y 6 veces) de éter etílico en frío, el lactato precipita de manera cuantitativa con un punto de fusión cercano a los 150 °C que depende fundamentalmente de la pureza de la base empleada.

Cuando una solución de (S)-(+)-glaucina en un solvente orgánico adecuado tal como diclorometano o cloroformo (empleado para extraer la base de la solución acuosa alcalina mencionada en la sección II.3.) se trata, agitando, con ácido ortofosfórico diluido con un alcohol de bajo peso molecular (metanol, etanol o de

preferencia isopropanol), se forma un precipitado acicular de fosfatos de (*S*)-(+)-glaucina de composición variable. Para asegurar la cristalización de manera prácticamente cuantitativa del sesquifosfato resultó ser necesario un exceso considerable del ácido, que debe ser añadido en una relación molar de 2 a 3 con respecto a la base. Los cristales, muy pequeños inicialmente, se pueden hacer crecer suspendiéndolos en un volumen de etanol al 80% que no baste para disolverlos en caliente, manteniendo después la suspensión a reflujo durante varias horas. El producto recogido por filtración de la suspensión enfriada lentamente después de tratarla de esta manera se presenta con un hábito prismático, al parecer policristalino, y es más fácil de filtrar, lavar y manipular.

II.6. Purificación de sales.

El grado de pureza de las sales de (*S*)-(+)-glaucina obtenidas de acuerdo con lo descrito en la sección II.5. depende fundamentalmente de la calidad de la glaucina utilizada para su preparación. Así, por ejemplo, si se parte de un bromhidrato puro, liberando la base y cristalizando el sesquifosfato por añadido de ácido fosfórico, esta última sal se obtiene con un grado de pureza compatible con su uso farmacéutico, con un punto de fusión de 250-251 °C. Dada la relativa facilidad con la que se forma el bromhidrato, sin embargo, nos pareció más conveniente preparar inicialmente esta sal, purificándola por recrystalización. Para este objeto resultó ser el metanol el solvente más adecuado, ya que permite alcanzar en una o dos recrystalizaciones un punto de fusión de 233-235 °C.

No obstante lo anterior, el lactato de (S)-(+)-glaucina puede contener un poco de ácido láctico libre si éste ha sido empleado en exceso en la precipitación de la sal. En tal caso, el lactato se puede purificar disolviéndolo en el mínimo volumen posible de etanol al 95% y reprecipitándolo con éter etílico. De esta manera se logra un producto que funde a 152-153 °C y que se puede considerar puro para los efectos farmacéuticos.

De manera análoga es posible purificar el sesquifosfato de (S)-(+)-glaucina cruda recrystalizándolo en etanol al 80%. Este solvente puede estar "desnaturalizado" sin que este hecho afecte apreciablemente la pureza del producto. Trabajando de esta manera se obtiene un fosfato de glaucina que funde a 250-251 °C, equivalente al que se prepara partiendo del bromhidrato purificado.

II.7. Regeneración de agentes metilantes.

Tal como se señaló en la sección II.4., se obtiene *N,N*-dimetilanilina como subproducto de la reacción de *O*-metilación selectiva de la boldina con hidróxido de feniltrimetilamonio. Este subproducto se separa eficientemente de la mezcla con glaucina por extracción selectiva con benceno o tolueno desde una solución acuosa de pH = 5-6, en la cual el alcaloide se mantiene casi totalmente protonado y es por lo tanto prácticamente insoluble en hidrocarburos. Como se indicó más arriba, el uso de benceno permite una recuperación más fácil de la *N,N*-dimetilanilina

debido a su menor punto de ebullición (80 °C contra 110 °C), pero el tolueno es considerablemente menos tóxico y se recomienda su utilización preferencial. Por destilación del hidrocarburo aromático a temperatura de baño de agua y de preferencia bajo presión reducida se obtiene la *N,N*-dimetilanilina prácticamente pura. Esta se puede emplear nuevamente sin purificación ulterior para hacerla reaccionar con sulfato de dimetilo y así preparar el metosulfato y por último el hidróxido de feniltrimetilamonio, que es el agente metilante elegido, de acuerdo con lo expresado en la sección II.3.

D. COMENTARIOS FINALES

La definición de condiciones de secado y molienda asequibles de manera fácil y económica y que conducen a los resultados deseados satisface el primer objetivo de la fase II de la primera etapa del proyecto. La metodología analítica desarrollada en dicha fase sirvió plenamente el propósito de cuantificar boldina y algunos otros alcaloides minoritarios de potencial interés comercial en preparaciones obtenidas en distintas etapas del proceso extractivo. La misma metodología sirve para cuantificar predicentrina y glaucina que se forman como productos de metilación de la boldina, objetivo central de la segunda etapa del proyecto.

En relación a la oxidación de la boldina, nuestros resultados nos permitieron establecer las condiciones óptimas de estabilidad (solvente, pH, luz, etc.) de este alcaloide, tanto en soluciones acuosas como orgánicas y en estado sólido. Esta información resultó ser fundamental para la definición de condiciones de extracción, purificación y posterior almacenamiento de la boldina.

El estudio comparativo de la extracción de la corteza de boldo con diferentes solventes, atendiendo a la temperatura y al número de etapas de extracción, nos permitió establecer condiciones simples para la obtención de extractos enriquecidos en alcaloides. Se estableció la importancia de la naturaleza del

solvente así como de las condiciones de temperatura, agitación, número de etapas y pH de extracción en los tiempos y rendimientos de las alternativas de proceso.

Adicionalmente se establecieron las condiciones experimentales que permiten la extracción óptima de compuestos no alcaloidales que acompañan la boldina en sus extractos. Este paso permite una reducción importante en el costo de obtención de boldina pura, dado que el eliminar sustancias no alcaloidales en una etapa precoz favorece tanto el rendimiento como la pureza de la boldina obtenida, permitiendo el empleo de menores volúmenes de solventes costosos.

Se estudiaron los equilibrios de distribución de la boldina entre el solvente orgánico seleccionado para extraer el alcaloide de la fase acuosa y soluciones acuosas de diferente pH. Los resultados permitieron definir las condiciones apropiadas para la extracción cuantitativa de boldina a partir de extractos alcaloidales de fases intermedias del proceso.

Se establecieron las condiciones necesarias para la obtención de boldina cruda y su purificación como su complejo (en la relación molar 1 : 1) con cloroformo. Los procedimientos desarrollados plantean la posibilidad de optar por preparados de boldina que difieren en forma alternativa en pureza y rendimiento. Asimismo permiten separar alcaloides minoritarios que acompañan la boldina y que pueden resultar de interés comercial.

Más allá de lo señalado en los términos de referencia, se estudió la preparación de sales de boldina, más estables al aire y a la luz, solubles en agua y, por lo tanto, más aptas que la base libre y su complejo con cloroformo para su empleo por parte de la industria farmacéutica.

Con el fin de contar con materiales de referencia para el desarrollo de la etapa II del proyecto, se obtuvieron predicentrina (9-*O*-metilboldina) y glaucina por metilación de boldina siguiendo un método publicado. Adicionalmente se sintetizó el producto alternativo de metilación de boldina, *N*-metillaurotetanina (2-*O*-metilboldina), para lo cual fue necesario aislar laurotetanina natural a partir de una fracción de alcaloides de corteza de laurel chileno (*Laurelia sempervirens*) y someter esta sustancia a *N*-metilación selectiva con formaldehído y borohidruro de sodio.

Se estudió la cinética de metilación de boldina con diazometano, estableciéndose que por este método la metilación del grupo fenólico en C(2) es lenta y por lo tanto no se produce *N*-metillaurotetanina en cantidades significativas. Por el contrario, la metilación del grupo fenólico en C(9) es relativamente rápida y el intermediario principal en la vía conducente a la glaucina es la predicentrina. Esto nos permite considerar a futuro el desarrollo de nuevos productos derivados de la boldina, de potencial utilidad farmacológica, en los cuales se mantiene libre el hidroxilo en C(2), que parecería tener mayor relevancia desde el punto de vista de la actividad antioxidante y probablemente dopaminérgica. Por otra parte, confirmamos lo que habíamos planteado en el

proyecto original en el sentido de que la metilación con diazometano es poco interesante desde el punto de vista de la preparación industrial de glaucina, no sólo por el costo, la toxicidad y el peligro de explosión asociados con el reactivo, sino también ahora por la lentitud de la reacción clave de metilación del grupo fenólico del C(2). De esta manera reafirmamos la conveniencia de desarrollar un método de metilación alternativo, basado en el uso de hidróxido o un alcóxido de feniltrimetilamonio.

Dado que el hidróxido de feniltrimetilamonio sólo existe en el comercio como reactivo analítico de elevado costo, se desarrollaron condiciones para su síntesis. Con esta finalidad establecimos un método sencillo para preparar metosulfato de feniltrimetilamonio partiendo de *N,N*-dimetilanilina y sulfato de dimetilo técnicos y definimos condiciones que nos permitieron obtener el hidróxido necesario para la reacción con los grupos fenólicos de la boldina. Optimizamos la *O*-metilación selectiva de la boldina con hidróxido de feniltrimetilamonio, analizando la influencia de la relación molar de reactivos, del tiempo de reacción, y de la presencia de diferentes solventes, para lograr la transformación casi cuantitativa en glaucina del alcaloide del boldo.

Estudiamos dos métodos alternativos para separar de la glaucina deseada la *N,N*-dimetilanilina que se forma como producto secundario en el transcurso de la metilación con hidróxido de feniltrimetilamonio. En este sentido resultó ser más conveniente la extracción selectiva de la *N,N*-dimetilanilina con benceno o tolueno desde una solución debilmente ácida, en cuyas condiciones no se extraen

cantidades apreciables de glaucina. Una vez eliminada la *N,N*-dimetilanilina, pudimos extraer la glaucina cruda con cloroformo o diclorometano desde la solución acuosa previamente alcalinizada.

Puesto que en la actualidad la glaucina tiene interés desde el punto de vista farmacológico como antitusivo y que, como tal, se emplea en forma de sales solubles en agua, establecimos condiciones que nos permitieron la preparación de algunas de ellas entre las que destacamos el bromhidrato - que es tradicionalmente la sal más usada - y el sesquifosfato, de mejor sabor para su uso en preparados orales.

La pureza de las sales de glaucina obtenidas por nosotros dependió en gran medida de la pureza del alcaloide empleado. Esta, a su vez, es consecuencia fundamentalmente del tenor de la boldina utilizada en su síntesis. Por lo tanto, el uso de una boldina purificada (por ejemplo como su complejo con cloroformo) conduce a una glaucina de buena pureza que permite preparar sin mayor esfuerzo sales de calidad apta para el uso farmacéutico. No obstante lo anterior, considerando aquellos casos hipotéticos en los que se utilizara una boldina "cruda" o menos pura, establecimos métodos para purificar las sales de glaucina mediante su recrystalización desde alcoholes de bajo peso molecular, con o sin el agregado de éter etílico. Modificaciones de estos métodos son también aplicables a las sales de boldina a las que nos referimos más arriba.

Ya que el gasto de agente metilante empleado en la síntesis de la glaucina incide de manera apreciable en la economía del proceso, tomamos en consideración la recuperación de *N,N*-dimetilanilina desde la mezcla de metilación de boldina con hidróxido de feniltrimetilamonio. Pudimos demostrar que la *N,N*-dimetilanilina precursora del reactivo de metilación se recupera en proporción casi equimolecular con la glaucina formada cuando se la extrae con benceno o tolueno desde una solución debilmente ácida. De esta manera se obtiene un producto suficientemente puro para utilizarlo nuevamente en la preparación del metosulfato y posteriormente el hidróxido de feniltrimetilamonio. A pesar de que la metilación se logra de manera óptima con un exceso importante de hidróxido de feniltrimetilamonio que hay que dar por perdido en las condiciones actuales, y que en principio sería interesante recuperar este reactivo, su costo no parecería justificar etapas adicionales en las cuales sería necesario el uso de una resina de intercambio de cationes y grandes volúmenes de solvente que habría que evaporar y recuperar.

Como conclusión final, consideramos que los objetivos del proyecto se han cumplido de manera muy satisfactoria. Como resultado del mismo contamos ahora con métodos eficaces, económicos y de tecnología poco compleja que permiten producir a partir de la corteza de boldo el alcaloide boldina en diversos grados de pureza, algunas de sus sales solubles en agua, el fármaco antitusivo glaucina y las sales de la misma que tienen usos médicos y farmacológicos.

EJEMPLOS

Extracción de alcaloides totales de la corteza de boldo

100 g de corteza de boldo molida (tamaño de partículas entre 0,1 y 2 mm) se suspendió en 300 mL de ácido acético 1,0 M a 40 °C, agitando ocasionalmente y manteniendo esta temperatura con un baño de agua. Después de 30 minutos se filtró al vacío, el material sólido se resuspendió en 200 mL de ácido acético 1,0 M, se mantuvo a 40 °C durante 30 minutos, agitando, y se volvió a filtrar al vacío. El proceso se repitió hasta recoger 6 extractos ácidos sucesivos con un volumen total de aproximadamente 1,2 litro. Esta solución acuosa se llevó a pH = 2 con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con 3 porciones sucesivas de 600 mL de cloroformo cada una, centrifugando cada vez para lograr una buena separación de fases. Posteriormente se llevó a pH = 8-9 por agregado de NaHCO_3 sólido y se volvió a extraer de inmediato con 3 porciones de 600 mL de cloroformo, centrifugando nuevamente. Los extractos clorofórmicos de la solución alcalina se reunieron, manteniéndolos al abrigo de la luz, se lavaron una vez con 600 mL de agua, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a sequedad para dar 7,6 g de alcaloides totales con aspecto de espuma de color amarillento.

Cristalización de boldina-CHCl₃ cruda

Los alcaloides totales de la extracción anterior se disolvieron en 30 mL de cloroformo a 60-65 °C). Al enfriar la solución cristalizó el producto esperado, menos denso que la solución, que se mantuvo en contacto con las aguas madres a temperatura ambiente y a oscuras durante una noche. Se filtró, lavando con el menor volumen posible de cloroformo, recogiendo 4,8 g de complejo de boldina-CHCl₃ de 90% de pureza determinada cromatográficamente y por RMN de protones. Las aguas madres se concentraron a sequedad para la eventual recuperación de cantidades adicionales de boldina junto con alcaloides minoritarios.

Purificación de boldina-CHCl₃

10 g de boldina-CHCl₃ cruda se disolvió en 40 mL de cloroformo a la temperatura de ebullición de 60-65 °C. Después de enfriar y dejar en reposo durante una noche con las precauciones habituales, se recogió por filtración 8,0 g de boldina-CHCl₃ de 96% de pureza determinada por cromatografía. Este material fue recrystalizado de manera análoga para dar 7,2 g de boldina-CHCl₃ de aproximadamente 98% de pureza cromatográfica que funde en un amplio intervalo llegando hasta los 160 °C, $[\alpha]_D +111^\circ$ (MeOH, $c = 1$); RMN de ¹H δ (300 MHz, CDCl₃) 2.53 (3H, *s*, NCH₃), 2.6 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.0 (3H, *m*, H-5 α /6 α /7 α), 3.1 (1H, *m*, H-4 α), 3.59 (3H, *s*, OCH₃-1), 3.90 (3H, *s*, OCH₃-10), 6.61 (1H, *s*, H-3), 6.81 (1H, *s*, H-8), 7.27 (1H, *s*, CHCl₃), 7.89 (1H, *s*, H-11). RMN de ¹³C δ (75 MHz, CDCl₃)

28.97 (C-4), 34.27 (C-7), 44.04 (*N*-CH₃), 53.58 (C-5), 56.37 (*O*-9-CH₃), 60.51 (*O*-1-CH₃), 62.79 (C-6a), 110.43 (C-11), 113.54 (C-8), 114.53 (C-3), 123.83 (C-11a), 126.24 (C-1a), 126.76 (C-1b), 129.99 (C-7a), 130.35 (C-3a), 144.22 (C-9), 145.36 (C-1), 145.88 (C-2), 148.40 (C-10).

Preparación de clorhidrato de boldina

4,42 g de boldina-CHCl₃ purificada se disolvió en 15 mL de isopropanol a 50 °C y se trató con 0,85 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se añadió 45 mL de éter etílico, con lo cual precipitó una masa pastosa blanca de clorhidrato crudo. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el material semisólido se digirió a 80 °C con 10 mL de isopropanol hirviendo bajo reflujo. El producto pastoso fue dando lugar a un sólido cristalino y al cabo de una hora se dejó enfriar la mezcla, se guardó durante una noche a temperatura ambiente y se filtró, lavando el sólido con un pequeño volumen de éter etílico para obtener 2,70 g de clorhidrato de (*S*)-(+)-boldina (rendimiento de 69%), pf 220-221 °C. Las aguas madres del clorhidrato se concentraron a sequedad, el residuo se disolvió en un pequeño volumen de agua, la solución se alcalinizó por agregado de NaHCO₃ sólido y se extrajo con cloroformo para recuperar la mayor parte de la boldina no cristalizada como sal.

Metilación de boldina con diazometano.

1,16 g de boldina-CHCl₃ purificada por recristalización en cloroformo se disolvió en 10 mL de metanol y se trató con 12,5 mL de solución 0,4 M de diazometano en éter etílico a temperatura ambiente. Al cabo de 8 horas en la oscuridad la solución inicialmente amarilla se había decolorado de manera apreciable y se añadió una nueva porción de solución de diazometano, dejando nuevamente la mezcla reaccionando a temperatura ambiente durante la noche. Se controló periódicamente la composición alcaloidal de la mezcla por cromatografía, deteniendo la reacción mediante el agregado de gotas de ácido acético glacial una vez que había desaparecido la boldina. Se evaporaron los solventes y el acetato de metilo formado y el residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con aceótropo de cloroformo-metanol (87,5 : 12,5 en volumen). En las primeras fracciones se recogió (*S*)-(+)-glaucina, que cristalizó en acetato de etilo: pf 119-120 °C, $[\alpha]_D +118^\circ$ (MeOH, $c = 1$); RMN de ¹H δ (300 MHz, CDCl₃) 2.52 (3H, *s*, NCH₃), 2.8 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.2 (3H, *m*, H-5 α /6 α /7 α), 3.3 (1H, *m*, H-4 α), 3.63 (3H, *s*, 1-OCH₃), 3.86 (3H, *s*, OCH₃), 3.88 (3H, *s*, OCH₃), 3.90 (3H, *s*, OCH₃), 6.56 (1H, *s*, H-3), 6.76 (1H, *s*, H-8), 8.07 (1H, *s*, H-11). RMN de ¹³C δ (75 MHz, CDCl₃) 29.42 (C-4), 34.75 (C-7), 44.16 (N-CH₃), 53.53 (C-5), 56.01 (O-9-CH₃ y O-10-CH₃), 56.01 (O-2-CH₃), 60.39 (O-1-CH₃), 62.79 (C-6a), 110.65 (C-8), 111.12 (C-11), 111.91 (C-3), 114.51 (C-9), 124.73 (C-11a), 127.13 (C-1a), 127.30 (C-1b), 129.05 (C-3a), 129.51 (C-7a), 144.56 (C-1), 147.73 (C-10), 148.26 (C-9), 152.20 (C-2). En las fracciones ulteriores se eluyó primero mezclas de glaucina y predicentrina, y después predicentrina pura, RMN de

^1H δ (300 MHz, CDCl_3) 2.54 (3H, *s*, NCH_3), 2.6 (3H, *m*, H-4 β /5 β /7 β), 3.0 (3H, *m*, H-5 α /6 α /7 α), 3.1 (1H, *m*, H-4 α), 3.58 (3H, *s*, OCH_3 -1), 3.90 (3H, *s*, OCH_3 -10 o -9), 3.93 (3H, *s*, OCH_3 -9 o -10), 6.58 (1H, *s*, H-3), 6.78 (1H, *s*, H-8), 7.93 (1H, *s*, H-11). RMN de ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3) 28.86 (C-4), 34.48 (C-7), 43.92 (*N*- CH_3), 53.54 (C-5), 56.03 (*O*-10- CH_3 u *O*-9- CH_3), 56.26 (*O*-9- CH_3 u *O*-10- CH_3), 60.48 (*O*-1- CH_3), 62.77 (C-6a), 111.15 (C-11), 111.38 (C-8), 113.82 (C-3), 124.44 (C-11a), 126.17 (C-1b), 126.43 (C-1a), 129.46 (C-7a), 129.78 (C-3a), 142.66 (C-1), 148.08 (C-10), 148.26 (C-9), 148.51 (C-9), 148.63 (C-2).

Preparación de metosulfato de feniltrimetilamonio

Se disolvió 26,0 mL de *N,N*-dimetilanilina 99% en 100 mL de tolueno técnico a 15 °C, se calentó a 40 °C y se añadió en el transcurso de 20 minutos 19,0 mL de sulfato de dimetilo 99%, manteniendo la temperatura durante una hora más. Se calentó a 100 °C durante una hora y luego se dejó cristalizar el producto a 10-15 °C durante la noche. Se filtró, se lavó el sólido con tolueno y se dejó en desecador al vacío sobre ácido sulfúrico durante 24 horas. Rendimiento: 95%. La sal es higroscópica y debe ser expuesta lo menos posible al aire húmedo.

Preparación de hidróxido de feniltrimetilamonio

El metosulfato de feniltrimetilamonio obtenido de la manera precedente, sin purificación ulterior, se disolvió en 100 mL de metanol técnico y se trató a 15 °C con una solución de 7,6 g de hidróxido de sodio de calidad sintética en 76 mL de metanol técnico. Se dejó en reposo durante una noche a 5 °C y se filtró, lavando el sólido con pequeñas porciones de metanol hasta completar un volumen de 190 mL de solución 1M de hidróxido de feniltrimetilamonio.

Metilación de boldina con hidróxido de feniltrimetilamonio.

4,62 g de boldina- CHCl_3 recristalizada se disolvió en 20 mL de metanol a 20 °C. La solución se calentó en un baño a 50 °C en un evaporador rotatorio y se sometió a un vacío de aproximadamente 30 Torr durante 10 minutos, tras lo cual se enfrió a 20 °C, se le añadió 35 mL de solución metanólica 1M de hidróxido de feniltrimetilamonio y se volvió a calentar en un baño a 50 °C en evaporador rotatorio bajo presión reducida para eliminar el solvente. Se aumentó la temperatura del baño a 110 °C y se mantuvo así durante una hora a la presión ambiental, tras lo cual se enfrió a 15 °C. El material semisólido se suspendió en 20 mL de ácido acético acuoso al 10% y se agitó bien durante 30 minutos. La solución resultante se lavó con 3 porciones de 25 mL de benceno cada una y se llevó a pH = 9-10 con NaOH acuoso al 40%, con lo cual se formó un precipitado grumoso de glaucina (base libre). Se añadió 20 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente para disolver la

base. Después de separar las dos fases se volvió a extraer la fase acuosa 2 veces con porciones de 20 mL de cloroformo y los extractos clorofórmicos reunidos, lavados con agua y secados con Na_2SO_4 se concentraron a sequedad para dar un residuo de glaucina cruda cromatográficamente pura que pesó 3,20 g (rendimiento del 90%).

Preparación de bromhidrato de glaucina.

La glaucina cruda obtenida por extracción clorofórmica de los productos de metilación de boldina (después de eliminar la *N,N*-dimetilanilina) se disolvió en 5 mL de metanol y se añadió gotas de HBr acuoso al 48% hasta alcanzar $\text{pH} = 1$. La solución resultante se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en el volumen mínimo necesario de etanol al 95%. Al enfriar cristalizó el bromhidrato de (*S*)-(+)-glaucina (3,62 g, rendimiento de 83%) con pf 233-235 °C.

Preparación de sesquifosfato de glaucina.

2,6 g de bromhidrato de (S)-(+)-glaucina se disolvió en 10 mL de agua caliente y se alcalinizó con amoníaco concentrado. La suspensión enfriada se extrajo con 3 porciones de 5 mL de cloroformo y los extractos clorofórmicos reunidos se lavaron con 2 porciones de 5 mL de agua. La solución clorofórmica se trató con buena agitación con una solución de 0,85 mL de ácido fosfórico al 85% en 10 mL de etanol, con lo cual se formó un precipitado de la sal. La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante una noche y se filtró, lavando el sólido con un pequeño volumen de éter etílico. El producto seco pesó 2,89 g (rendimiento del 97%) con pf 250-251 °C.

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA

1. E. Bourgoïn y C. Verne, *J. Pharm. Chim.*, **16**, 191 (1872).

A. Rüegger, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 754 (1959).

D.W. Hughes, K. Genest y W. Skakum, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1023 (1968).

D.W. Hughes, K. Genest y W. Skakum, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1619 (1968).

K. Genest, L.J. Lowry y D.W. Hughes, *Microchem. J.*, **14**, 249 (1969).

A. Urzúa y P. Acuña, *Fitoterapia*, **54**, 175 (1983).

A. Urzúa y R. Torres, *J. Nat. Prod.*, **47**, 525 (1984).
2. A. Valenzuela, S. Nieto, B.K. Cassels y H. Speisky, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **68**, 935-937 (1991).
3. H. Speisky, B.K. Cassels, E. Lissi y L.A. Videla, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1575-1581 (1991).
4. H. Kreitmair, *Pharmazie*, **7**, 507-511 (1952).

M.J. Magistretti, *Fitoterapia*, **51**, 67-79 (1980).

P.R.H. Moreno, V.M.F. Vargas, H.H.R. Andrade, A.T. Henriques y J.A.P. Henriques, *Mutation Res.*, **260**, 145-152 (1991).

H. Speisky, M. Ellahueñe, S. Cofré, L.J. Núñez-Vergara y N. De La Fuente, *Mutation Res.*, en prensa (1993).

5. K. Warnat, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **58B**, 2768 (1925).

K. Warnat, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **59B**, 85 (1926).

E. Späth y K. Tharrer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **66**, 904 (1933).

E. Schlittler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **66**, 988 (1933).
6. Warner-Lambert Co., Patente Belga 872.843 (Cl. C07D), 17-4-1977.

J.-P. Metreaux (Chemisches Labor Heinrich Kaden), Patente Alemana (Occ.) 29 44 541 (Cl. C07D221/18), 17-5-1981.
7. N.T. Donev, *Farmatsiya (Sofia)*, **12**, 17-21 (1962).

P. Dierckx, G. Leblanc, A. Decoster y D. Criscuolo, *Int. J. Clin. Pharmacol.Ther.Toxicol.*, **19**, 396-399 (1981).

Y. Kasé, M. Kawaguchi, K. Takahama, T. Miyata, I. Hirotsu e Y. Okano, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **33 (II)**, 936-938 (1983).

K.H. Rühle, D. Criscuolo, H.A. Dieterich, D. Köhler y G. Riedel, *Br. J. Clin. Pharmac.*, **17**, 521-524 (1984).
8. H. Kikuchi, N. Kawaguchi, H. Shiokawa (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), Patente Alemana (Occ.) 28 23 266 (Cl. A61K31/445), 14-12-1978.
9. T.H. Gieske, P.J. Shea (Dow Chemical Co.), Patente Estadounidense 4.183.939 (Cl. 424-258; A61K31/47), 15-01-1980.
10. L.A. Martínez, J.L. Ríos, M. Payá y M.J. Alcaraz, *Free Radical Biol. Med.*, **12**, 287-292 (1992).

11. A. Metzger, L. Machon, T. Zaba, M. Ciesielski y B. Furmanska (Instytut Przemysłu Zielarskiego), Patente Polaca 102.900 (Cl. A61K31/46), 31-05-1979.

H. Speichert, M. Ciesielski, J. Lutomski, P. Gorecki y S. Popiolek (Instytut Przemysłu Zielarskiego), Patente Polaca 116.351 (Cl. C07C15/30), 30-09-1982.

L. Jusiak y E. Soczewinsky (Akademia Medyczna, Lublin), Patente Polaca 128.211 (Cl. A61K31/33), 31-01-1984.

L. Jusiak y E. Soczewinsky (Akademia Medyczna, Lublin), Patente Polaca 131.874 (Cl. A61K31/33), 31-10-1986.

M. Ciesielski, S. Popiolek, J. Kuczynski y L. Jusiak (Instytut Przemysłu Zielarskiego), Patente Polaca 136.380 (Cl. A61K31/33), 15-11-1986.
12. E. Berríos, Tesis, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 1980.

E. Klein, Tesis, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile, 1982.
13. G.V. Pintilie, L. Rosca, V. Miscov, E. Nichiforescu, N. Uricaru, I. Moldoveanu, M. Rusu y M. Niculescu, Patente Rumana 81.059 (Cl. A61K35/78), 30-1-1983.
14. A.G. Maasboel (Karl O. Helm, A.-G.), Patente Alemana (Occ.) 27 17 062 (Cl. C07D221/18), 19-10-1978.

A.G. Maasboel y A.K. Sim (Karl O. Helm, A.-G.), Patente Alemana (Occ.) 27 17 001 (Cl. A61K31/47), 19-10-1978.
15. C.H. Boehringer & Sohn, Patente Alemana (D.R.P.) 247-180, 4-09-1909.
16. V. Rodionow, *Bull. Soc. Chim.* **39**, 305 (1926).

17. H. Speisky, B.K. Cassels, S. Nieto, A. Valenzuela y L.J. Núñez-Vergara, *J. Chromatog -Biomed. Appl.*, **612**, 315 (1993).
18. V. Quercia, B. Bucci, G. Iela, M. Terracciano y N. Pierini, *Boll. Chim. Farm.*, **117**, 54
P. Pietta, P. Mauri, E. Manera y P. Ceva, *J. Chromatog.*, **457**, 442 (1988).
T.J. Betts, *J. Chromatog.*, **511**, 373 (1990).
19. U. Kannegiesser, Tesis, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, 1987.
20. F.E. Hamerslag, "The Technology and Chemistry of Alkaloids", Van Nostrand, New York, 1950.
21. M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky y A. Valenzuela, *Fitoterapia*, en prensa (1993).
22. R. Tschesche, P. Welzel, R. Moll y G. Legler, *Tetrahedron*, **20**, 1435 (1964).
R. Tschesche, P. Welzel y G. Legler, *Tetrahedron Lett.*, 445 (1965).
23. A. Urzúa, B.K. Cassels, E. Sánchez y J. Comin, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, **63**, 259 (1975).
24. E. Fritschi, W. Heldt, J. Hartenstein y G. Satzinger (Gödecke A.-G.), Patente Europea 0 064 685 (Cl. C07D221/18), 17-11-1982.
25. M. Ciesielski, P. Gorecki, H. Speichert, J. Peczeniuk y S. Popiolek (Instytut Przemysłu Zielarskiego), Patente Polaca 82.864 (Cl. A61K27/14) 25-11-1975.
M. Ciesielski, P. Gorecki, H. Speichert, S. Popiolek, B. Adamczyk y J. Peczeniuk (Instytut Przemysłu Zielarskiego), Patente Polaca 82.864 (Cl. A61K27/14) 25-11-1975.

L. Machon y B. Furmanska (Wroclarskie Zaklady Zielarskie "Herbapol"),
Patente Polaca 104.294 (Cl. A61K35/78), 15-11-1979.

26. H. Speichert, P. Gorecki, M. Ciesielski, S. Talaga y T. Wrocinski (Instytut
Przemyslu Zielarskiego), Patente Polaca 99.193 (Cl. A61K35/78) 15-03-1979.

Dow Chemical Co., Patente Holandesa NL 8001203 (Cl. C07D221/18),
1-10-1981.

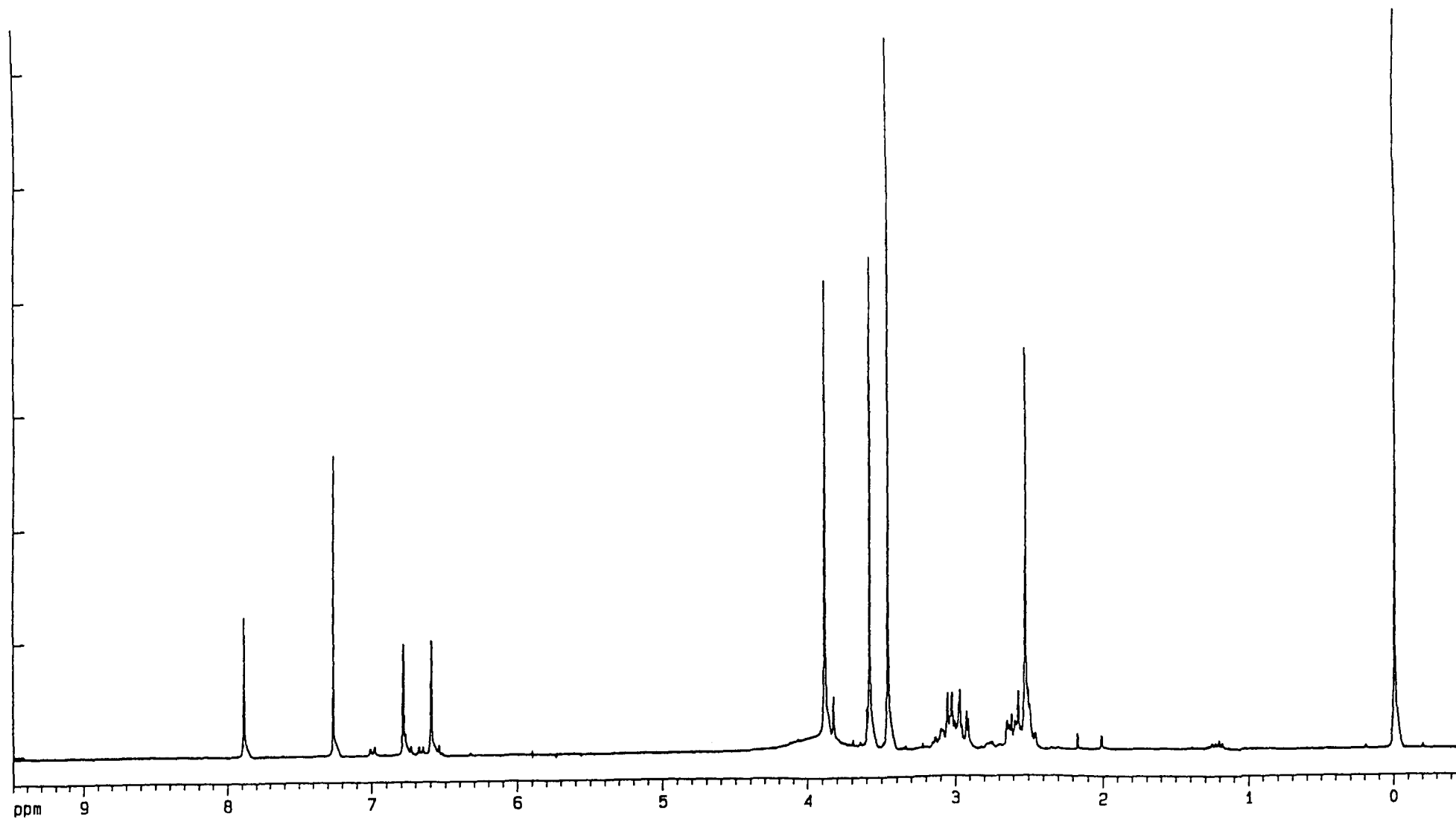
27. S.S.M. Wang (Dow Chemical Co.), Patente Belga 878.356 (Cl. C07F),
21-2-1980.

S.S.M. Wang, Patente Belga 881.709 (Cl. C07F/), 13-8-1980.

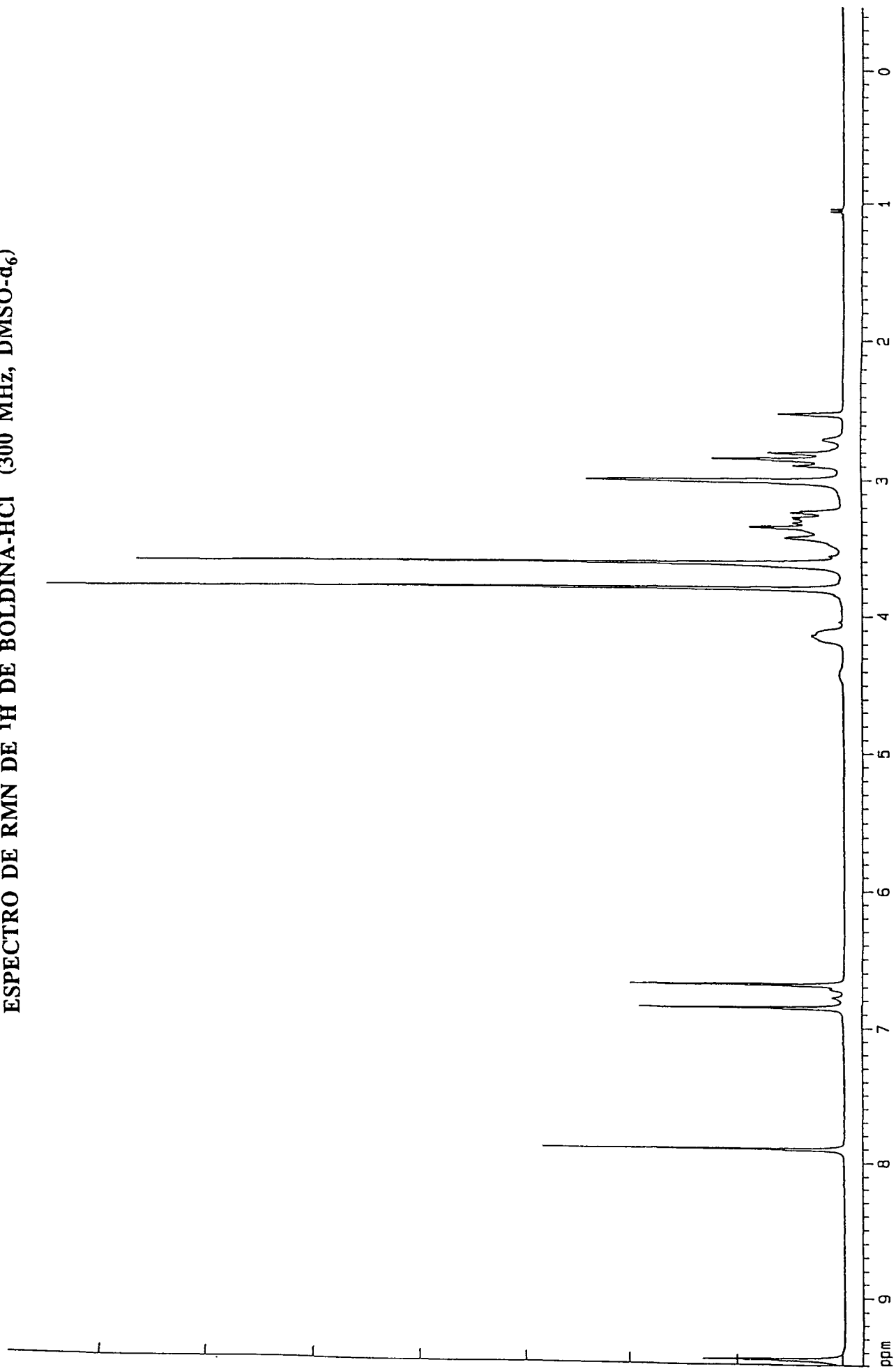
C.T. Goralski (Dow Chemical Co. y Merrell Dow Pharmaceuticals, Inc.),
Patente Estadounidense US 4.358.592 (Cl. 546-75, C07D221/18), 9-11-1982.

28. S.S.M. Wang (Dow Chemical Co.),
Patente Alemana (Occ.) 29 32 833 (Cl. C07D221/18), 6-3-1980.

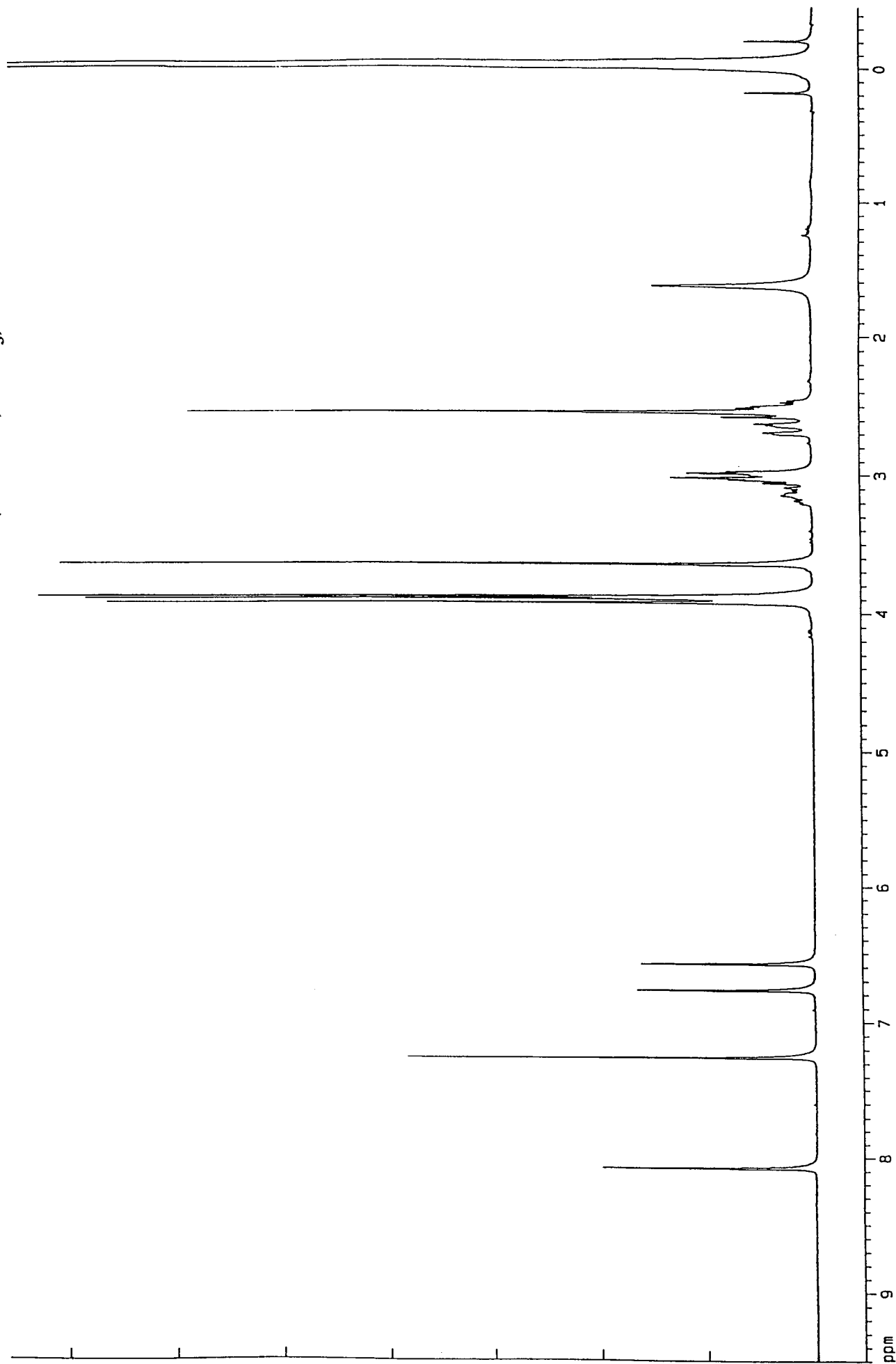
ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE BOLDINA- CHCl_3 CRUDA
(300 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE BOLDINA-HCl (300 MHz, DMSO- d_6)



ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE GLAUCINA (300 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE PREDICENTRINA-HBr
(300 MHz, DMSO- d_6)

